

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**A kataláz és a GRB10 gén polimorfizmusainak
kapcsolata a 2-es típusú diabéteszsel Magyarországon**

Vitai Márta



**DEBRECENI EGYETEM
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2011.**

1.	BEVEZETÉS	3
2.	CÉLKITŰZÉSEK.....	6
3.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
3.1	A kataláz enzim	8
3.2	A csontanyagcsere és az oxidatív stressz kapcsolata.....	11
3.3	Az inzulin rezisztencia.....	13
3.4	A GRB10 protein	14
4.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	16
4.1	Vér katalázaktivitás referens tartományának meghatározása	16
4.2	A DNS izolálás	16
4.3	A kataláz gén 2-es exonjának Hinfl polimorfizmusának vizsgálata	16
4.4	Az SSCP (Single Strand Conformational Polymorphisms) és a PCR heteroduplex vizsgálatok a kataláz gén 2.exonjában.....	17
4.5	A Korányi András Dunántúli Diabétesz Génbank kialakítása	18
4.6	A kataláz gén +22348C>T és a GRB10 gén +11275G>A polimorfizmusának vizsgálata	19
4.6.1	A glükóz anyagcsere jellemzőinek meghatározása.....	20
4.6.2	A kataláz gén +22348C>T (RS769217) plimorfizmusának vizsgálata a 9-es exonban.....	21
4.6.3	A GRB10 gén +11275G>A (RS 2237457) polimorfizmusának vizsgálata a 4-es intronban.....	22
4.7	Differential display	22
4.8	Statisztikai analízisek.....	27
5.	EREDMÉNYEK.....	28
5.1	Vér katalázaktivitás referens tartományának meghatározása	28
5.2	Vér kataláz enzim hiány genetikai jellemzése.....	30
5.2.1	Az ismert polimorfizmusok vizsgálata a magyarországi akatalázémiás és hipokatalázémiás betegekben.....	30
5.2.2	A kataláz gén polimorfizmusai és a 2-es típusú diabétesz közötti kapcsolat....	33
5.2.3	A kataláz gén +22348C>T polimorfizmusa és oszteoporózis kapcsolata.....	36
5.3	Génexpressziós vizsgálatok	43
5.3.1	Differential display.....	43
5.3.2	A differenciált expresszió visszaigazolása.....	46
5.4	A GRB10 gén RS 2237457 (+11275G>A) polimorfizmusának vizsgálata	47
6.	MEGBESZÉLÉS	54
6.1	Vér kataláz enzim referens tartománya	54
6.2	A kataláz gén mutációinak és polimorfizmusainak vizsgálata	54
6.3	A kataláz gén +22348C>T polimorfizmusa és a csontállapot kapcsolata	56
6.4	A differential display eredményei	58
6.5	A GRB10 +11275G>A polimorfizmusának eredményei hazai populáción	58
6.6	Korányi András Dunántúli Génbank létrehozása	59
7.	ÖSSZEFOGLALÁS	61
8.	IRODALOMJEGYZÉK	62
8.1	A dolgozat megírásához felhasznált irodalom.....	62
8.2	Saját közleményeim.....	70
9.	TÁRGYSZAVAK ÉS RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	73
10.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	75
11.	FÜGGELÉK	76

1. BEVEZETÉS

Az értekezésemben fő tudományos tevékenységi területeimet mutatom be. A lehetőségeim, a munkahelyeim megváltozása és a sors úgy hozta, hogy ugyan hosszú évek óta foglalkozom gén polimorfizmusok, génexpressziók vizsgálatával, molekuláris biológiai módszerek adaptálásával, kidolgozásával, de e munkák közös pontját, összekapcsolását csak most tudtam megtenni és egy disszertációban összegezni. A közös pont a 2-es típusú diabétesz (2DM), az inzulin rezisztencia és annak genetikai okai.

Az első gén, amivel foglalkoztam a kataláz enzim génje volt. A kataláz enzimmel kapcsolatos munkát a Sümegi Kórház és Rendelőintézet Laboratóriumában kezdtem el Dr. Góth László vezetésével.

Az emberi szervezetben több folyamatban is képződik hidrogén-peroxid, a hidrogén-peroxid azonban nagy koncentrációban káros a sejtekre, ezért a szervezet különböző védekező mechanizmusokat fejlesztett ki ellene. Jelenlegi ismereteink szerint két enzim játszik szerepet a H_2O_2 szervezetből történő eliminálásában: a kataláz és a glutation peroxidáz. Ezen két enzim szerepéről, hozzájárulásuk mértékéről a H_2O_2 elbontásban megoszlanak a vélemények, de napjainkban egyre inkább a katalázt tartják fontosabbnak **(1)**.

Munkám során először magával az enzimmel foglalkoztam, meghatároztam a vér katalázaktivitás referens tartományát, definiáltam az akatalázémia és hipokatalázémia fogalmát. Anyagot gyűjtöttem, felderítettem a környéken lévő kataláz hiányos családokat, családfákat állítottam össze. Ezután kezdtem a kataláz gén polimorfizmusait molekuláris módszerekkel vizsgálni. Az elsődleges cél az volt, hogy megvizsgáljam az irodalomban már leírt mutációkat a magyarországi populációkban, illetve, hogy új polimorfizmusokat találjak. Ezt a munkát már nagyjából Debrecenben, az orvostudományi egyetemen végeztem, ahol külső munkatársként vettem részt a munkákban.

Dolgozatom következő részében a kataláz gén polimorfizmusait már a diabétesszel és az anyagcsere eltérésekkel kapcsolatban vizsgáltam. A kataláz gén polimorfizmusainak és az anyagcsere eltérések közötti kapcsolat vizsgálatát az is indokolta, hogy az inzulin rezisztencia nemcsak a 2DM-et megelőző állapot és a 2DM jellemzője, hanem számos betegségben kimutatható klinikai tünet. Ilyen a metabolikus szindróma, elhízás, éhezés, terhesség, acromegália, szepszis, égési trauma, carcinoma,

cachexia, vagyis az olyan állapotok, ahol a patomechanizmusban az oxidatív stressz jelenléte és a reaktív oxigén speciesek (ROS) szerepe valószínűsíthető, sőt igazolt. A H_2O_2 -t átalakító kataláz enzim szerepe ebben a folyamatban pedig kulcsfontosságú (2). Az oxidatív stressz szerepet játszhat az osteoporózis kialakulásában is, így a kataláz gén polimorfizmusainak vizsgálata a csontanyagcsere paraméterekkel is indokoltnak tűnt.

Később Dr. Kurucz István és Dr. Korányi László vezetésével folytattam a molekuláris biológiai vizsgálatokat. Kerestem azokat a géneket, amelyek expressziója megváltozik a 2-es típusú diabétesz során, ami egyrészt lehetőséget ígért diagnosztikus rendszerek kialakítására, másrészt olyan, a gyógyszerkutatásban használható tesztrendszerek fejlesztésére, amelynek segítségével a diabétesz kezelésére kifejlesztett gyógyszer-jelölt molekulák tesztelhetők. A „kandidáns gének” keresését a Biorex Kutató és Fejlesztő Rt-nél Veszprémben végeztem. Így jutottam el a GRB10 (Growth Factor Receptor Binding Protein) génig, melyet az eltérő expressziója, valamint az időközben megjelenő, a gén élettani szerepét tisztázó publikációk és a 2DM-el összefüggő polimorfizmusai alapján érdemesnek találtam arra, hogy az egyik ismert GRB10 polimorfizmust és a metabolikus hatások közötti összefüggéseket hazai mintán megvizsgáljam.

Vizsgálataim ezen részének a célcsoportja a szintén diabéteszes betegek 2-es típusú populációja volt, nemcsak azért, mert a 2DM előfordulása olyan mértékben nő, hogy ma már diabétesz világvárványról beszélünk, hanem azért is mert ez a járvány talán lefékezhető, megállítható. Nagy nemzetközi vizsgálatok ugyanis bizonyítják, hogy a 2DM megelőzhető, de csak a korai szakban, akkor, amikor a glükóz intolerancia kezdődik. Ez az IFG (Impaired Fasting Glucose) és az IGT (Impaired Glucose Tolerance) időszak, amit manapság összefoglalóan „prediabéteszként” említenek, illetve az ezt megelőző szakasz, amikor még csak az *inzulin rezisztencia* van jelen. Ebben az időszakban életmódi, diétás megkorlátásokkal és néhány, inzulinérzékenyítő gyógyszerrel a 2DM kialakulása megelőzhető vagy eltolható (3,4). A vizsgálataimnak további indítéka volt még, hogy ez a korai időszak gyakorlatilag nem diagnosztizálható. A világszerte óriási erővel folyó genomikai vizsgálatok szinte napról napra igazolnak a 2DM-el összefüggő gén kapcsolatokat (5), melyek részben a hajlam feltárását, részben pedig a fehérjék szerkezetében, funkciójában eltérést okozó génelterések esetében, a betegség igen korai időszakban történő felismerését ígérik.

Munkánk során hiperinzulinaemiás, euglykaemiás infúziós klemp (HEK) vizsgálatokat végeztünk az egészséges, prediabéteszes és kezelést még nem igénylő 2DM

betegek inzulin érzékenységének mérésére, állapotuk karakterizálására, és az ebből származó adatokat illetve DNS mintákat használtam fel a „diabétesz gének” polimorfizmusainak vizsgálatokor (NKFB-1B/0007/2002 [2002-2005] Diagnosztikus fejlesztés az inzulin rezisztencia szindróma utóbetegségeinek korai felismerésére. Témavezető: Dr. Korányi László). Arra kerestem választ, hogy az ismert „2DM gének” eltérései mennyiben függenek össze az inzulin érzékenység változásával, a különböző anyagcsere paraméterekkel.

A genetikai munkára való fölkészülés része volt, a jelenleg is még fejlesztés alatt álló, „Korányi András Dunántúli Diabétesz Génbank” kialakítása, ahol a több száz diabéteszes beteg és első fokú rokonaik adatait számítógépes adatbázisokban, plazma-, DNS mintáit -80°C -on és izolált mononukleáris sejtjeit folyékony nitrogénben tároljuk. Bár a génbank mérete már alkalmas genomikai vizsgálatokra, azonban anyagi lehetőségeink ezt nem tették lehetővé. A GRB10 genotípusok hazai előfordulását közel 100 diabéteszes beteg mintáján tudtam elvégezni.

Dolgozatomban azokat a kifejezéseket, betegség neveket, paramétereket, amelyek már a magyar szóhasználatban is meghonosultak (pl.: diabétesz, oszteoporózis, genotípus, adiponektin stb.) a fonetikus írásmód szerint szerepeltettem. Azokat a kifejezéseket, módszereket, eljárásokat, amelyekre még nincs magyar megfelelő (pl.: differential display) az angol illetve latin írásmód szerint írtam. A már triviálisnak számító rövidítéseket külön nem magyaráztam (pl.: RNS, DNS, PCR stb.), míg az egyéb rövidítéseket és mozaik szavakat az első megjelenéskor a szövegben kiírtam, valamint a dolgozat végen szereplő „rövidítések jegyzékben” is feltüntettem.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A dolgozatom célkitűzéseit a szó klasszikus értelmében nehéz meghatározni, ugyanis az én esetemben nem egy előre megtervezett Ph.D. témáról, vagy egy kutatási projectről van szó, hanem eddigi kutatásaim összefoglalásáról. A célkitűzés tehát nem más, mint az eddigi eredményeim összefoglalása, számadás eddigi munkáimról, ismereteimről.

A dolgozatom főbb részei a következők:

- **A vér katalázaktivitás referens tartományának a meghatározása, a hipo- és akatalázémia definiálása.**

Mivel a vér katalázaktivitás referens tartományára nem volt adat a vizsgált geográfia területen, ezért a hipo- és akatalázémia definiálásához először meg kellett állapítani a referens értékeket. Meg kellett vizsgálni, hogy van-e különbség a nők és férfiak referens tartománya között, nincs-e változás az életkorral.

- **Hipo- és akatalázémiás családok felderítése, DNS bank létrehozása a genetikai vizsgálatokhoz.**

Közel 5000 vérminta katalázaktivitás eredményét felhasználva kerestük a hipokatalázémiás családokat és határoztuk meg a gyakoriságot.

- **A kataláz gén ismert mutációinak magyarországi vizsgálata.**

A megtalált két akatalázémiás testvér kataláz enzimje a molekulasúly és elektroforetikus mobilitás alapján a japán típusú akatalázémiához volt hasonló, ezért a mutáció vizsgálatot Japánban talált mutációk vizsgálatával kezdtük. A promoter régió -21-es pozíciójában lévő A→T mutációt kerestük.

- **A kataláz gén polimorfizmusai és a 2-es típusú diabétesz közötti kapcsolat vizsgálata.**

A Magyarországon detektált 65 csökkent katalázaktivitású egyén közül 8 volt 2-es típusú diabéteszes (kettő akatalázémiás és hat hipokatalázémiás), míg a normál katalázaktivitásúaknál egy sem. Ezért a már időközben ismertté vált mutációkat kerestük a diabéteszes populációban. A vizsgálatainkat a 2. exon és közvetlen környezetén végeztük.

- **A gén polimorfizmusok hazai előfordulásának vizsgálatára génbank kialakítása.**

A világirodalomban publikált génelterések, „kandidáns gének” betegség és populáció specificitásának vizsgálatára hazai mintákon, „betegség specifikus” expressziós markerek feltárására olyan DNS bank létrehozása volt szükséges, amely a magyarországi populációt reprezentálja.

- **A kataláz gén +22348C>T polimorfizmusának kapcsolata a glükóz és csontanyagcserével**

A kataláz gén 9. exonját érintő +22348C>T polimorfizmus és a szérum oszteokalcin koncentráció között koreai szerzők összefüggést találtak, ezért ezt hazai populáción is megvizsgáltuk, és megnéztük, hogy az általunk kapott összefüggések milyen egyezőséget mutatnak az irodalmi adatokkal. Az összefüggések keresését kiterjesztettük az oszteokalcin mellett egyéb csont markerekre és a glükóz anyagcsere paramétereire is.

- **Differenciáltan expresszáló gének keresése állat-modellen.**

Gyógyszerjelölt molekulák hatásmechanizmusának vizsgálatához ma már hozzátartozik a gén szintű vizsgálat is. A vizsgálatához a differential display technikát választottuk, így jutottunk el a differenciáltan expresszáló gének megtalálásához. Mivel egy, a 2-es típusú diabétesz szövődeményeinek a megelőzésére kifejlesztett molekula hatásmechanizmusát vizsgáltuk, ezért a „kandidáns gének” expressziójának visszaigazolására diabéteszes állat-modelleket használtuk.

- **A GRB10 protein polimorfizmusának vizsgálata magyarországi populációban és kapcsolata a glükóz anyagcserével**

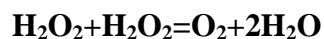
A populációs genom vizsgálatok a GRB10, mint „kandidáns gén” polimorfizmusai és a 2-es típusú diabétesz között összefüggéseket tártak fel, így hazai populáción is megvizsgáltuk a GRB10 gén +11275G>A polimorfizmusának gyakoriságát az egészséges és diabéteszes populációban és összefüggést kerestünk a polimorfizmus és a glükóz anyagcsere paramétere között.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 A kataláz enzim

A kataláz enzimet már az 1800-as években ismerték, 1901-ben Loew nevezte el kataláznak, utalva a katalízis jelenségére. Az 1900-as évek kezdetén bevonult a diagnosztikába. Az enzimreakciók mechanizmusának a tanulmányozására is a kataláz szolgált példaként. A veleszületett humán enzimhiányok között az egyik első volt a detektált kataláz hiány (1948). A glutation peroxidáz felfedezésével és a laboratóriumi automaták megjelenésével azonban a kataláz jelentősége visszaszorult, de napjainkban egyre jobban visszanyeri diagnosztikus értékét.

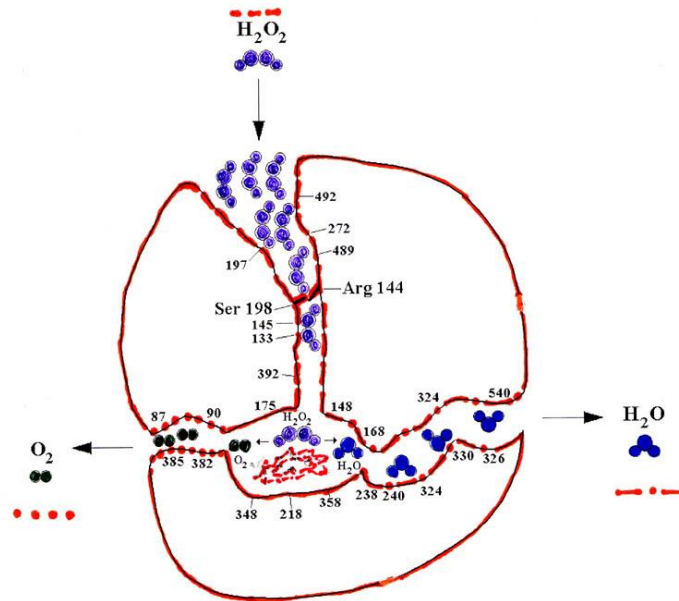
A kataláz (EC 1.11.1.6, hidrogén-peroxid-hidrogén-peroxid oxidoreduktáz) enzim az egyik legismertebb enzim. A kataláz enzim a következő reakciót katalizálja:



A négy alegységből felépülő, mintegy 240 kDa nagyságú fehérje alegységként egy-egy hem (ferriprotoporfirin) csoportot tartalmaz. Az első hidrogén-peroxid molekulával képezi az elsődleges enzim-szubsztrát komplexet (komplex1), majd a második hidrogén peroxid molekulával képezi a második enzim-szubsztrát komplexet (komplex1A). Ebből keletkezik a két termék, az O₂ és a H₂O, majd a kataláz újra aktív formává alakul. Az első reakció megfordítható, míg az utóbbi egyirányú (7).

Az enzim 1 molekulája 1 sec alatt mintegy 1 millió molekula hidrogén-peroxidot is képes elbontani. Ez a kivételes teljesítménye az enzim szerkezetének tulajdonítható.

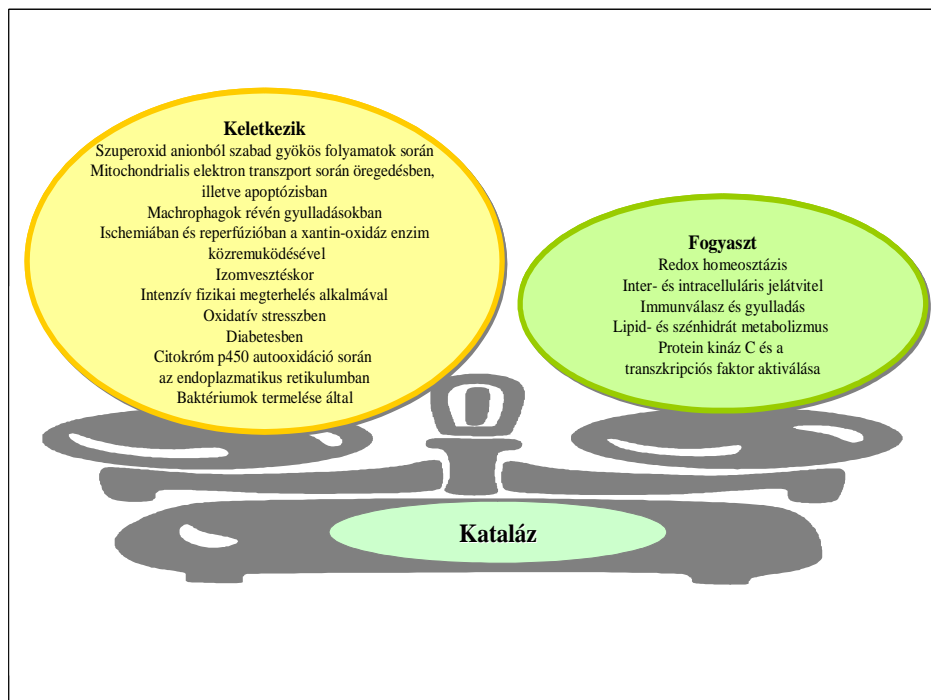
Az enzim felszínétől a zsebszerű bemélyedésben található aktív centrumig három csatorna vezet. A fő csatorna a mérete miatt csak a víz és a hidrogén-peroxid számára járható, a reakció során keletkező víz a laterális csatornán keresztül távozik egy kapurendszeren keresztül, míg az oxigén a centrális csatornán keresztül távozik. A reakciótermékek így egymástól teljesen függetlenül és gyorsan távoznak az aktív centumból, megnövelve ezzel a reakció sebességét.



1. ábra A kataláz enzim működése (sematikus ábrázolás) (1)

A humán kataláz enzim a legnagyobb koncentrációban a vörösvértestekben (citoszol) és a májban (peroxisomákban, mitokondriumokban) található, míg a szérum és a kötőszövetek az előzőek ezredrészénél is kisebb aktivitást mutatnak.

A kataláz enzim fiziológias szerepe kettős. Az egyik feladata bontani a toxikus mennyiségű hidrogén-peroxidot, másrészt biztosítani a hidrogén-peroxid kis (fiziológias) koncentrációját és egyensúlyt tartani a két folyamat között.

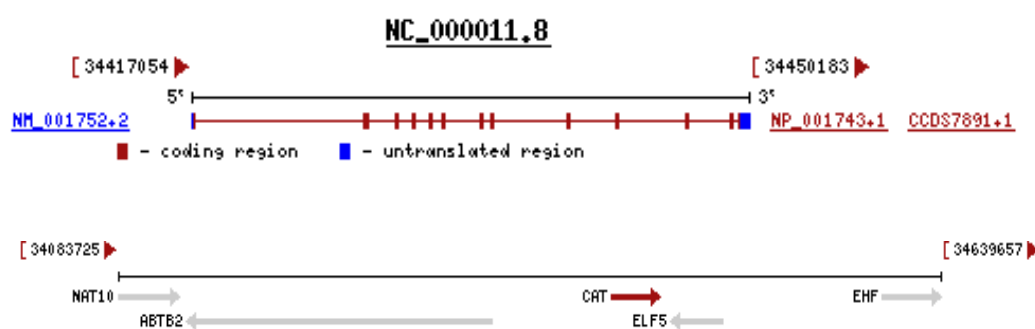


2. ábra A hidrogén-peroxidot termelő és fogyasztó folyamatok és a kataláz szerepe

A toxikus mennyiségű hidrogén-peroxid bontást az aktív centrumához vezető csatornában lévő Ser 198 és Arg 144 aminosavak által képzett, a nagy hidrogén-peroxid koncentrációra kinyíló kapu segítségével biztosítja. A kis mennyiségű hidrogén-peroxidnak jelentős szerepet tulajdonítanak bizonyos vegyületek degradációjában (hemoglobin, metalloproteázok), intermedier termékek, vagy folyamatok (NF-kappa B transzkripciós faktor, vasszabályozó protein, ERK MAP kináz, tirozin foszforiláció) aktiválásában, de szerepet tölthet be, mint inhibitor is (8).

A jelátvitelben betöltött szerepe egyre jelentősebbé válik, ezen belül is az inzulin mediált jelátvitelben betöltött szerepe kiemelkedő (9). A hidrogén-peroxid szerepet játszik a sejtploriferációban, az apoptózisban, a trombocita aktivációban (10).

A kataláz enzim génje a 11-es kromoszóma p13-as pozíciójában helyezkedik el. Ez kódolja az 527 aminosavból álló humán kataláz molekula alegységét. A kataláz enzim génjének 13 exonja, 12 intronja és 33 122 nukleotidja van és a kromoszómán a 34 417 054 és a 34 450 176 nukleotidok között helyezkedik el.



3. ábra A kataláz enzim génje és az elhelyezkedése a 11-es kromoszómán

A kataláz fehérje szintézise a riboszómákon történik. A kataláz alegység signal protein révén jut be a peroxiszómákba. A peroxiszómákban történik a hem beépülése, majd a dimer és tetramer képződés. Az enzimatikusan aktív kataláz enzim tehát négy azonos alegységből épül fel, és minden alegység egy hem csoportot tartalmaz (11).

A kataláz génnek több polimorfizmusa is ismert, melyek különböző betegségekkel kapcsolhatók össze, de ismerünk számos olyan mutációt is, amelyek nem befolyásolják a fehérje expressziót, nincsenek hatással az enzimaktivásra, és nincs asszociációjuk betegségekkel (benignus polimorfizmusok). Az ismert kataláz gén polimorfizmusok (a teljesség igénye nélkül) az 1. táblázatban láthatóak (9,12,14,15,16,17,18,19,20,21).

1. táblázat A kataláz gén polimorfizmusai (1)

Mutáció	Helye	Régió	Aminos.	Hivatkozás	Asszociáció
C>T	-1167	Flanking	-	Chystakov (12)	diabétesz
C>T	-262	Flanking	-	Forsberg (9)	transzkripció
G>A	-259	Flanking	-	Jiang (14)	vérnyomás
A>T	-21	Flanking	-	Wen (15)	benignus
C>A	-20	Flanking	-	Góth (16)	benignus
C>T	-18	Flanking	-	Góth (16)	benignus
C>T	4	5' nem kódoló	-	Góth (17)	benignus
A>G	17	5' nem kódoló	-	Casp (18)	vitiligo
T>C	20	5' nem kódoló	-	Kishimito (19)	benignus
C>T	44	5' nem kódoló	-	Góth (17)	benignus
T>C	49	5' nem kódoló	-	Wen (15)	benignus
G>A	-60	1. intron	-	Góth (20)	benignus
G>C	5	2. intron	-	Vitai (21)	diabétesz
G>A	7	2. intron	-	Vitai (21)	diabétesz
T>A	11	1. intron	-	Góth (20)	benignus
G>T	61	1. intron	-	Vitai (21)	diabétesz
T>C	78	1. intron	-	Wen (15)	benignus
G>A	50	3' nem kódoló	-	Wen (15)	benignus
T>C	12	1.exon	Ser ³ Ser	Góth (17)	benignus
A>C	27	1.exon	Ser ²⁷ Arg	Góth (17)	benignus
C>T	111	9.exon	Asp ³⁸⁹ Asp	Wen (15)	benignus
T>C	60	10.exon	Leu ⁴¹⁸ Leu	Kishimoto (19)	benignus
T>G	96	2.exon	Asp ⁵³ Glu	Vitai (21)	diabétesz
G>C	135	2.exon	Glu ⁶⁷ Asp	Vitai (21)	diabétesz

3.2 A csontanyagcsere és az oxidatív stressz kapcsolata

Az utóbbi időkben egyre több tanulmány jelent meg arról, hogy az oxidatív stressz szerepet játszhat az osteoporózis kialakulásában. Számos adat szól arról, hogy a korrall összefüggő csontvesztés nem kizárólag a hormonális állapot változását tükrözi, hiszen fiatal nők és férfiak 20-as éveiben - minden hormonális változás nélkül - is már kimutatható a trabekuláris csontvesztés (22, 23). A sex szteroidoktól független, korrall összefüggő csontvesztés legnagyobb rizikója az életkor és az anyagcsere eltérésekkel

folyamatosan növekvő oxidatív stressz, és az oxidatív stressz elleni védekezés csökkenése (24, 25).

Az ösztrogének és androgének csontvédő hatását is részben e hormonok direkt antioxidáns hatásával magyarázhatjuk, hiszen az ovariectomizált állatokban a csontvesztés felgyorsul, mert csökken a csontok glutation és thioredoxin szintje, ami viszont külső ösztrogén vagy antioxidánsok adásával visszaállítható (26).

Számos in vitro- és állatkísérlet bizonyítja, hogy az oxidatív stressz csökkenti a csontépülést és serkenti a csont leépülését, mivel a stressz hatására csökken az oszteoblastok differenciálódása és az élettartama (25,27,28).

A csökkent katalázaktivitással rendelkező egyéneknél a fokozott oxidatív stressz miatt dislipidemia is kialakulhat (29), mert a csökkent antioxidáns kapacitás miatt a mitokondriális H₂O₂ emisszió fokozódik. Ez történik a magas zsírtartalmú diéta fogyasztásakor is (30), amikor a fokozott lipid oxidáció okozza az oxidatív stresszt. Az oxidatív stressz aktiválja az NF-κB gént, és ezen keresztül az angiotensin-II aktivitást, az inzulin jelátvitelt gátló (TNFα) cytokin képzést, az izomsejtekben a PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor) és a lipoxigenáz enzim fokozott expresszióját okozza a WNT szignál rendszer egyidejű csökkentésével, mely a csontképzés romlásával és inzulin rezisztencia kialakulásával jár (30).

A sok kísérletes munka ellenére kevés adatot ismertünk arról, hogy vajon az oxidatív stressznek milyen hatása lehet az emberi szervezetben az oszteoporózis kialakulására (32). Koreai szerzők vizsgálták a kataláz gén 9-es exonjának 111-es pozíciójában lévő C→T polimorfizmust (+22348C>T, RS769217) és összefüggést találtak a genotípusok, valamint a csontállapotot jelző paraméterek (Bone Mineral Density, BMD) és a szérum oszteokalcin között.

Az oszteokalcin (bone-γ-carboxyglutamic acid protein, BGP) 50 aminosavat tartalmazó csontspecifikus protein. Az oszteokalcint az oszteoblasztok termelik és az oszteoblasztokból történő kiválasztódás után egyrészt a csont mátrixba, másrészt a véráramba kerül, így a szérumban lévő oszteokalcin mennyisége függ a csont átépülés (épülés-bomlás) folyamataitól (32). Egerekben az oszteokalcin hiányakor nemcsak a csontképződés csökken, de a pankréasz β-sejtek proliferációja, és bennük az *Inzulin*-, a zsírsejtekben pedig az *Adiponectin* gén expressziója is (33).

A csontállapot és a metabolikus paraméterek között kapcsolat van. A glükóz anyagcsere, inzulin érzékenység és a csontok állapota között az egészséges, változó

korban lévő nőkben igazolt az összefüggés. Vizsgálataink szerint azonban ez az összefüggés a glükóz tolerancia romlásával és az inzulin rezisztencia kialakulásával megbomlik (34). Világviszonylatban elsőként munkacsoportunk igazolta, hogy az oszteokalcin szérumszintnek független és szignifikáns prediktora több metabolikus paraméter. Nők esetében többek között az éhomi glükóz szint, a teljes test és az izomtömeg glükóz felhasználás, a glükóz felhasználás sebessége és az LDL-koleszterin koncentráció, míg a férfiaknál a szérum kalcium szint, az OGTT görbe alatti terület, a szabad zsírsav szint (35).

3.3 Az inzulin rezisztencia

Definíció szerint az inzulin rezisztencia olyan állapot, amikor normális mennyiségű inzulin szubnormális választ eredményez. A 2-es típusú cukorbetegség többségében az inzulin hatása a vártnál kisebb, inzulinérzékenységük csökkent, vagyis inzulin rezisztensek. Az inzulin érzékenység szokatlanul nagymértékű variációt mutat az egészséges lakosság vizsgálatakor is. A különbségeknek azonban mindössze csak egyharmadért felelősek az inzulin hatását ismerten befolyásoló tényezők (elhízás, táplálkozás, fizikai aktivitás, környezeti tényezők stb.), jelezvén, hogy az inzulin érzékenységért döntő mértékben genetikai tényezők felelősek (36).

Az inzulin rezisztencia a kutatók jelentős többsége szerint (37, 38) a prediabéteszt (IFG és IGT) megelőző szakasz, amikor az inzulin szenzitív szövetekben csökken az inzulin érzékenység, több inzulin kell a sejtekbe történő glükóz transzporthoz, romlik az inzulin jelátvitel a sejten belül. A 2-es típusú diabétesz kialakulása ebben az időszakban és a prediabétesz idején még életmódbeli változtatásokkal, diétás megkorlátozásokkal és néhány, az inzulin érzékenységet növelő gyógyszerrel megelőzhető vagy eltolható.

Az inzulin rezisztencia gyakorlatilag még alig diagnosztizálható. Az inzulin érzékenység nemzetközileg elfogadott mérési módszere, a „gold standard”, a hiperinzulinémiás, euglikémiás infúziós klempe (HEK) technika, azonban ez a módszer időigényessége, invazív volta és magas költsége miatt nem alkalmas diagnosztikus szűrővizsgálatokra. Az alternatív megoldás a HOMA érték használata lenne, mely az éhomi vércukor és inzulin szint ismeretében számolható ($HOMA-IR = \frac{[éhomi\ inzulin\ mmol/l \times éhomi\ glükóz\ \mu E/ml]}{22,5}$). Ez a széles körben használt paraméter azonban gyenge kapcsolatot mutat a HEK módszerrel mért M értékekkel (ahol M = mg glükóz/min/testtömeg kg, vagy izomtömeg, vagy a test zsírtömege), ezért számos

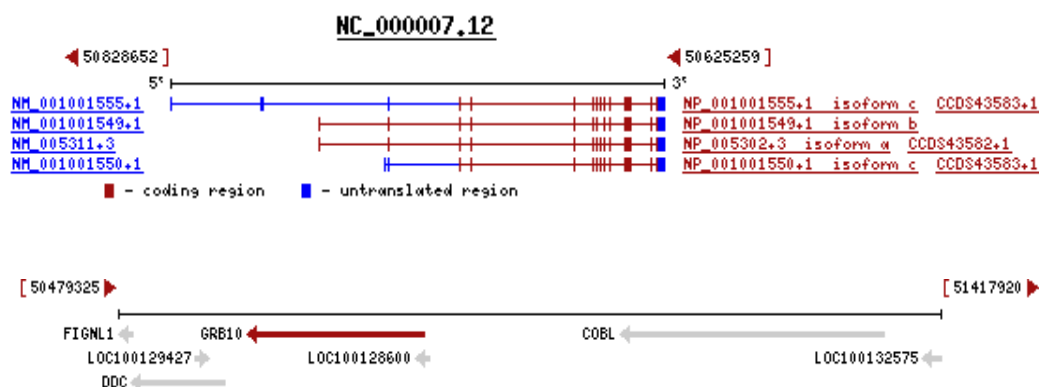
komplikáltabb variációja ismert, ahol a szabad zsírsav, zsírparaméterek, adipokinek mérésével próbálták az eljárás használhatóságát – nem sok sikerrel – növelni (39). Ezen problémák megoldására kínál alternatív utakat a genetika.

3.4 A GRB10 protein

A GRB10 az adaptor proteinek szupercsaládjához (GRB7, GRB10, GRB14 és Mig-1) tartozik. A Mig-1 kivételével a család minden tagja tartalmaz egy N-terminális prolinban gazdag feltételezett SH3, egy pleckstrin homológ (PH), egy BPS, és egy C terminális SH2 domént. Ezek az adaptor proteinek számos tirozin kináz receptorhoz, intracelluláris proteinhez képesek kötődni, szabályozva a sejt növekedést, a metabolizmust, az apoptózist, a sejt migrációt (40). A GRB10 és a GRB14 kötődik az inzulin receptorhoz (IR) és az inzulin-like growth faktor receptorhoz (IGFR). A GRB 10 és a GRB14 gátolja az IR katalitikus aktivitását és blokkolja a szubsztrát (inzulin receptor szubsztrát-1 és -2: IRS-1, és IRS-2) hozzáférését az aktivált receptorhoz. A GRB10 és a GRB14 eltérő módon expresszálódik a különböző szövetekben és számos izoformájuk is létezik. Az egyes doménok közül az SH2 a legkonzervatívabb, ami tartalmaz egy olyan foszfortirozin-kötő modult, amelyen keresztül a növekedési faktorok foszfortirozinja és az egyéb intracelluláris szignál proteinek kötődni képesek (41). A GRB10 az SH2 és BPS doménján keresztül kötődik az IR kináz doménjéhez. A kötődés mértékét az inzulin stimuláció mértéke befolyásolja. Számos in vitro kísérlet bizonyította, hogy az IR kötődése a GRB10-hez csökkenti az inzulin hatását. A GRB10 overexpressziója visszасzorítja az inzulin stimulált PI-3 (foszfatidilinozit) kináz, Akt/PKB (protein kináz B) MAPK (mitogén aktivált protein kináz) aktivációt, a glikogén szintáz aktivitást és a glükóz felvételt (42). GRB10 génkiütött egereken végzett kísérletek in vivo is bizonyítják, hogy a GRB10 hiánya egyértelműen erősíti az inzulin hatását, az inzulin stimulált Akt és a MAPK foszforilációját. A hiperinzulémiás-euglikémiás klempe vizsgálatok pedig azt mutatják, hogy a GRB10 expressziójának a csökkenése a perifériás szövetekben (izom és zsír) növelik az inzulin szenzitivitást (42), míg az inzulin és az éhgyomri glükóz koncentráció nem változik. Ezen eredmények a GRB10 negatív regulátor szerepét támasztják alá. A GRB10 génkiütött egerek születése utáni súlygyarapodása szignifikánsan magasabb, mint a vad típusú egereké, ami viszont az endogén GRB10-nek a növekedési faktorokra kifejtett szuppresszor hatásával magyarázható (42). A GRB10-nek tulajdonítanak egy olyan speciális szerepet is a

jelátvitelben, hogy képes integrálni és összegyűjteni (scaffold protein) a bejövő külső jeleket. A jelátviteli komplexben a GRB10 specifikus szerepe attól függ, hogy éppen milyen a hozzá kötődött mediátor proteinek mennyisége és affinitása. Így a GRB10 képes arra, hogy miközben a mennyisége azonos, hol pozitív, hol negatív regulátorként tűnjön fel (44).

A GRB10 protein génje a 7-es kromoszóma p12-p11.2-es pozíciójában helyezkedik el. Ez kódolja az 536 aminosavból álló humán GRB10 proteint. A GRB10 protein génjének 19 exonja, 18 intronja és 203393 nukleotidja van, és a kromoszómán az 50 828 652 és a 50 625 259 nukleotidok között helyezkedik el. A GRB10 génnek több splicing variánsa, izoformja van.



4. ábra A GRB10 protein génje, izoformjai és elhelyezkedése a 7-es kromoszómán

A GRB10 génnek számos egy pontos nukleotid polimorfizmusa (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) ismert, amelyek közül több összefüggésbe hozható a 2-es típusú diabéteszsel. Kimutatták, hogy a RS2237457 polimorfizmus (+11275G>A) jelenlétekor az egyes genotípusok GAUC értéke (Glucose Area Under Curve; az orális glükóz tolerancia teszt során kapott görbe alatti terület) szignifikánsan eltér a nem diabéteszes egyének esetében (45). Az RS494710 (1209A>G) polimorfizmus gyakorisága a 2-es típusú diabéteszes betegek csoportjában szignifikánsan magasabb, az A allélt hordozó egyéneknél a diabétesz kialakulása kisebb valószínűségű (46).

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Vér katalázaktivitás referens tartományának meghatározása

A referens aktivitás értékek meghatározására Sümeg környékéről (7 település, nem ipari terület) 880 nő és 876 férfi (életkor: 14-90 év) mintáját használtuk fel. A referens egyéneknek nem volt sem akut, sem krónikus betegségük, nem szedtek folyamatosan gyógyszert, továbbá a vizelet, vércép és glükóz vizsgálatok eredményeiből kóros érték nem volt kimutatható. A hipokatalázémia jellemzésére 3300 egészséges és 1630 kórházi fekvőbeteg (Sümeg és környéke) vér katalázaktivitás eredményeit használtuk fel.

A vér katalázaktivitást - a hidrogén-peroxid szubsztrát időegység alatti koncentráció csökkenés mérésével - egyszerű spektrofotometriás assay-vel mértük (47).

A referens tartomány alcsoportokra (férfi és nő) osztottuk (48). Percentilis meghatározást végeztünk (49), és megvizsgáltuk a referens érték-életkor összefüggést (50).

4.2 A DNS izolálás

A DNS izolálást limfocitákból végeztük. Az izolálást kezdetben a standard módszerként ismert (51) lizálásos-kisózásos technikával végeztük, majd áttértünk a kereskedelmi kit-ek használatára (Sigma TRI Reagent, T9424; Epicenter MasterPure™ DNA Purification Kit for Blood, MB11740).

4.3 A kataláz gén 2-es exonjának HinFI polimorfizmusának vizsgálata

Összesen 87 mintát vizsgáltunk, ebből 52 személy volt hipokatalázémiás, 35 személy pedig normokatalázémiás kontroll.

A PCR reakcióban alkalmazott forward primer szekvenciája: 5'-aatcagaaggcagtcctccc-3', a reverz primer szekvenciája: 5'-tcggggagcacagagtgtac-3'. Az amplifikációt 10,5 µl össztérfogatban végeztük. Az amplifikációhoz 1 µl genomiális DNS-t (~0,2 µg/µl) használtunk. A reakció elegy 1,6 µl dNTP-t (1,25 mM koncentrációban mindegyik), 1-1 µl primert (10 µM), 0,5 µl Taq polimerázt (5 U/µl), 1 µl MgCl₂-t (8,3 mM) és 1 µl 10X-es töménységű PCR puffert tartalmazott. A reakcióhoz a Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden) reagenseket használtuk. Az amplifikáció körülményei: 94°C 30 sec denaturálás, 55°C 30 sec annealing, 72°C 60 sec kiterjesztés, 30 ciklus. A sokorosítást Perkin Elmer DNA Thermal Cycler készülékben végeztük.

A PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) körülményei: 8 µl PCR termékhez adtunk 36 µl vizet, 5 µl restrikciós enzim puffert, és 1 µl HinfI enzimet (8 U/µl). A keveréket egy éjszakán át 37°C-on emésztettük, majd 20 percig 70°C-on inaktívtuk az enzimet. Az emésztéshez az enzimet és annak pufferét a Pharmacia Biotech-től (Uppsala, Sweden) szereztük be. A kapott fragmenteket 6%-os poliakrilamid gélen választottuk szét és ezüstfestéssel tettük láthatóvá (Bio-Rad, Herkules, CA, USA).

A PCR termékek szekvenáláshoz a termékeket poli-akrilamid gélen szétválasztottuk és etidium-bromid segítségével láthatóvá tettük. A megfelelő csíkokat kivágtuk és 100 µl TE pufferben egy éjszakán át 37°C-on eluáltuk, majd tömény etanollal precipitáltuk, azután 70%-os etanollal mostuk és 10 µl desztillált vízben visszaoldottuk.

A PCR termékeket a Taq Dye-Deoxy Termination Cycle Sequencing Kit segítségével szekvenáltattuk. (ABI, DNA sequencer, Model 377, Foster City, CA, USA)

4.4 Az SSCP (Single Strand Conformational Polymorphisms) és a PCR heteroduplex vizsgálatok a kataláz gén 2.exonjában

Összesen 308 diabéteszes esetet vizsgáltunk Magyarország különböző régióiból. Az életkoruk 45 és 70 év között volt, az átlagéletkor: 58,4±6,5 év. A férfiak BMI értéke: 28,5±1,9 kg/m², a nőké: 27,3± 2,1 kg/m². A csoport 128 férfi és 180 nőből állt. A diabétesz diagnózisát a National Diabetes Data Group (52) szabályai szerint állítottuk fel (emelkedett hemoglobin A1c érték, glükózuria, anamnézis, illetve orális glükóz terhelési teszt). Kizáró kritérium volt: III. stádiumú diabéteszes polineuropátia, a kontrollálatlan magas vérnyomás, veseelégtelenség, 3 éven belüli és gyógyíthatatlan daganatos betegség, egyéb endokrin megbetegedés, gesztációs diabétesz és az inzulin terápia. Kontroll csoport: összesen 120 egészséges magyar személy. Az életkoruk 41 és 71 év között volt, az átlagéletkor 55,3±7,1 év. A kizáró kritériumok a diabéteszes csoportoknál felsoroltak mellett: öröklött kataláz hiány, anémia, és a referens tartomány alatti katalázaktivitás.

A forward primer szekvenciája 5'-tgcaagctatgtaccccgtg-3', reverse primer szekvenciája 5'-acacagcacttacgtctcc-3' volt (19). A 265 bp nagyságú termék magába foglal 80 bp-t az 1. intronból, 172 bp-t az 2. exonból és 13 bp-t az 2. intronból. Az amplifikációt 10,5 µl osztófogatban végeztük. Az amplifikációhoz 1 µl genomiális DNS-t (~0,2 µg/ µl) használtunk. A reakció elegy 1-1 µl primert (10 µM), 5 µl REDTaq (RedyMix, Sigma-Aldrich) tartalmazott. Az amplifikáció körülményei: 94°C 30 sec

denaturálás, 62°C 30 sec annealing, 72°C 60 sec kiterjesztés, 30 ciklus. A sokszorosítást Perkin Elmer DNA Thermal Cycler készülékkel végeztük.

Az SSCP analízishez 5 µl PCR terméket, 5 µl 99%-os formamidot, 20 mM EDTA-t, és 0,005% brómfenol-kéket összekevertük, felmelegítettük 96°C-ra, ezen a hőmérsékleten inkubáltuk 6 percig és ezután gyorsan jégre helyeztük. 6%-os poliakrilamid gélen (150X150X1,5 mm) futtattuk 300 V-on, 5-6 órán át. A szétválasztott DNS szakaszokat ezüstoffestéssel tettük láthatóvá.

A PCR heteroduplex analízissel a kataláz gén GA illetve a G inzercióját detektáltuk a 2. exonban. Ezzel a módszerrel négy csíkot lehet látni a GA inzerció esetén (vad-vad homoduplex, 268 bp; mutáns-mutáns homoduplex, 270 bp; és két heteroduplex csík, 273 és 304 bp), a G inzerció esetén pedig két csíkot kapunk (homoduplex 268-270 bp; heteroduplex 275 bp). 2 µl PCR terméket 94°C-ra melegítettük, majd lassan lehűtöttük, és 6%-os poliakrilamid géltre vittük (150X150X1,5 mm), majd 300 V-on, 3-4 órán át elektroforizáltuk. A szétválasztott DNS szakaszokat ezüstoffestéssel tettük láthatóvá.

A szekvenálás a Hinfl polimorfizmus vizsgálatoknál leírt módon történt.

4.5 A Korányi András Dunántúli Diabétesz Génbank kialakítása

A mintatár kialakítása az alábbi szempontok alapján történt:

1. „egészséges családok” – a családban a fenotípus alapján a diabétesz manifeszt formája nem fordult elő
2. „diabéteszes családok” – a családban manifesztálódott 2-es típusú diabéteszes beteg volt

A génbankba csak azoknak a családoknak a mintáit gyűjtöttük össze, ahol legalább 6 olyan személy vállalkozott a mintaadásra, akik első fokú rokonaik voltak egymásnak (nagyszülők, szülők, gyerekek). A diabéteszes családok esetében további kritérium volt, hogy a családban legalább egy személy 2-es típusú diabéteszes legyen. A diabétesz diagnózisát az orális glükóz tolerancia teszt alapján az ADA (American Diabetes Association) kritériumok alapján állítottuk fel (az éhomi glükóz koncentráció >7,0 mmol/l és az OGTT 2 óránál a glükóz koncentráció >11,1 mmol/l).

A mintatárban tároljuk a mintát adó személyek izolált genomiális DNS és plazma mintáit (-80 °C-on) valamint a mononukleáris sejtjeiket (folyékony nitrogénben), amely a későbbiek során blasztos transzformáció után korlátlan DNS forrást biztosít. Adatlapokon illetve számítógépes adatbázisokban tároljuk a betegek és hozzátartozóik klinikai-, biokémiai-, alkati-, betegség előzmény-, tünet- és lefolyás (fenotípus) adatait.

A génbankban tároljuk azon személyek genomias DNS, plazma és mononukleáris sejt mintáit is, akiknél hiperinzulinémiás, euglikémiás klempt vizsgálatot végeztünk.

A mintatár részét képezi még a korai (perimenopauzában már meglévő) oszteoporózisos nők és családtagjaik mintái is.

4.6 A kataláz gén +22348C>T és a GRB10 gén +11275G>A polimorfizmusának vizsgálata

A vizsgálathoz összesen 141 olyan személy DNS mintáját használtuk, akik hiperinzulinémiás-euglikémiás klempt vizsgálaton vettek részt. A vizsgált személyeket az orális glükóz terhelési teszt (75 g glükóz OGTT) alapján az ADA kritériumoknak megfelelően csoportosítottuk. Két fő csoportot hoztunk létre: egészséges és glükóz intoleráns. A glükóz intoleráns csoporton belül további csoportosítást végeztünk (IGT, IFG, gyógyszeres, vagy inzulinkezelést nem igénylő 2DM). Célunk az volt, hogy az egészségesből a 2DM-be átívelő, a diabéteszt megelőző, illetve annak korai állapotát tükröző beteganyagot vizsgáljunk, hogy kizárjuk a súlyosabb 2DM szövődései miatt kialakuló következményeket, vagy a kezeléshez használt gyógyszerek hatásait.

Egészséges: éhomi glükóz koncentráció <5,6 mmol/l és OGTT 2 óránál a glükóz koncentráció <7,8 mmol/l. IFG (impaired fasting glucose): az éhomi glükóz koncentráció 5,6-6,9 mmol/l. IGT (impaired glucose tolerance): az OGTT 2 óránál a glükóz koncentráció 7,8-11,0 mmol/l között van. 2DM (2-es típusú diabétesz): az éhomi glükóz koncentráció >7,0 mmol/l és az OGTT 2 óránál a glükóz koncentráció >11,1 mmol/l. Kizártuk azokat, akik a csontanyagcserét ismertén befolyásoló gyógyszert szedtek, egyéb endokrin betegségük volt. A vizsgált személyek neme és anyagcsere állapota szerinti megoszlása a 2. táblázatban látható. A GRB10 gén +11275G>A polimorfizmusának gyakoriságát 85 2DM beteg DNS mintáján (*Korányi András Dunántúli Diabétesz Génbank*) is vizsgáltuk.

2. táblázat A kataláz gén +22348C>T és a GRB10 gén +11275G>A polimorfizmus vizsgálatához használt minták nem és anyagcsere állapot szerinti megoszlása

	Férfi	Nő	Összesen
Anyagcsere egészséges	64	24	88
Glükóz intoleráns	26	27	53
<i>IGT</i>	12	17	29
<i>IFG</i>	8	7	15
<i>2DM</i>	6	3	9
Összesen:	90	51	141

4.6.1 A glükóz anyagcsere jellemzőinek meghatározása

Az inzulin érzékenység mértékét, a teljes test és alkotórészeinek (zsír és izomszövet, zsírmennyiség, testtömeg) glükóz felhasználását a hiperinzulinémiás-euglikémiás klempt (HEK) módszerrel (53) mértük. Az inzulin érzékenységet az M értékekkel (M = az egész testtömegre vagy a különböző szövetekre vonatkoztatott glükóz felhasználás), és a HOMA indexszel ($HOMA-IR = G_o \times I_o / 22,5$, ahol I_o = éhomi inzulin ($\mu E/ml$) és G_o = éhomi glükóz (mmol/l) $HOMA-IS = 1 / HOMA-IR$) jellemeztük. A több órán keresztül tartó klempt vizsgálat során a vizsgált személy az egyik karjába folyamatosan magas, 100 mE/l inzulin vérszintet biztosító inzulin infúziót kapott, míg a másik karba glükózt tartalmazó infúzió folyt, olyan mennyiségben, hogy az 5 percenként mért glükóz stabilan 5,0 mmol/l ($\pm 0,5$ mmol/l) volt. Amikor ezt a stabil állapotot sikerült elérni, 30 percen át mértük az elfogyasztott (és a vizelettel időközben kiürült) glükóz mennyiségét, amely a test aktuális glükózfelvételével egyenlő, hiszen a máj glükóz és a pankréasz inzulin termelését a magas inzulin vérszint blokkolta.

A testösszetétel mérése DEXA (DPX- MD+, GE-Lunar, USA) készülékkel történt.

A glükóz és csontanyagcserevel kapcsolatos általános klinikai laboratóriumi paramétereket Cobas Mira laboratóriumi automatával (Roche Diagnostics, Németország) mértük szérumból Roche tesztek felhasználásával. (Glükóz: GOD-POD módszer, kat szám: 11448668; Ca: o-krezolftalein módszer, kat szám: 11489216; alkalikus foszfatáz: p-nitrofenilfoszfát módszer, kat szám: 10816388; anorg. P: foszfomolibdenát redukációs módszer, UV, kat szám: 11489348; koleszterin: CHOD-PAP módszer, kat szám:

12016630; triglicerid: Lipáz/GPO-POP módszer, kat szám: 12016648; HbA_{1c}: Tinaquant DCCT immunturbidimetriás módszer, kat szám: 11822039).

A hormonok és csontmarkerek egy részét a Roche Elecsys 2010-es automatájával mértük elektrochemilumineszcens immunoassay-vel. (Inzulin, kat szám: R12017547; oszteokalcin (N-MID), kat szám: R12149133; beta-crosslaps, kat szám: 11972308; P1NP, kat.szám: R03141071; parathormon, kat.szám: R11972103; DHEAs, kat.szám: R03000087; ösztadiol, kat.szám: R03000079; FSH, kat.szám: R11775863; TSH, kat.szám: R11731459; tesztoszteron, kat.szám: R11776061; C-peptid, kat.szám: R03184897).

A leptin, a rezisztin (kat. szám: RD191001100, illetve RD191016100 BioVendor, Csehország), az adiponektin (kat. szám: K1001-1, B-Bridge, USA), az oszteoprotegerin, katepszin, a sRANKL (kat.szám: BI-20432, BI-20402 illetve BI-20452, Biomedica AG, Ausztria), a TNF- α és a IL-6 (kat.szám: DTA00C illetve D6050, R&D Systems, USA) koncentrációkat ELISA módszerrel határoztuk meg.

A 25-OH Vitamin D₃/D₂ koncentrációt HPLC-vel mértük (kat.szám: 195-6529, BioRad, USA).

Az LDL frakciókat lipoprotein elektroforézissel határoztuk meg (Lipoprint LDL, kat.szám: 48-9152, Quntrimetrix Co.,USA)

A HEK vizsgálatból származtatott adatok:

M1 érték: teljes test glükóz fogyasztása (mg/kg/min)

M2 érték: zsírmentes testtömeg glükóz felhasználása (mg/kg_{izom}/min)

M3 érték: zsírszövet glükóz felhasználása (mg/kg_{zsírszövet}/min)

OGTT vizsgálatból származtatott adatok:

(Glükóz vagy *Inzulin*) AUC_{OGTT} = a po. glükóz terhelés során a görbe alatti terület

A csontsűrűség mérésből származó értékek:

BMD L1-4 (g/cm²): lumbáris csontdenzitás

BMD F (g/cm²): femur nyak csontdenzitás

4.6.2 A kataláz gén +22348C>T (RS769217) plimorfizmusának vizsgálata a 9-es exonban

A polimorfizmus meghatározásához egy egyszerű szűrő módszert használtunk. A polimorfizmust tartalmazó génszakaszt PCR segítségével felsokszorosítottuk, majd a PCR termékeket akril-amid gélen (6%-os) megfuttattuk és ezüstfestéssel tettük láthatóvá. Mivel a kapott PCR fragmentumok a belső hurkoknak köszönhetően nem válnak teljes egészében duplaszálúvá, így denaturálás nélkül is szétválnak az poliakril-amid gélen.

A használt primerek szekvenciái: forward primer: CAT9A: 5'-tggtactgcccttagtcagt-3'; reverse primer: CAT9B: 5'-atctgctccacgtgccctct-3'. A reakcióhoz a Sigma Ready mix reagensét használtuk (Sigma, St. Louis, MO, USA). A PCR reakció körülményei: 5 perc 94°C-on, majd 30 sec 94°C-on, 30 sec 65°C-on, 60 sec 72°C-on, ciklusszám: 30, majd 5 perces inkubáció 72°C-on. A sokorosítást Perkin Elmer DNA Thermal Cycler készülékében végeztük.

4.6.3 A GRB10 gén +11275G>A (RS 2237457) polimorfizmusának vizsgálata a 4-es intronban

A vizsgálathoz target specifikus FRET próbákat használtunk és a Roche LightCycler 2.0 készüléke segítségével detektáltuk. A FRET próbákat és a primereket a Light Cycler Probe Design (Roche) szoftver segítségével terveztük, és a specifitást az NCBI BLAST programja segítségével ellenőriztük le. A primerek és a FRET próbák szekvenciája a következő volt: GRB10 forward primer: 5'-gtcaaagcagcagcaaga-3'; GRB10 reverz primer: 5'-gtgaggctcctgtggac-3'; GRB10-640 próba: 5'-LC640-tgatggccaccgataaccaatgactgca—PH; GRB10-FLU próba: 5'-aaataggcggctctctgtgaaagc—FL.

A primereket 0,4 µM, a próbákat 0,2 µM végső koncentrációban alkalmaztuk. A reakcióhoz Light Cycler FastStart Hybridization Mix-et (Roche) használtuk. A PCR körülmények: denaturálás 10 percig 95°C-on, majd 95°C 10 sec, 52°C 30 sec, 72°C 30 sec, 40 ciklus. Olvadáspont analízis: 45°C-tól 95°C-ig, ramping rate: 0,1°C/sec.

4.7 Differential display

Állatok és sejtkultúrák

A differential display analízishez spontán hipertóniás patkányokat kezeltünk egy gyógyszer jelölt molekulával (Bimoclolol, 20 mg/kg/nap; kezelt csoport) ill. fiziológiás sóoldattal (kontroll csoport) három hónapig. A kezelés letelte után az állatokat elaltattuk, és kivettük a mellkasi aortájukat. Az aortákat azonnal folyékony nitrogénbe helyeztük és -70°C-on tartottuk a további felhasználásig.

A Real-time PCR-al történő megerősítéshez Wistar patkányokat streptozotocinnal kezeltünk a diabétesz kialakulásáig (inzulin hiányos, 1-es típusú diabéteszhez hasonló modell), valamint genetikailag diabéteszes (GK, 2-es típusú diabéteszes modell) patkányokat használtunk. A kezelések letelte után a patkányokat elaltattuk, és különböző szerveiket kivettük, azonnal folyékony nitrogénbe helyeztük és -70°C-on tároltuk a további felhasználásig.

Az L8 myoblast kultúrák differenciálásához (myoblast→myotube) a sejteket először DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) és M199-es tápfolyadékok 4:1 arányú elegyében tenyésztettük 10% lószérum és 1% csirke embrió extraktum jelenlétében. A konfluens sejt kultúrákat 24 lyukú lemezre osztottuk szét (2×10^4 sejt/lyuk) és a tápfolyadékot DMEM-re illetve HDMEM-re (magas, 25 mM glükóz tartalmú DMEM) cseréltük, és szérum deprivációt alkalmazva (2% magzati borjú szérummal, FCS)) differenciáltattuk a sejteket. A tápfolyadékot minden harmadik nap frissre cseréltük. A differenciálást több mint két hétig folytattuk. A sejteket akkor használtuk, amikor a mikroszkópos vizuális értékelés után myotuboknak ítéltük meg.

RNS izolálás

Az RNS izolálást a Sigma TRI (T9424) reagensével végeztük, a kapott total RNS minták épségét formaldehid/agaróz gél elektroforézissel ellenőriztük. Az RNS koncentrációját spektrofotometriásan határoztuk meg a 260 nm-en mért elnyelésből. A Real-time PCR reakciókhoz szükséges RNS-t a Qiagen RNeasy Mini Kit-jével tisztítottuk tovább és a koncentrációját a Molecular Probes Ribo Green Kit-jével határoztuk meg fluoreszcencián.

A differential display-hez használt oligonukleotidok

A teljes mRNS populáció átírásához poly-T primereket alkalmaztunk (5'-T₁₂VA-3', 5'-T₁₂VC-3', 5'-T₁₂VG-3' and 5'-T₁₂VT-3'), ahol V lehet egyaránt C, G, A vagy T. A reverz transzkripciót követő PCR-hoz ugyanezen anchor primereket használtuk, valamint 20 olyan arbitrális primert, amelynek a hossza 10 bázispár volt, a szekvenciája pedig random, a GC% ≥ 40 .

ARB1: 5'-gaggcccttc-3'; *ARB2*: 5'-tgccgagctg-3'; *ARB3*: 5'-agtcagccac-3'; *ARB4*: 5'-aatcgggctg-3'; *ARB5*: 5'-aggggtcttg-3'; *ARB6*: 5'-ggtcctgac-3'; *ARB7*: 5'-gaaacgggtg-3', *ARB8*: 5'-gtgacgtagg-3'; *ARB9*: 5'-gggtaacgcc-3'; *ARB10*: 5'-gtgatcgac-3'; *ARB11*: 5'-ccatcgccgt-3'; *ARB12*: 5'-tcggcgatag-3'; *ARB13*: 5'-cagcaccac-3'; *ARB14*: 5'-tctgtgctgg-3'; *ARB15*: 5'-ttccgaacc-3'; *ARB16*: 5'-agccagcgaa-3'; *ARB17*: 5'-gaccgcttg-3'; *ARB18*: 5'-aggtgaccgt-3'; *ARB19*: 5'-caaacgtcgg-3'; *ARB20*: 5'-gttgcatcc-3'. A primereket a DNA Technology (Aarhus, Denmark) szintetizálta.

Reverz transzkripció

A reverz transzkripcióhoz 1 μ g total RNS-t mértünk be minden egyes mintából, amihez hozzáadtunk 2 μ l anchor primert (25 μ M) és 4,5 μ l DEPC-vel (Diethyl pyrocarbonate) kezelt vizet, 65°C-on 10 percig inkubáltuk, majd a hőmérsékletet levittük

37°C-ra és tovább inkubáltuk 10 percig. Ezután hozzáadtunk mindegyik csőhöz 12,5 µl RT-mixet (4,0 µl 5xRT puffer, 2,0 µl DTT (dithiothreitol, 100 mM), 5,0 µl Rnáz inhibitor (10 U/µl), 1 µl reverz transzkriptáz (M-MLV, Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, 200 U/µl)). A mintákat összekevertük és 35°C-on 60 percig inkubáltuk. A reakciót a minták 95 °C-ra való melegítéssel állítottuk le (10 perc). Ezután a mintákat azonnal olvadó jég közé helyeztük, majd lecentrifugáltuk. Az így kapott cDNS mintákat vagy azonnal használtuk a további PCR reakciókhoz, vagy –20°C-on tároltuk további felhasználásig.

A cDNS minták PCR amplifikációja

A PCR mix (teljes térfogat 20 µl) tartalmazott 2 µl cDNS-t, 2 µl 10xPCR puffert, 1,5 mM MgCl₂-t, 2,5 µM d NTP-t, 2,5 µM anchor primert, 2,5 µM arbitrális primert, 0,5 µCi/µl ³⁵S-dATP-t (>1000 Ci/mmol), 1 U/µl Taq-polimerázt. A PCR reakció 40 ciklusból állt, 94°C 30 sec, 40°C 2 perc, 72°C 30 sec. A PCR ciklus végén a mintákat további 5 percig 72°C-on inkubáltuk. A PCR reakciók száma összesen 160 volt, 4 különböző anchor primerrel kapott cDNS a kezelt és kezeletlen mintából, kombinálva a 20 különböző arbitrális primerrel.

A felsokszorosított PCR minták szétválasztása

A kapott PCR termékeket 6%-os denaturáló poliakril-amid gélen választottuk szét, egymás mellé helyezve az ugyanazon anchor és arbitrális primerrel készült kezelt és nem kezelt mintákat. A szétválasztás végén a géleket szűrőpapírra helyezve megszáritottuk. A száraz gélek fölé röntgen filmet helyeztünk, és 2-3 napig –70°C-on exponáltuk. A filmek előhívása után a kapott csíkokat analizáltuk. A „differenciálisan expresszáldott” csíkokat megjelöltük, meghatároztuk az expresszió irányát (up és down). A röntgen filmet fölé helyeztük az eredeti gélnek és a gélen is bejelöltük azokat a csíkokat, amelyeket további vizsgálatainkra használtunk.

A DNS minták izolálása és újrasokszorosítása

A gélekről kivágtuk azon DNS csíkokat, amelyeket a továbbiakban használni kívántunk. Ezeket 100 µl desztillált vízben 95°C-on 10 percig főztük, a gél darabot és a szűrőpapírt kivettük a csőből, majd az így oldatba került DNS-t nátrium-acetát (3 mM, pH: 5,2) és glikogén (10 mg/l) jelenlétében tömény etanollal –70°C-on precipitáltattuk. Precipitálás után a mintákat 20 percig 13000 rpm-en centrifugáltuk, a felülúszót eltávolítottuk, és a kapott DNS mintákat desztillált vízben (10 µl) visszaoldottuk és ezt használtuk az újrasokszorozáshoz. A PCR körülmények és a használt primer kombináció

ugyanaz volt, mint amivel az első PCR terméket kaptuk, kivéve, hogy itt már nem használtunk izotóppal jelzett dATP-t. Sikeres reamplifikáció után a kapott PCR terméket plazmid vektorba klónoztuk.

PCR termékek klónozása

A PCR termékeket módosított pBluescript vektorba klónoztuk. A módosított pBluescript-TA vektort pBluescript vektorból készítettük. A vektort EcoRV restriktions enzimmel hasítottuk (5 óra, 37°C) majd 10XPCR pufferrel kevertük össze (1X végső) majd dTTP-t adtunk hozzá 2 mM végső koncentrációban és 10 U Taq-polimerázt. Az elegyet 2 órán át 70°C-on inkubáltuk. A reakciót 200 µl végső koncentrációban végeztük. A módosított plazmid DNS-t fenol-kloroform eleggyel extraháltuk, etanollal precipitáltattuk, majd desztillált vízben visszaoldottuk. Az így kapott plazmid DNS-t használtuk a ligálási reakcióban, a plazmid:inert arány 1:3 volt. A helyes arány beállításához mind a plazmid, mind az inertiállandó DNS aliquot részét agaróz gélen megfuttattuk, etidium bromiddal festettük, és a kapott kép alapján megbecsültük a bemérendő mennyiségeket. A ligálási reakcióhoz 1 U T4-DNS ligázt használtunk 10 µl végső koncentrációban. A kompetens baktérium sejtek (INV-α) transzformálását és a rekombináns kolóniák szelekcióját, majd a plazmid DNS kinyerését standard módszer szerint végeztük (48).

Szekvencia analízis és homológia keresés

A szekvencia analízist a Szegedi Biológiai Kutatóközpontban végezték, az ABI PRISM szekvenátoron a T7-es szekvenáló primer segítségével.

A homológia keresést és a DNS szekvenciák beazonosítását a BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) program segítségével végeztük (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Oligonukleotidok tervezése a differenciált expresszió visszaigazolására a real-time PCR-hoz

A real-time PCR-al végzett visszaigazoláshoz az oligonukleotidokat és a TaqMan próbákat az Applied Biosystems Primer Express szoftverével terveztük az ingyenesen elérhető DNS adatbázisok alapján. A gén expressziók mértékét belső kontrollhoz történt normalizálás elvégzése után számítottuk ki. Belső kontrollként két gén alkalmaztunk (36B4 és cyclophyllin). A target specifikus próbákat reporter fluoreszcens festékkel (FAM, 6-carboxyfluorescein) jelöltük az 5' végen, míg kioltó fluoreszcens festékkel (TAMRA, 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) a 3' végükön, a normalizáláshoz használt

próbákat (36B4 illetve cyclophyllin) VIC illetve HEX riporter festékekkel jelöltük. A visszaigazoláshoz használt primerek és próbák szekvenciáit a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat A differential display eredményének ellenőrzéséhez használt primerek és próbák szekvenciája

GRB10	Forward primer	5'-ccaagaggccatcttagaacttc-3'
	TaqMan próba	5'-FAM-tctccacaagaatgcatcacctgc-TAMRA-3'
	Reverz primer	5'-aagcatgtaagtggccctgactac-3'
ATP-E	Forward primer	5'-ttcaggtctctccgctcatc-3'
	TaqMan próba	5'-FAM-cggtactccgctctgatcctcggc-TAMRA-3'
	Reverz primer	5'-gcttggcggcctatgc-3'
Capping	Forward primer	5'-tcaccgtggaggtcaacttg-3'
	TaqMan próba	5'-FAM-ccagcggcctactgccca-TAMRA-3'
	Reverz primer	5'-gtggtggaagtgcaggag-3'
36B4	Forward primer	5'-agatgcagcagatccgcat-3'
	TaqMan próba	5'-VIC-aggtgtggtgctgatgggcaaga-TAMRA-3'
	Reverz primer	5'-ggatggccttgca-3'
Cycloph.	Forward primer	5'-ctgatggcagcccttg-3'
	TaqMan próba	5'-HEX-cgcgtctgcttcgagctgttgca-TAMRA-3'
	Reverz primer	5'-tctgctctttggaacttgc-3'

Reverz transzkripció és a real-time PCR körülményei

A reverz transzkripciót és a PCR-t az Applied Biosystem TaqMan® Gold RT-PCR Kit-jével végeztük. A reakció csövekbe bemértünk (10 µl végső térfogatban) 1XTaqMan RT puffert, 5,5 mM MgCl₂-t, 500 µM dATP-t, dCTP-t, dGTP-t és dUTP-t, 2,5 µM random hexamert, 0,4 U/µl Rnáz inhibitort és 1,25 U/µl Multiscribe reverz transzkriptázt. A csöveket először 10 percig 25°C-on, majd 48°C-on 30 percig inkubáltuk. A reakciót 5 perces 95°C-on történő inkubálással állítottuk le.

A reverz transzkripció után a kapott elegyet 3,3-szeresére hígítottuk nukleáz mentes desztillált vízzel. 6,7 µl hígított cDNS-t használtunk minden egyes PCR-hoz. A PCR mix végső koncentrációban (25 µl végső térfogatban) 1XTaqMan reakciós mix-et, 400 nM primert és 200 nM TaqMan próbát tartalmazott. A PCR körülmények a következők

voltak: 10 perc 95°C-on, majd ezt követte 40 ciklus, mely a következő lépésekből állt: 15 sec 95°C-on és 1 perc 60°C-on. A reakciót az Applied Biosystem ABI 7000 Sequence Detector-ával végeztük. A küszöbértéket (C_t) az ABI Prism 7000 SDS szoftverével határoztuk meg. A gén expresszió változásának nagyságát (fold change) a vizsgálandó génre az alábbi képlet segítségével határoztuk meg:

$$\text{Változás mértéke} = 2^{-\Delta(\Delta C_t)},$$

$$\text{ahol: } \Delta(\Delta C_t) = \Delta C_{t,\text{kezelt}} - \Delta C_{t,\text{kontroll}}$$

$$\Delta C_t = C_{t,\text{target}} - C_{t,\text{normalizáló}},$$

$C_{t,\text{target}}$: a vizsgálandó gén küszöbértéke, $C_{t,\text{normalizáló}}$: a normalizáló gén küszöbértéke ugyanazon mintában

$\Delta C_{t,\text{kezelt}}$: a kezelt mintában az adott gén expressziója a normalizáló génhez viszonyítva

$\Delta C_{t,\text{kontroll}}$: a kontroll mintában az adott gén expressziója a normalizáló génhez viszonyítva

4.8 Statisztikai analízisek

A referens értékek kiszámításánál az eloszlás vizsgálatokat Kolgomorov-Smirnov teszttel végeztük SPSS számítógépes program segítségével.

A csoportok közötti különbségeket (nők-férfiak, egészséges kontroll-beteg, genotípus stb.) Student féle kétmintás t teszt segítségével végeztük (MS Excel).

Az allél frekvenciák különbségét χ^2 teszt elvégzésével illetve az Odds arány (www.meta-numerics.net/Samples/ContingencyCalculator.aspx) kiszámításával jellemeztük.

Az anyagcsere-, a metabolikus-, az antropometrikus paraméterek egymáshoz viszonyított korrelációját egyváltozós lineáris korrelációs analízissel (MS Excel), többváltozós lineáris regresszióval és Spearman féle rangkorrelációs analízissel állapítottuk meg (STATISTICA Trial Version 2010, StatSoft Inc.). A szignifikancia szintet általánosságban $p < 0,05$ szinten állapítottuk meg.

5. EREDMÉNYEK

5.1 Vér katalázaktivitás referens tartományának meghatározása

A humán vörösvértestek nagy mennyiségben tartalmaznak kataláz enzimet, a vér kataláz mennyiségének a 99%-a a vörösvértestekből származik. A hipokatalázémia és az akatalázémia definiálásához szükséges volt a vér katalázaktivitás referens tartományának a meghatározása az általunk vizsgált geográfiai területen.

A definíció szerint 1 egység kataláz 1 μmol hidrogén peroxidot bont le egy perc alatt, 1 liter teljes vérre vonatkoztatva. A katalázaktivitást egyszerű spektrofotometriás assay-vel mértük, hidrogén-peroxid szubsztrát időegység allatti koncentráció csökkenéséből (47).

A módszer intra-assay variációs koefficiense 3,1%, míg az inter-assay reprodukálhatósága 5,1% volt.

Megvizsgálva az összes referens egyén (férfiak+nők) aktivitás értékének eloszlását, azt találtuk, hogy ezek nem normál eloszlásúak (Kolgomorov-Smirnov próba). A referens egyének esetében az átlag aktivitás 113,3 MU/l, a referens tartomány pedig $\pm 1,96$ SD-ben kifejezve 81,0–145,6 MU/l, 2,5–50–97,5%-os percentilisben kifejezve 81,4–113,5–145,1 MU/l (54).

Ha az aktivitás értékeket alcsoportokra osztottuk (férfiak és nők), akkor azok már a Gauss féle normál eloszlást mutatták.

Annak eldöntésére, hogy szükséges-e külön referens értéket meghatározni a nők és férfiak részére, megvizsgáltuk az alsó és felső referens határ alatti és feletti adatok számát (48).

A férfi alsó referens határ (2,5%-os percentilis: 85,3 MU/l) alatt 113 (22 férfi és 91 nő) vér kataláz aktivitás volt, ez az összes adat 7,2%-a, amely több mint a kritikus érték (4,1%). A női felső referens határ (97,5%-os percentilis: 134,7 MU/l) felett 140 (22 nő és 118 férfi) érték volt, ami az összes adat 7,9%-a, ami szintén magasabb mint a kritikus 4,1%. Ezek alapján megállapítottuk, hogy külön referens tartomány szükséges a nők és a férfiak részére.

A nőknél szignifikánsan ($p < 0,001$) alacsonyabb értékeket ($107,7 \pm 14,4$ MU/l) kaptunk, mint a férfiak esetében ($117,9 \pm 16,9$ MU/l). Ha azonban az aktivitásokat a hemoglobin koncentrációra vonatkoztattuk, ez a szignifikáns különbség eltűnt ($0,849 \pm 0,119$ MU/g férfiaknál, $0,841 \pm 0,107$ MU/g a nőknél). A nők alacsonyabb katalázaktivitása a

periodikus vérvesztésükből származó alacsonyabb vörösvértestszámmal magyarázható, amit az is alátámaszt, hogy a kataláz/hemoglobin arányuk azonos a férfiakéval, és a menopausa után a nők katalázaktivitása kisebb mértékben csökken (47).

Az életkor hatása, ha csekély mértékben is, de megmutatkozik a férfiaknál és nőknél egyaránt, de különbözően változik az életkor függvényében. A nőknél a változás az $y = -0,016x + 108,7$, míg a férfiaknál az $y = -0,084x + 122,3$ egyenlettel írható le, ahol y : a vér katalázaktivitása (MU/l), x : az életkor (év).

Ha a változást a csoport átlagok (az adatok életkor szerint csoportosítva 10 évenkénti osztásban) alapján vizsgáljuk, akkor mindkét nemnél csökkenést tapasztalunk az életkorral (férfiaknál $m = -0,088$, nőknél $m = -0,024$), azonban a csökkenés egyik nemnél sem szignifikáns, de a férfiaknál szorosabb korrelációt eredményez (férfi $r: -0,897$ vs. nő $r: -0,481$).

Az IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory) ajánlását ($x \pm 1,96SD$, percentilis) is figyelembe véve a következő referens értékeket adtuk meg a vér katalázaktivitásokra (4. táblázat) (55).

4. táblázat A vér katalázaktivitás referens tartománya az IFCC ajánlások alapján

Aktivitás (MU/l)	Férfiak			Nők		
	Alsó határ	Középérték	Felső határ	Alsó határ	Középérték	Felső határ
X ± 1,96 SD	84,9	117,9	150,8	79,5	107,7	135,9
Percentilis 2,5-97,5%	85,3	119,3	151,5	78,5	107,5	134,7

Hipokatalázémiásnak tekintettük azokat az egyéneket, ahol a katalázaktivitás a referens tartományához viszonyítva 50 %-al csökkent.

A 3300 egészséges egyén közül 6 olyan személyt találtunk, akiknél katalázaktivitás csökkenését tudtuk detektálni. Az 1630 kórházi beteg közül három bizonyult csökkent aktivitásúnak, így összesen 9 személyt regisztráltunk. Mind a 9 személy más-más családhoz tartozott, így összesen 9 családot tudtunk hipokatalázémiás családnak minősíteni. A családok tagjai között 37 személy volt hipokatalázémiás ($57,5 \pm 11,7$ MU/l), míg 47 személy normokatalázémiás ($98,6 \pm 17,9$ MU/l) volt. Az egyik családból két testvér katalázaktivitás szintje 4,0 illetve 6,7 % volt a referens

tartományhoz viszonyítva, így őket akatalázémiásként minősítettük. A katalázaktivitás csökkenés autoszomális, recesszív öröklődési mechanizmust mutatott.

A hipokatalázémia gyakorisága 0,18 %, ami hasonló a Japánban és Koreában tapasztalttal, de kevesebb, mint az Iránban mért 5% (47).

5.2 Vér kataláz enzim hiány genetikai jellemzése

5.2.1 Az ismert polimorfizmusok vizsgálata a magyarországi akatalázémiás és hipokatalázémiás betegekben

A hipokatalázémiás családok felkutatása után és az irodalmi adatok alapján nyilvánvaló volt, hogy a katalázaktivitás csökkenése genetikai okokra vezethető vissza, ezen belül is egy autoszomális, recesszív öröklődési folyamatra. Az irodalomból ismert, hogy a svájci típusú akatalázémiát egy pontmutáció okozza, ami bizonyos aminosavak cseréjét eredményezi. A protein gyorsan degradálódik és a normálistól eltérő elektroforetikus mobilitást okoz (56, 57). A japán típusú akatalázémia ezzel szemben nem mutat semmilyen különbséget a protein összetételben, illetve molekula nagyságban a normál eritrocita katalázhoz viszonyítva (58). A japánok az akatalázémiás személyeknél két pontmutációt találtak (15).

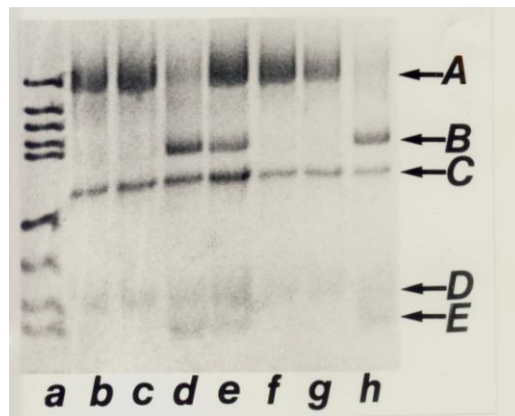
Az egyik egy A→T szubsztitúció a -21-es pozícióban a promoter régióban, amikor is az A nukleotidnak a cseréje megszüntet egy Hinfl (GANTC) hasítási helyet. Ez a mutáció egy japán akatalázémiás betegben volt megtalálható. A másik szubsztitúció a G→A átmenet, a 4-es intron 5. pozíciójában, amit három egyénben tudtak kimutatni a 90 akatalázémiás japán személy közül. (19, 59).

A Magyarországon megtalált két akatalázémiás testvér (60, 62) kataláz proteinje biokémiai jellemzők (molekulasúly, elektroforetikus mobilitás) alapján a japán típushoz volt hasonló és nem a svájcihoz. Ezért az akatalázémiás és hipokatalázémiás egyének genetikai jellemzését először az ismert japán mutációk vizsgálatával kezdtük. A G→A mutációt nem találtunk a magyarországi hipo és akatalázémiás egyéneknél (61), így második lépésként a promoter régió -21-es pozíciójában lévő A→T mutációt vizsgáltuk.

A kataláz génnek egy 249 bp hosszúságú régióján végeztünk PCR amplifikációt, amely magában foglalt 163 bp-t az upstream régióból, 66 bp-t az 1. exonból és 20 bp-t az 1. intronból. A kapott PCR terméket Hinfl restrikciós enzimmel emésztettük és elektroforetikusán szétválasztottuk, majd detektáltuk.

Összesen 87 mintát vizsgáltunk, ebből 52 személy volt hipokatalázémiás, 35 személy pedig normokatalázémiás kontroll. A számítások szerint a nem mutáns allélt a Hinfl

enzim két szakaszra vágta volna szét (GACTC), egy 176 bp-os, illetve egy 73 bp-os szakaszra, míg a mutáns allél esetében (A→T szubsztitúció, GTCTC)) az enzim nem tudta volna vágni a terméket. Így olyan mintázatokra számítottunk, amelyben 249, 176, illetve 73 bp-os termékek vannak. Ezzel szemben olyan mintázatokot kaptunk, ahol a várt termékek mellett megjelent egy 158 és egy 91 bp nagyságú termék is minden vizsgált egyén esetében.



5. ábra A kataláz gén promoter régiójának HinFI polimorfizmusa

(A:249 bp, B:176 bp, C:158 bp, D:91 bp, E:73 bp; a:molekulasúly marker; b, c, d: hipokatalázémiás, e,f,g,h: kontroll egyén). A várható termékek nagysága: 249,176,73 bp, a 158 bp-os és 91-bp-os (C és D) termék a HinFI restrikciós enzim sztáraktivitásából származik.

A két, nem várt termék feltételezéseink szerint ez a HinFI restrikciós enzim „star” aktivitásából származott, amit a szekvenálási adataink bizonyítottak is, ugyanis a -4-0 pozícióban GATTT szekvencia található, amit a HinFI enzim a „star” aktivitása miatt vágni tud.

A vizsgált HinFI polimorfizmus (GACTC) megoszlása a következő volt: 8 esetben mindkét allélt (8%), 36 esetben egyiket sem (41,3%) és 43 esetben csak az egyik allélt vágta az enzim (49,5%). Ez a nagyszámú mutáció váratlan eredmény volt számunkra, azonban az elvégzett szekvencia analízis erre is választ adott (2 akatalázémiás, 17 hipokatalázémiás és 16 normokatalázémiás kontroll), ugyanis az analízis során három pontmutációt fedezhettünk fel a HinFI vágási helyén. C→T mutáció a -18-as pozícióban, egy C→A mutáció a -20-as pozícióban, és az ismert A→T mutáció a -21-es pozícióban. A -18-as pozícióban lévő C →T mutáció eredményeképpen a HinFI restrikciós enzim felismerési helye megszűnik, így az enzim nem képes vágni, ami viszont ugyanazt eredményezi, mintha a -21-es pozícióban lett volna mutáció. A -20-as helyen lévő C→A mutáció nincs hatással az enzim felismerő helyére, mivel az a variábilis nukleotidot

érinti. A három lehetséges mutáció okozta vágási kombinációkat az 5. táblázat szemlélteti.

5. táblázat A kataláz gén promoter régiójában található HinfI restrikciós enzim vágási kombinációi

pozíció	-27	-26	-25	-24	-23	-22	-21	-20	-19	-18	-17	-16	-15	-14	-13	mintázat		
HinfI rest. enzim felismerő helye						g	a	n	t	c						eredmény	normál aktivitás	szár aktivitás
vad típus	g	c	c	c	c	g	a	c	t	c	c	g	t	g	g	az enzim vág	176 bp és 73 bp	158 bp és 91 bp
-21 A>T mutáció	g	c	c	c	c	g	t	c	t	c	c	g	t	g	g	az enzim nem vág	249 bp	158 bp és 91 bp
-20 C>A mutáció	g	c	c	c	c	g	a	a	t	c	c	g	t	g	g	az enzim vág	176 bp és 73 bp	158 bp és 91 bp
-18 C>T mutáció	g	c	c	c	c	g	a	c	t	t	c	g	t	g	g	az enzim nem vág	249 bp	158 bp és 91 bp

A szekvenált mutációk allél frekvenciáit az akatalázémiás, hipokatalázémiás és a normokatalázémiás páciensek esetében a 6. táblázat tartalmazza.

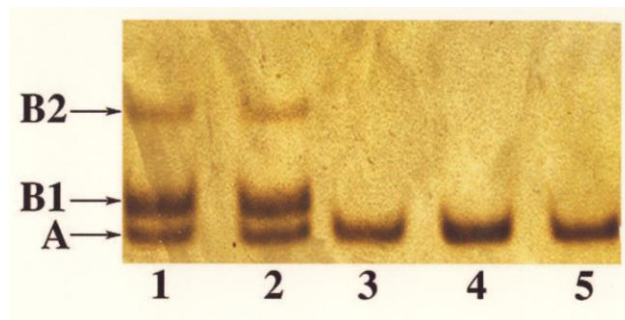
6. táblázat A kataláz gén magyarországi HinfI polimorfizmusa
(2 akatalázémiás, 17 hipokatalázémiás és 16 normokatalázémiás kontroll)

Pozíció	Típus	Nukleotid	Az allélok száma		Összesen
			Hipokatalázémiás	Kontroll	
-21	vad	A	2	14	16
	mutáns	T	36	18	54
-20	vad	C	35	32	67
	mutáns	A	3	-	3
-18	vad	C	20	20	40
	mutáns	T	18	12	30

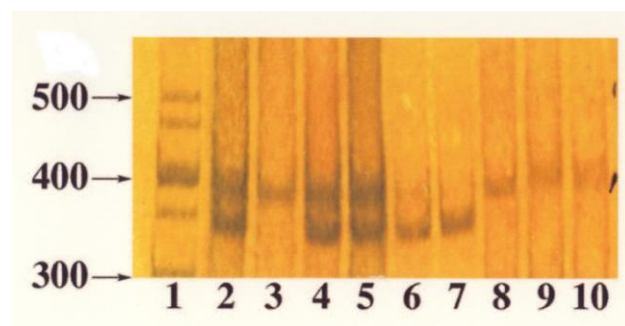
Az A→T mutáció a hipokatalázémiás egyéneknél szignifikánsan ($p < 0,001$) magasabb volt, mint a normokatalázémiás betegeknél (2/36 vs. 14/18). Ez a mutáció megegyezik a japánban találtakkal, és a Magyarországon megtalált két akatalázémiás testvér is homozigóta mutáns. Ez a mutáció azonban megtalálható a kontroll csoportban is. A két újonnan megtalált mutáció közül az egyik alacsony (-20 C→A, 3/35) allél frekvenciát mutat a hipokatalázémiás egyéneknél, míg a másiknak az allél frekvenciája a kontroll csoportban magas (-18 C→T, 20/12).

5.2.2 A kataláz gén polimorfizmusai és a 2-es típusú diabétesz közötti kapcsolat

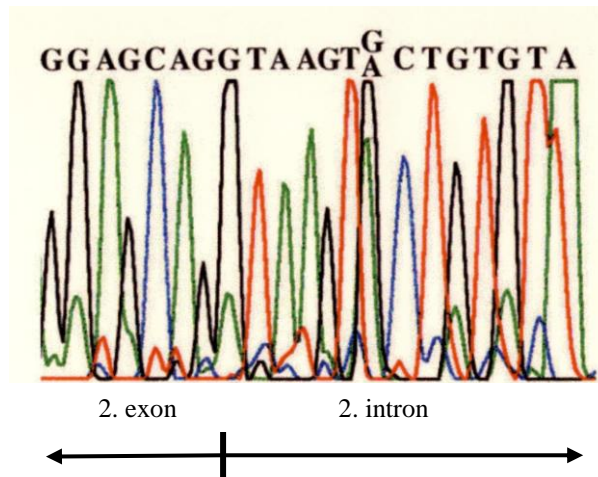
Az öröklött kataláz enzim hiány és a 2-es típusú diabétesz kialakulására közötti kapcsolatot Magyarországon írták le először. (63). Az addig feltérképezett családok tagjai közül 63 volt hipokatalázémiás (heterozigóta) és kettő akatalázémiás (homozigóta), míg 66 személy normokatalázémiás volt. A csökkent katalázaktivitású személyek közül 8 volt diabéteszes (12,3 %), ezzel szemben a normál katalázaktivitással rendelkező személyek közül egy sem volt diabéteszes. A kettő akatalázémiás és 6 hipokatalázémiás egyénnek 2-es típusú diabétesze volt. Ezek a tények szolgáltatták azt az ötletet, hogy nézzük meg az eddig ismertté vált kataláz polimorfizmusok (64, 65, 66, 67, 68) előfordulási gyakoriságát diabéteszes populációkban. A vizsgálatainkat a kataláz gén 2. exonjára és közvetlen környezetére fókuszáltuk, és egyszálú konformációs polimorfizmus (SSCP) analízist végeztünk és a GA illetve G inzerciót kerestük a 2-es exonban PCR heteroduplex módszerrel.



6. ábra PCR heteroduplex mutáció szűrés (GA inzerció) a kataláz gén 2-es exonjában (A: vad-vad [268 bp] homoduplex, B1 és B2 vad-mutáns [273 bp és 304 bp] heteroduplex; 1: heteroduplex kontroll, 2: heteroduplex diabéteszes páciens, 3-5 homoduplex diabéteszes páciens)



7. ábra PCR - SSCP mutáció szűrés a kataláz gén 2-es exonjában (1: molekulaszúly marker; 2, 4-7: diabéteszes beteg polimorfizmussal; 3,8-10: diabéteszes beteg polimorfizmus nélkül)



8. ábra Nukleotid szekvencia analízis a kataláz gén 2-es intronjában
(G→A szubsztitúció a hetes pozícióban)

A 308 diabéteszes beteg között az SSCP analízis 18 egyén esetében mutatott polimorfizmust (5,8%). A szekvencia analízis ebből megerősített 2 mutációt (két személy) a 2. intronban, egy mutációt az 1. intronban (2 személy), 2 missense mutációt (2 személy) a 2. exonban. 12 mutációt a szekvencia analízis nem erősített meg. A PCR heteroduplex módszer 5 személy (1,6 %) esetében mutatott polimorfizmust. Ebből szekvencia analízissel 3 személynél tudtuk a GA inzerciót (~1%) és 2 beteg esetében a G inzerciót (~0.6%) megerősíteni. Tehát a nukleotid szekvencia analízis 7 mutációt erősített meg 11 betegnél. A 308 diabéteszes beteg közül tehát 11 személynél találtunk mutációt, ami 3,57%-nak felel meg és a mutációk allél frekvenciája 1,78% volt. A kontroll csoportban nem detektáltunk mutációt.

Az SSCP és PCR heteroduplex mutáció analízis részletes eredményét a 7. táblázat tartalmazza. A mutációk összefüggést mutattak a csökkent katalázaktivitással (44,5-93,8%). A 11 heterozigóta egyén katalázaktivitás értéke szintén a 7. táblázatban látható.

7. táblázat A PCR hetroduplex és a PCR SSCP szűrés eredménye a kataláz gén 2-es exonjának és intronjának a határán

Pozíció (bp)	Mut.	Típus	Allél fr. (%)	Aminosav	Kat. akt. (MU/l)	%	Hiv.
1.intron (60)	G> T	Szubsztitúció	0,32		100,3	93,8	21
					90,9	79,7	
2.intron (7)	G> A	Szubsztitúció	0,16		81,5	71,0	21
2.intron (5)	G >C	Szubsztitúció	0,16		70,3	62,0	21
2.exon (96)	T> G	Missense	0,16	53 Asp →Glu	60,3	53,2	21
2.exon (135)	G> C	Missense	0,16	67 Glu →Asp	58,9	52,1	21
2.exon (138)	GA inz.	Frameshift	0,48	69 Ile →Glu	52,3	46,2	65
					60,3	63,2	
					61,2	54,0	
2.exon (79)	G inz.	Frameshift	0,32	48 Pro→ Ala	58,4	51,5	67
					50,4	44,5	

Szignifikáns eltérés volt a mutációk allél frekvenciájában a diabéteszes és a kontroll csoport között. (11/616 vs. 0/240).

Szignifikáns eltérés volt a katalázaktivásban a mutáns személyek ($68,1 \pm 17,4$ MU/l, n=11) és az összes diabéteszes ($90,5 \pm 16,9$ MU/l, n=308) személyek között ($p < 0,001$).

Hasonló aktivitás csökkenés ($p < 0,001$) volt a diabéteszes csoport ($90,5 \pm 16,9$ MU/l, n=308) és az egészséges kontroll ($103,8 \pm 17,5$ MU/l, n=120) csoport között.

A 2. intron 5-ös pozícióban lévő G→C szubsztitúció katalázaktivitás csökkenést eredményezett (70,3 vs. 113,0 MU/l), és ez feltételezhetően egy exon kivágási hibának köszönhető.

A másik mutáció által okozott (2. intron (7)) aktivitás csökkenés nem mondható szignifikáns katalázaktivitás csökkenésnek, ugyanis ez az érték (81,5 MU/l) a referens tartomány alsó részében van (80,3-146,3 MU/l).

Az 1. intron 60-as pozíciójában lévő újonnan felfedezett G→C mutáció két páciens esetében jelent meg, de nem okozott szignifikáns katalázaktivitás csökkenést (100,3 illetve 90,9 MU/l). Mivel ez a mutáció az intronon helyezkedik el és nem okoz aktivitás csökkenést, ezt úgy tekintjük, mint a kataláz gén egy benignus polimorfizmusát.

A szintén újonnan detektált, a 2. exonban lévő T→G (96-os pozíció) és a G→C (135-ös pozíció) missense mutációk megváltoztatják az adott helyen lévő aminosavat. Az 53-as aminosav pozícióban az aszparagin helyett glutamin lesz, míg a 67-es aminosav pozícióban glutamin helyett cisztein. A kataláz enzim amino terminális doménjának van egy 75 aminosavból álló része, ami a központi régiójából karként nyúlik ki. Ez a kar két hélixből áll, és mindkét hélix részt vesz az alegységek egymás közötti kapcsolatában. A második hélix számos aminosavja (Val44, Arg 72, Val 74 és His 75) nagyon fontos a hem-protein megkötésében. A két újonnan detektált missense mutáció (53-as és 67-es aminosav pozíció) nagyon közel van ehhez a szakaszhoz, ezért ezek az aminosav szubsztitúciók katalázaktivitás csökkenést eredményezhetnek. Ez a krónikus csökkenés az enzimaktivásban folyamatos hidrogén-peroxid koncentrációemelkedést okoz, ami hozzájárulhat a 2-es típusú diabétesz kialakulásához (2).

A PCR heteroduplex analízissel kiszűrt két frameshift mutáció (GA illetve G inzerció az 2-es exonban) stop kodon beépülését okozza a 134-es, illetve 57-es aminosav pozícióban az 517-es pozíció helyett, így trunkált kataláz proteinek keletkeznek, amelyek felelősek lehetnek a csökkent katalázaktivitásért.

5.2.3 A kataláz gén +22348C>T polimorfizmusa és oszteoporózis kapcsolata

A kataláz gén +22348C>T polimorfizmusának a csontállapotra, az anyagcsere állapotra gyakorolt hatását vizsgáltuk, ezért a vizsgált populáció az egészségestől a prediabéteszen át a kezelést még nem igénylő 2DM-ig átívelő betegekből állt, így kiküszöböltük a súlyosabb 2DM másodlagos anyagcsere hatásait. A vizsgálatot a hiperinzulinémiás-euglikémiás klempe (HEK) technikával karakterizált anyagcsere mutatójú egyének DNS mintáiból végeztük. A vizsgálatban résztvevő egyének száma és azok nem szerinti megoszlása a 2. táblázatban látható.

A vizsgált populáció allél gyakorisága összességében és nemeken belül is eleget tesz a Hardy-Weinberg egyensúlynak. Az egyes csoportok allél frekvenciái és a Hardy-Weinberg egyensúlyt reprezentáló χ^2 próba eredménye az 8. táblázatban látható.

8. táblázat A genotípus megoszlások a nemeken belül a kataláz gén +22348C>T polimorfizmusának vizsgálatakor

	Genotípus			Allél frekvencia		χ^2
	CC	CT	TT	C	T	
Összes	90	41	10	0,78	0,22	2,857
Férfi	61	24	5	0,81	0,19	1,515
Nő	29	17	5	0,74	0,26	1,053

A nemek közötti allél frekvenciák eltérésének szignifikanciáját az Odds arány és a χ^2 próba segítségével jellemeztük. Mind az Odds arány, mind a χ^2 próba eredménye azt mutatja, hogy az allél frekvenciákban nemek között nincs szignifikáns eltérés (9. táblázat).

9. táblázat A nemek közötti genotípus és allél frekvencia gyakoriságok vizsgálata (Odds arány és χ^2 próba)

Genotípus	Férfi	Nő	OR	C.I.(95%)	χ^2	p
CC	61	29	2,10	0,56-7,84	1,267	0,7398
CT	24	17	1,41	0,35-5,65	0,2389	0,3749
TT	5	5	1	-		
C allél	146	75	1,48	0,79-2,75	1,529	0,783
T allél	29	22	1	-		

A genotípusok hatását vizsgáltuk az antropometrikus és biokémia adatokra. A csont és az energia-háztartás közötti kapcsolatokat nemeken belül is elemeztük, hiszen köztudott, hogy a csontmetabolizmusra és az energia háztartásra egyaránt jelentős befolyással bíró nemi hormonok, adipokinek koncentrációja nemekre jellemzően változik. Az értékeléskor a T allél szerepét vizsgáltuk.

A 10. táblázatban azokat a biokémiai és antropometrikus adatokat tüntettük fel, ahol a nemek együttes értéklésekor szignifikáns illetve jelzetten eltérő különbséget kaptunk a genotípusok között.

A 11. táblázat pedig azokat a szignifikáns illetve jelzetten eltérő adatokat tartalmazza, amelyeknél már nemek szerinti elkülönítést is végeztünk.

10. táblázat A kataláz gén +22348C>T polimorfizmusának összefüggése az antropometrikus és biokémiai paraméterekkel nemek együttes értékelésekor (átlag ± SD)

(HOMA-IR: [éhomei glükóz mmol/l x éhomei inzulin uE/ml]/ 22,5; szignifikancia szintek: összes CC vs. CT+TT *=p<0,05)

Genotípus	CC	CT+TT
N	90	51
Életkor (év)	39 ± 13	42 ± 12
Inzulin 0. perc _{ivGTT}	10,45 ± 1,0	7,5 ± 3,6*
HOMA-IR	2,65 ± 2,6	1,75 ± 0,9*
Inzulin AUC _{ivGTT} (E/l)	1,62 ± 1,6	1,37 ± 0,7

11. táblázat A kataláz gén +22348C>T polimorfizmusának összefüggése az antropometrikus és biokémiai paraméterekkel nemek szerinti bontásban (átlag ± SD)

(HOMA-IR: [éhomei glükóz mmol/l x éhomei inzulin uE/ml]/ 22,5; BMD L₁₋₄ (g/cm²): lumbális csontdenzitás; BMD F (g/cm²): femur nyak csontdenzitás.) (Szignifikancia szintek: nő CC vs. CT+TT ^b=p<0,05; férfi CC vs. CT+TT ^c=p<0,05; férfi CC vs.nő CC *=p<0,05; férfi CC vs.nő CC***=p<0,001)

Genotípus	Nők		Férfiak	
	CC	CT+TT	CC	CT+TT
N	29	22	61	29
Életkor (év)	49 ± 10	45 ± 10	35 ± 12	40 ± 14
Inzulin AUC _{OGTT} (E/l)	8,1 ± 5,6	5,5 ± 2,2^b	5,9 ± 3,5	6,2 ± 3,7
HOMA-IR	2,75 ± 2,0	2,07 ± 0,94	2,6 ± 2,8	1,52 ± 0,9^c
BMD L ₁₋₄	1,08 ± 0,13*	1,12 ± 0,15	1,16 ± 0,12	1,16 ± 0,14
BMD Femur nyak	0,93 ± 0,14***	0,98 ± 0,10	1,11 ± 0,17	1,03 ± 0,17^c
Leptin/adiponektin	6,67 ± 7,0	4,07 ± 2,63	2,41 ± 2,2	2,80 ± 2,2
25-OH-D3 vitamin	37 ± 14	34 ± 9	34 ± 10	43 ± 14^c
HDL koleszterin (mmol/l)	1,57 ± 0,5	1,45 ± 0,4	1,35 ± 0,4	1,53 ± 0,3^c
Total LDL (mmol/l)	3,25 ± 0,9	3,04 ± 0,8	2,59 ± 0,9	2,74 ± 0,8

A nemek együttes értékelésekor a T allél megjelenése hatással volt az intravénás glükóz tolerancia teszt során az inzulin elválasztásra, ami mind inzulin 0. perc_{ivGTT} értékben, mind a HOMA-IR indexben szignifikánsan tükröződött. Az inzulin AUC_{ivGTT} érték

esetén ugyan nem kaptunk szignifikáns eltérést, de láthatóan az is csökken mutáns csoportban

A nőknél a T allél szignifikánsan alacsonyabb inzulin elválasztással társult (Inzulin AUC_{OGTT}), ami a HOMA-IR-ben is jelzetten kifejeződött, de valós javulás az egésztest vagy a szövetek glükóz felhasználásában nem volt.

A férfiaknál a T allél megjelenése szignifikánsan alacsonyabb femur denzitással társult, annak ellenére, hogy ebben a csoportban a 25-OH-D3 vitamin szint szignifikánsan magasabb volt. A jelzetten alacsonyabb éhomi glükóz és éhomi inzulin szintek kedvezően változtatták a HOMA-IR értékét, de javulás a szövetek glükóz felvételében nem volt.

A csont anyagcserével összefüggő markerek, hormonok szintjében, gyulladásos citokinek koncentrációjában nem volt különbség a genotípusok között a nemek szerinti bontásban.

Az antropometrikus adatok között a BMD-femur, és a BMD-L₁₋₄ esetében erősen szignifikáns különbségeket kaptunk a férfiak és nők között, ami az irodalmi adatokkal összecseng (BMD-F férfi vs. nő: 1,081±0,174 vs. 0,951±0,126 p<0,001; BMD-L₁₋₄ férfi vs. nő: 1,159±0,128 vs. 1,094±0,142, p<0,05). Ha azonban a genotípusok szerint alcsoportokra osztjuk a férfiakat és a nőket, és így hasonlítjuk össze a két nem eredményeit, akkor ez a szignifikáns különbség eltűnik, amikor a T allél is jelen van (11. táblázat).

BMD-F férfi mutánsCAT vs. nő mutánsCAT: 1,027±0,163 vs. 0,978±0,104, p=0,247;

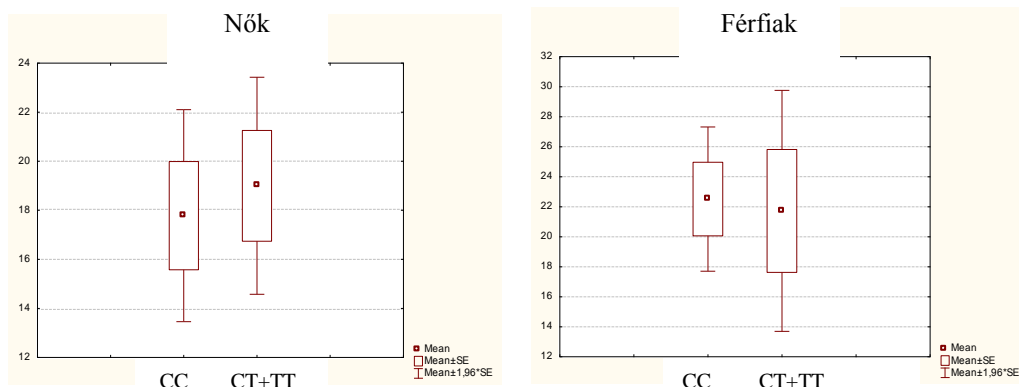
BMD-L₁₋₄ férfi mutánsCAT vs. nő mutánsCAT: 1,162±0,142 vs. 1,116±0,147, p=0,279.

A vad típusban a különbség megmarad (BMD-F férfi vadCAT vs. nő vadCAT: 1,110±0,175 vs. 0,932±0,138, p<0,001; BMD-L₁₋₄ férfi vadCAT vs. nő vadCAT: 1,157±0,121 vs. 1,079±0,139, p<0,05). (CC=vadCAT, CT+TT=mutánsCAT).

Az anyagcserezavar egyik legérzékenyebb markere, a leptin/adiponektin hányados a nőknél a CC genotípusban jelzetten magasabb.

A nemek közötti különbségek okát keresve vizsgáltuk a nemekre jellemző specifikus jegyek és a CAT genotípusok kapcsolatát. Koreai szerzők összefüggést találtak posztmenopauzás nőknél a genotípusok valamint a csontállapotot jelző paraméterek és a szérum oszteokalcin között (32). Korábbi vizsgálatunk (35) során mi is szoros korrelációt találtunk az oszteokalcin szérum koncentráció és a glükóz felhasználást jellemző M értékek között anyagcsere egészséges egyének esetében.

Az egyes genotípusok és az oszteokalcin szérum koncentrációja között nem találtunk szignifikáns különbségek sem a nők, sem a férfiak esetében (9. ábra).



9. ábra A kataláz gén +22348C>T polimorfizmusának hatása az oszteokalcin szérumszintre nők és férfiak esetében

Az oszteokalcin és a csontdenzitás, illetve M értékek korrelációját genotípus szerinti bontás nélkül a 12. táblázatban látható eredményeket mutatják. Az oszteokalcin és a BMD értékek eltérő irányú korrelációt mutatnak a két nemben, míg az M1 és M2 értékekkel való szignifikáns korreláció mindkét nemben azonos irányú.

12. táblázat Az oszteokalcin korrelációja a csontdenzitás értékekkel és az inzulin érzékenységet jellemző M értékekkel genotípus nélkül

(BMD L1-4 (g/cm²): lumbális csontdenzitás; BMD F (g/cm²): femur nyak csontdenzitás; M1: teljes test glükóz fogyasztása (mg/kg/min); M2: zsírintes testtömeg glükóz felhasználása (mg/kg izom/min); M3: zsírszövet glükóz felhasználása (mg/kg zsírszövet/min); oszteokalcin (ng/ml). (Szignifikancia szintek: *=p<0,05; **=p<0,01; ***p<0,001)

	Összes	Összes nő	Összes férfi
n	80	40	40
Oszteokalcin vs. BMD_{L1-4}	0,015	-0,213	0,184
Oszteokalcin vs. BMD-F	0,030	-0,453**	0,280
Oszteokalcin vs. M1	0,400***	0,382*	0,441**
Oszteokalcin vs. M2	0,409**	0,371**	0,3918*
Oszteokalcin vs. M3	0,105	0,287*	0,171

A fenti paraméterek összefüggéseit megvizsgáltuk a genotípusok függvényében is (13. táblázat).

13. táblázat Az oszteokalcin korrelációja a csontdenzitás értékekkel és az inzulin érzékenységet jellemző M értékekkel a kataláz gén +22348C>T polimorfizmusának függvényében (r)

(BMD L1-4 (g/cm²): lumbális csontdenzitás; BMD F (g/cm²): femur nyak csontdenzitás; M1: teljes test glükóz fogyasztása (mg/kg/min); M2: zsírintes testtömeg glükóz felhasználása (mg/kg izom/min); M3: zsírszövet glükóz felhasználása (mg/kg zsírszövet/min); oszteokalcin (ng/ml). (Szignifikancia szintek: *=p<0,05; **=p<0,01; ***=p<0,001)

Genotípus	Összes		Nők		Férfiak	
	CC	CT+TT	CC	CT+TT	CC	CT+TT
n	52	28	23	17	29	11
Oszteokalcin vs. BMD L1-4	0,016	0,017	-0,112	-0,407	0,052	0,423
Oszteokalcin vs. BMD-F	-0,006	0,127	-0,454*	-0,486*	0,153	0,580
Oszteokalcin vs. M1	0,396**	0,432*	0,461*	0,203	0,359	0,732*
Oszteokalcin vs. M2	0,405**	0,491*	0,445*	0,192	0,333	0,696*
Oszteokalcin vs. M3	0,099	0,159	0,419*	-0,020	0,026	0,528

A nőknél megfigyelt szoros oszteokalcin - BMD-F korreláció a genotípussal nem változott. A csontok és a szervezet energia háztartása közötti kapcsolatot teremtő oszteokalcin és a teljes test, valamint izomszöveti glükóz felvétel közötti szignifikáns kapcsolatok a nők esetében a T allél megjelenésével eltűntek. A férfiaknál a vad típusban szűnt meg a korreláció, azaz a T allél megjelenése fordított változást okozott a két nemből.

A nemek közötti különbségek további okát keresve többváltozós regressziós analízist is végeztünk. A 14. táblázatban feltüntettük azokat a parciális korrelációs együtthatókat, ahol a nemek közötti különbségek megjelennek.

14. táblázat A kataláz gén +22348C>T polimorfizmusának összefüggése az antropometrikus és biokémiai paraméterekkel regressziós analízissel (r)

(Szignifikancia szintek: *= $p<0,05$; **= $p<0,01$; ***= $p<0,001$)

Genotípus	Nők		Férfiak	
	CC	CT+TT	CC	CT+TT
Oszteokalcin vs. leptin/adip.	-0,451*	0,176	-0,198	-0,019
M-2 vs. leptin	-0,325	0,350	-0,371*	-0,145
M-2 vs adiponectin	0,203	0,548*	0,454*	0,287
BMD-L₁₋₄ vs. adiponectin	-0,627***	-0,263	-0,134	-0,314
BMD-F vs. adiponectin	-0,557*	0,032	-0,109	-0,203
BMD-L₁₋₄ vs.DHAEs	0,329	0,251	0,433*	0,180
BMD-F vs. DHAEs	0,158	0,347	0,590**	0,229
BMD-L₁₋₄ vs. C-peptid	-0,007	0,200	0,505**	-0,319
BMD-F vs. C-peptid	0,325	0,029	0,541**	-0,395
DHEAs vs. C-peptid	-0,320	-0,252	0,439**	-0,597
DHAEs vs. leptin	-0,318	-0,502	0,482**	-0,345
Tesztoszteron vs. oszteokalcin	-0,139	-0,261	0,495**	0,223
Tesztoszteron vs. M2	-0,108	-0,362	0,529**	0,154
Tesztoszteron vs. adiponektin	-0,083	-0,283	0,436*	-0,061

A nőknél a T allél megjelenéskor eltűnik a kapcsolat az adiponektin és a denzitás értékek (BMD-L₁₋₄ és BMD-Femur) között, valamint az oszteokalcin és leptin/adiponektin arány között.

A férfiak esetében éppen fordított a helyzet, az M2 és a leptin, illetve az M2 és adiponektin, az BMD-L₁₋₄ és DHAEs, a BMD-Femur és a DHAEs közötti kapcsolat ekkor tűnik el, ami talán a femur BMD érték csökkenését eredményezi.

A többszörös korreláció számítás szerint nők esetében a vadCAT genotípusban a femur BMD-t a leptin/adiponektin aránya (nők: $b = +0,595$; $p<0,05$, $n=21$) befolyásolja a legjobban, az összefüggés azonban a T-allél megjelenésekor eltűnik. A leptin/adiponektin arány meghatározó szerepe férfiaknál csak a vadCAT genotípusban a lumbális gerinc (BMD-L₁₋₄) esetében látható ($b = +0,688$; $p<0,05$, $n= 20$).

Nemhez kötött különbséget jelent, hogy a vadCAT genotípusban csak férfiakban mérhető a tesztoszteron és az oszteokalcina tesztoszteron és az izom glükóz felhasználás (M2), a tesztoszteron-adiponektin és a leptin-DHEAs közötti kapcsolat. Ezek a T allél megjelenésekor eltűntek, akár csak a β -sejtek működését jelző szérumban C-peptid-femur BMD kapcsolat.

5.3 Génexpressziós vizsgálatok

5.3.1 Differential display

Napjainkban a gyógyszerjelölt molekulák hatásmechanizmusának vizsgálatához hozzá tartozik a gén szintű mechanizmusok vizsgálata is. Egy, a 2-es típusú diabétesz szövődményeinek megelőzésére kifejlesztett molekulát vizsgáltunk génexpresszió szinten, mivel az egyes állatkísérletes adatok azt valószínűsítették, hogy ezek a molekulák gén szinten képesek kifejteni a hatásukat. Mivel ez a molekula nem tartozott az eddig ismert hatásmechanizmussal rendelkező molekulák közé, ezért olyan technikát kellett választanunk, amely gyakorlatilag lehetővé teszi bármelyik, a gyógyszerjelölt molekula hatására differenciálisan expresszáldott gének megtalálását. Erre a legalkalmasabbnak a mRNS differential display technika tűnt.

A mRNS differential display technika a PCR technika felhasználásával képes arra, hogy össze tudjuk hasonlítani két (vagy több) biológiai minta teljes mRNS populációját, mint pl. egészséges és beteg egyedből származó minta, vagy kontroll és kezelt minta (69).

A módszer egymást követő lépései a következők: mRNS izolálás, reverz transzkripciót követő PCR, a PCR termékek elválasztása és „mennyiségi” értékelése, a differenciálisan expresszáldott gének izolálása, újra sokorosítása, plazmid vektorba történő klónozása, szekvenciájának meghatározás, génbanki beazonosítás, majd a differenciális expresszió visszaigazolása real-time PCR-rel.

A differential display analízishez spontán hipertóniás patkányokat kezeltünk a gyógyszer jelölt molekulával (Bimoclolol, 20 mg/kg/nap; kezelt csoport) ill. fiziológias sóoldattal (kontroll csoport) három hónapig. A mellkasi aortájukból RNS-t izoláltunk, random primerekkel reverz transzkripciót és izotóppal jelölt dNTP segítségével PCR-t végeztünk. A PCR reakció termékeit akril-amid gélen megfuttatva, az autoradiográfiás kifejlesztés után a 10. ábrán látható mintázathoz hasonlóakat kaptunk.



10. ábra Differenciáltan expresszálódott gének a kezelés hatására
(a nyíl jelzi a differenciáltan expresszálódott gént)

A kiértékelést vizuálisan végeztük, a párhuzamba állított csíkok intenzitásai alapján megbecsültük a gén expresszió változás irányát és mértékét. Ha a kezelt mintában a kontrollhoz képest a csík intenzitása nőtt (Fel), akkor expresszió növekedést, ha a csík intenzitása csökkent, akkor expresszió csökkenésnek (Le) ítéltük a változást. A növekedés ill. csökkenés mértékét egy 10-es skálához viszonyítottuk. A 10-es skála legmagasabb értéke az adott gélen a legintenzívebb csík volt, míg a háttér érték volt a nulla pont, azaz, ha valamelyik párnál az egyik mintában nem láttunk csíkot, akkor azt nullának ítéltük.

Az analízisek elvégzése után a differenciáltan expresszálódott csíkokból a DNS-t visszanyertük és újasokszorosítottuk. Sikeres PCR után a termékeket klónoztuk, majd szekvencia analízist végeztünk (34 minta). A 15. táblázatban azokat a „találatokat” tüntettük fel, ahol a génbanki beazonosítás sikeres volt. A táblázatban feltüntettük a primereket, a változás irányát, a változás becsült értékét, és az adott gén génbanki számát és nevét. Egy-két esetben olyan szekvenciát kaptunk, amely már a génbanki adatbázisban szerepel, de a gén még nem ismert (eddig ismeretlen).

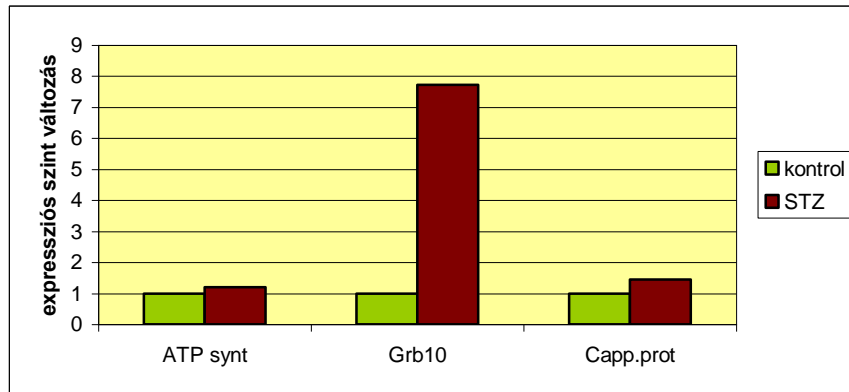
15. táblázat A differenciáltan expresszáldott gének

Minta	Primer pár	Változás	Génbanki szám	Megjegyzés
1/2	T ₁₂ VC-ARB20	Le (5-1)	18204102	Eddig ismeretlen
6/3	T₁₂VC-ARB19	Le (1-0)	17978458	ATP-szintáz e alegység
11/3	T ₁₂ VC-ARB19	Le (6-1)	12846864	RNS polimeráz II.
12/2/1	T ₁₂ VA-ARB17	Le (0,5-0)	23469237	Eddig ismeretlen
12/2/2	T ₁₂ VA-ARB17	Le (0,5-0)	23469237	Eddig ismeretlen
13/5	T ₁₂ VA-ARB17	Le (3-1)	12860796	NH ₃ dependens NAD(+)-szintáz
14/1	T ₁₂ VA-ARB17	Le (4-1)	9951628	50S Ribosomal protein L28
15/1	T ₁₂ VA-ARB17	Le (0,5-0)	7109044	Aminopeptidáz A (Enpep)
16/1	T ₁₂ VG-ARB17	Le (6-2)	9951628	50S Ribosomal protein L28
17/1	T ₁₂ VT-ARB17	Fel (0-2)	9951628	50S Ribosomal protein L28
18/1	T ₁₂ VG-ARB17	Le (2-0,5)	9951628	50S Ribosomal protein L28
32/3	T ₁₂ VC-ARB6	Le (1-01)	1139534	Humán MSSP-2
39/4	T₁₂VA-ARB6	Le (2-0,5)	12849527	GRB10 protein
41/2	T ₁₂ VC-ARB5	Le (0,5-0)	17978092	Eddig ismeretlen
45/1	T₁₂VT-ARB18	Le (0,7-0)	12805188	Capping protein béta alegység

A kapott találatokat elemeztük, áttekintettük az irodalmat és ezek alapján meghatároztuk, hogy melyek azon a gének, amelyeket a továbbiakban vizsgálunk. A döntés során figyelembe vettük, hogy melyek azok, amelyek a glükóz homeosztázisban szerepet játszhatnak. A válogatás után három gént tartottunk olyannak, amivel érdemes tovább foglalkozni. Ezeket a 15. táblázatban kivastagítva jelöltük.

5.3.2 A differenciált expresszió visszaigazolása

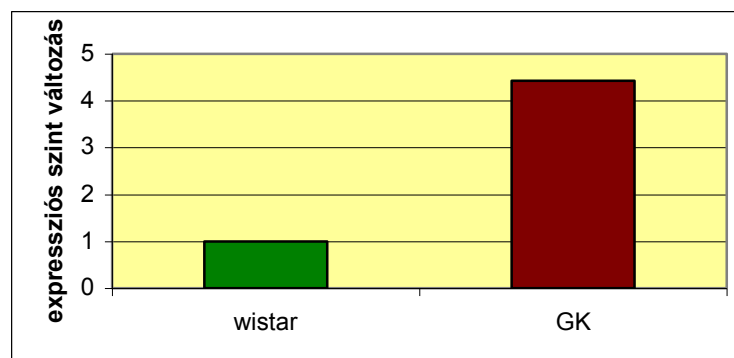
Első lépésként megpróbáltuk visszaigazolni, hogy a három kiválasztott gén diabéteszes modellekben differenciáltan expresszálódik-e. Streptozocotinnal diabéteszessé tett patkányok (STZ, 1-es típusú diabéteszes modell) májából RNS-t izoláltunk és real-time PCR segítségével mértük az expresszió szintjét.



11. ábra A differenciált expresszió visszaigazolása (kontroll és STZ diabéteszes patkányok májából izolált RNS)

A visszaigazolás során csak a GRB10 protein esetén kaptunk jelentős változást a gén expresszióban. Az STZ diabéteszes patkányokban a GRB10 gén expressziós szintje több mint 7-szeresére emelkedett. A további vizsgálatainkat erre a génre összpontosítottuk.

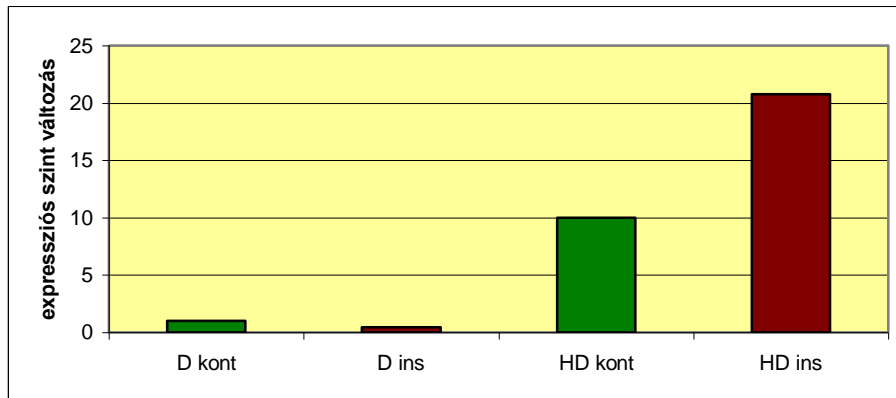
A GRB10 gén expressziójának változását megvizsgáltuk genetikailag diabéteszes (GK, 2-es típusú diabéteszes modell) patkányok és Wistar patkányok májában is.



12. ábra A GRB10 gén expressziójának szintje kontroll (Wistar) és genetikailag 2-es típusú diabéteszes (GK) patkányok májában

A GK patkányok májában a GRB10 gén expressziója ~4.5-szeres emelkedést mutatott.

L8 myoblast sejteket a konfluens szint elérése után szérumdeprivációval myotubokká differenciáltattuk. A sejtek egy részét normál glükóz tartalmú tápfolyadékban differenciáltattuk (DMEM), míg a másik részét magas glükóz tartalmú tápfolyadékban (HDMEM, 25 mM glükóz), modellezve ezzel a glükóz toxikus hatását. Az RNS izolálás előtt 3 órán át 200 nM inzulinnal kezeltük (inzulin stimuláció), ezután RNS-t izoláltuk és mértük a GRB10 gén expresszióját.



13. ábra A GRB10 expressziós szintjének változása a magas glükóz koncentrációra és az inzulin stimulációra

(D kont: normál glükóz tartalmú tápfolyadék, inzulin stimuláció nélkül; D ins: normál glükóz tartalmú tápfolyadék, inzulin stimulációval; HD kont: magas glükóz tartalmú tápfolyadék, inzulin stimuláció nélkül; HD ins: normál glükóz tartalmú tápfolyadék, inzulin stimulációval)

A GRB10 expressziója 10-szeres növekedést mutatott a magas glükóz hatására, amit az inzulin stimuláció még fokozni tudott (~2-szeres emelkedés a HDMEM kontrollhoz viszonyítva, és ~20-szoros emelkedés a DMEM kontrollhoz viszonyítva).

5.4 A GRB10 gén RS 2237457 (+11275G>A) polimorfizmusának vizsgálata

A génexpressziós eltérések az egészséges és a beteg, esetünkben a diabétesz állatkísérletes modellek vizsgálatakor „kandidáns gének” egész sorát tárhatja fel, melynek ellenőrzése humán vonatkozásban is indokolt, különösen akkor, ha a populációs genom vizsgálatok összefüggést találnak a kérdéses „kandidáns gén” polimorfizmusa és a betegség előfordulása között. Előkísérleteink a GRB10 gén eltérő expresszióját mutatták egészséges és diabéteszes patkányok esetében. A GRB10 gén és a 2DM közötti kapcsolatot 2007-ben genom szintű asszociációs vizsgálat során igazolták, amikor a

GRB10 génnek több olyan polimorfizmusát ismerték meg, amely összefüggést mutatott a 2-es típusú diabétesz (2DM) kialakulásával (RS 4947710, RS 2237457) (45, 46).

Vizsgálataink egyik célja az volt, hogy a magyarországi egészséges és diabéteszes populáció között összehasonlítsuk a GRB10 gén +11275G>A (RS 2237457) polimorfizmusának allél gyakoriságát. Ehhez 77 egészséges és 85 2DM beteg DNS mintáját vizsgáltuk. Az eredmény a 16. táblázatban látható.

16. táblázat A GRB10 +11275G>A polimorfizmusának allél gyakorisága magyarországi egészséges és 2DM betegeknél

Genotípus	Egészséges	2DM	OR	C.I.(95%)	χ^2	p
GG	30	44	0,568	0,22-1,48	1,352	0,756
AG	35	31	0,941	0,36-2,48	0,015	0,098
AA	12	10	1	-	-	-
G allél	95	119	0,69	0,43-1,09	2,489	0,885
A allél	59	51	1	-	-	-
G allél %	0,62	0,70	-	-	0,113	
A allél %	0,38	0,30	-	-	1,473	

Nem találtunk szignifikáns különbséget a GRB10 gén +11275G>A polimorfizmus vizsgálata során az allél gyakoriság között (OR) az egészséges és a 2DM csoport között és az allél gyakoriságok csoportokon belül eleget tettek a Hardy-Weinberg egyensúlynak (χ^2).

Vizsgálatunk másik célja az volt, hogy összefüggéseket keressünk a glükóz anyagcsere jellemző paramétereit, a hormon, az adipokin, a citokin szintek és hiperinzulinémiás–euglikémiás klempt (HEK) technikával meghatározott és az inzulin érzékenységet tükröző, egészséges és az izomtömeg glükóz felhasználás között az egyes genotípusokban. A vizsgálatban a Balaton Felvidék Régióban élő, 86 anyagcsere egészséges (23 nő és 63 férfi) és 53 testzsír tartalom és BMI szerint illesztett, glükóz intoleráns (27 nő és 26 férfi) egyén vett részt. A glükóz intoleráns csoportban IFG (7 nő és 8 férfi), IGT (17 nő és 12 férfi) és inzulin-, vagy orális antidiabetikum kezelést nem igénylő 2DM (3 nő és 6 férfi) betegek voltak. Mivel a vizsgálatba bevont egyének beválogatása nem véletlenszerű volt, hanem anyagcsere állapotok alapján történt, ezért

ellenőriztük, hogy az egyes csoportokba beválogatott egyének allél gyakorisága eleget tesz-e a Hardy-Weinberg egyensúlynak. Az egyes csoportokban kapott allél gyakoriságokat és a χ^2 próbák eredményeit a 17. táblázat tartalmazza. Az allél gyakoriságok az egyes csoportokban eleget tesznek a Hardy-Weinberg egyensúlynak.

17. táblázat A GRB10 gén +11275G>A polimorfizmusának allél frekvenciája az anyagcsere egészséges és a glükóz intoleráns csoportokon belül

	Genotípus			Allél frekvencia%		χ^2
	GG	AG	AA	G	A	
Összes	51	62	26	0,58	0,41	0,848
Egészséges	36	37	13	0,63	0,37	0,461
Glükóz intoleráns	15	25	13	0,52	0,48	0,162

A vizsgálatban részt vett személyek antropometrikus, adipokin és csontdenzitás adatai a 18. táblázatban láthatóak.

18. táblázat A vizsgált személyek antropometrikus, adipokin és csontdenzitás adatai (átlag±SD) (Szigifikancia szintek: nő vs. férfi, *=p<0,5; **=p<0,05; ***=p<0,01)

	Nő	Férfi
n	49	90
Életkor (év)	49 ± 9	38 ± 13*
Testtömeg (kg)	80 ± 10	78 ± 16*
BMI	29 ± 6	27 ± 5
Testzsír %	44 ± 6	27 ± 8****
Testzsír (kg)	33 ± 10	24 ± 10****
Zsírmentes testtömeg (kg)	39 ± 6	59 ± 8****
Has körfogat (cm)	102 ± 13	99 ± 15
Se rezisztin (ng/ml)	4,84 ± 2,6	4,07 ± 2,5
Se leptin (ng/ml)	36 ± 25	11 ± 9****
Se adiponektin (µg/ml)	6,72 ± 3,3	4,97 ± 2,5****
Leptin/Adiponektin (ng/µg)	6,5 ± 5,2	3,0 ± 2,4****
BMD L₁₋₄ (g/cm²)	1,092 ± 0,14	1,165 ± 0,13****
BMD femur nyak (g/cm²)	0,962 ± 0,11	1,087 ± 0,16****

A férfiak izom- csonttömege, a nők zsírtömege, leptin-, adiponektin-vérszintje a várakozásnak megfelelően magasabb. Az Odds ráció és χ^2 próba eredménye nem mutat szignifikáns eltérést az allél frekvenciákban a férfiak és nők között, így a nemek közötti eltérések okát nem az allélok számának különbsége okozza (19. táblázat).

19. táblázat A GRB10 gén +11275G>A polimorfizmusának allél frekvenciája a HEK vizsgálatban részt vett férfiak és a nők között

Genotípus	Férfi	Nő	OR	C.I.(95%)	χ^2	p
GG	33	18	0,55	0,21-1,42	1,548	0,787
AG	44	18	0,41	0,16-1,05	3,529	0,940
AA	13	13	1	-		
G allél	110	54	0,78	0,47-1,29	0,947	0,669
A allél	70	44	1	-		

A továbbiakban vizsgáltuk a GRB10 génpolimorfizmus anyagcserehatásait a nemek elkülönítése nélkül és nemek szerinti bontásban is. A 20. táblázat tartalmazza azokat a paramétereket, ahol szignifikáns illetve jelzetten eltérő eredményeket kaptunk a két genocsoportban a nemek elkülönítése nélkül.

20. táblázat Az A allél hatására változó paraméterek nemek együttes értékelésekor (átlag ± SD)
(Sznifkancia szintek: GG vs. AG+AA: * = p <0.05; ** = p < 0.01).

N	51	88
Genotípus	GG	AG+AA
Életkor (év)	39 ± 14	40 ± 12
Se rezisztin (ng/ml)	4,24 ± 2,3	3,97 ± 2,6
Se leptin (ng/ml)	23 ± 28	19 ± 16
Se adiponektin (µg/ml)	5,47 ± 2,8	6,35 ± 3,0
Leptin/adiponektin	0,52± 0,6	0,33± 0,2*
Koleszterin (mmol/l)	5,06 ± 0,9	5,49 ± 1,3*
LDL-1 koleszterin (mmol/l)	0,89 ± 0,2	0,97 ± 0,4
LDL-2 koleszterin (mmol/l)	0,41 ± 0,3	0,56 ± 0,3**
LDL-3 koleszterin (mmol/l)	0,09 ± 0,19	0,11 ± 0,17
LDL-4 koleszterin (mmol/l)	0,026±0,08	0,006±0,02*
HDL koleszterin (mmol/l)	1,44 ± 0,3	1,44 ± 0,4
Total LDL (mmol/l)	2,62 ± 0,7	2,95 ± 0,9*

Amikor az egész vizsgált populációt, nemre való tekintet nélkül, csak a genotípus szerint csoportosítottuk, azt láttuk, hogy a GG genotípusban, ha nem is szignifikáns szinten legmagasabb a leptin és legalacsonyabb az adiponektin vérszint. Az induló anyagcserezavar egyik legérzékenyebb markerének tartott leptin/adiponektin arány közötti különbség (70, 71, 72) viszont a GG versus AG+AA viszonylatban már szignifikáns volt. A lipid profilban is eltérést tapasztaltunk a vad és mutáns csoportok között.

A 21. táblázatban már a nemek szerint elkülönített szignifikáns adatok láthatóak.

21. táblázat Az A allél hatására változó paraméterek nemek szerinti bontásban (átlag ± SD) (M2 = izomtömeg glükóz felhasználása (mg/kgizom/min)) (Szignifikancia szintek: GG vs. AG+AA: * = p <0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001).

	Nő	Nő	Férfi	Férfi
Genotípus	GG	AA+AG	GG	AA+AG
N	18	31	33	57
Életkor (év)	48 ± 9	47 ± 10	35 ± 13	37 ± 12
Inzulin AUC_{OGTT} (E/l)	7,33 ± 4,7	6,83 ± 4,7	6,89 ± 4,4	5,27 ± 3,5*
Se adiponektin (µg/ml)	4,7 ± 2,9	8,53±2,9***	5,98 ± 2,7	5,10 ± 2,2
Leptin/adiponektin	0,79± 0,7	0,43 ± 0,2*	0,26± 0,2	0,27± 0,2
M2	5,01 ± 3.11	5,75 ± 3.24	7,10 ±	8,69 ± 3,0*
BMD-Femur	1,00 ± 0,13	0,93± 0,10*	1,08 ±	1,09 ± 0,19
BMD-L₁₋₄	1,16 ±0,13	1,06 ±0,13*	1,14 ±0,11	1,17 ± 0,13
Koleszterin (mmol/l)	5,21 ± 0,8	5,96 ± 1,3*	4,98 ± 1,0	5,24 ± 1,2
LDL-1 koleszterin (mmol/l)	1,02 ± 0,3	1,25 ± 0,4*	0,83 ± 0,2	0,82 ± 0,3
LDL-2 koleszterin (mmol/l)	0,41 ± 0,3	0,54 ± 0,3	0,41 ± 0,2	0,60 ± 0,4*
LDL-3 koleszterin (mmol/l)	0,10 ± 0,2	0,06 ± 0,1	0,08 ± 0,1	0,14 ± 0,1
LDL-4 koleszterin (mmol/l)	0,02 ± 0,03	0,00± 0,03*	0,03±0,00	0,009±0,03
HDL koleszterin (mmol/l)	1,32 ± 0,3	1,65± 0,5*	1,51 ± 0,4	1,34 ± 0,3*
Total LDL (mmol/l)	2,89 ± 0,6	3,35± 0,9	2,48 ± 0,7	2,74 ± 0,9

Az inzulinérzékenységet tükröző glükóz felhasználás nők esetében nem függött a GRB10 polimorfizmustól, a mért paraméterek közül az adiponektin vérszint volt szignifikánsan alacsonyabb a vad, GG genotípusban, ami magasabb csontdenzitás értékekkel társult.

Férfiaknál a GG allél az orális glükóz terhelést követően fokozott inzulin elválasztással társult, amely azonban az intravénás glükóz terhelés során nem volt észlelhető. Ebben a csoportban rosszabb volt az izomszövet glükóz felhasználása is.

A GG allél mindkét nemben rosszabb lipid profilt eredményezett, a kisebb denzitású, nagyobb molekulásúlyú LDL-1, LDL-2 frakció koncentrációja alacsonyabb, míg a magasabb denzitású frakciók mennyisége nő. Nőknél még a HDL-koleszterin mennyisége is csökkent.

A nemek közötti különbséget még jobban érzékelhetjük, ha az izomszövet glükóz felhasználását jellemző M2 paraméter korrelációs kapcsolatait vizsgáljuk (22. táblázat).

22. táblázat A nemi hovatartozás és az A allél hatása az izomszöveti glükóz felhasználás (M2) korrelációs kapcsolataira (r)
(Szignifikancia szintek: *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$)

	Nő	Nő	Férfi	Férfi
Genotípus	GG	AA+AG	GG	AA+AG
BMI	-0,443**	-0,659***	-0,616***	-0,595***
Testzsír%	-0,556**	-0,761***	-0,805***	-0,654**
Glükóz AUC _{OGTT} (mmol/l)	-0,504*	-0,384*	-0,587**	-0,581***
Inzulin AUC _{OGTT} (E/l)	-0,527*	-0,421**	-0,532**	0,319*
Glükóz AUC _{ivGTT} (mmol/l)	-0,454*	-0,456*	-0,500**	-0,548***
Inzulin AUC _{ivGTT} (E/l)	-0,638***	-0,471**	-0,517**	-0,453**
Leptin (ng/ml)	ns	ns	-0,488*	-0,483***
Adiponektin (µg/ml)	ns	ns	0,702***	0,321**
Leptin/adiponektin	ns	ns	-0,580**	-0,532***
Koleszterin (mmol/l)	ns	ns	-0,357*	-0,343**
LDL-1 (mmol/l)	ns	ns	ns	ns
LDL-2 (mmol/l)	ns	ns	-0,488**	-0,460**
LDL-3 (mmol/l)	ns	ns	-0,420*	-0,531***
LDL-4 (mmol/l)	ns	ns	ns	-0,312*
HDL (mmol/l)	ns	ns	ns	ns
Total LDL (mmol/l)	ns	ns	-0,417***	-0,255*
Oszteokalcin (ng/ml)	+0,785***	ns	+0,392*	+0,429**

Nők esetében az M2 értékek kapcsolata a lipid paraméterekkel, a leptin- és adiponektin szérumszintekkel mindkét csoportban eltűnik, így ezek a különbségek nem hozhatók kapcsolatba a genotípus változásokkal.

6. MEGBESZÉLÉS

6.1 Vér kataláz enzim referens tartománya

A vér katalázaktivitás referens tartományát mintegy 1700 aktivitás eredményből határoztuk meg. A férfiakra és a nőkre külön referens tartományt adtunk meg, mert az eloszlás normalitás vizsgálata és az alsó/felső referens határ alatti/feletti értékek együttes vizsgálata (7,2% vs. kritikus 4,1% és 7,9% vs. kritikus 4,1%) együttesen jelezték, hogy külön referens tartományt kell megadni a két nem számára. A nőknél szignifikánsan ($p < 0,001$) alacsonyabb értékeket ($107,7 \pm 14,4$ MU/l) kaptunk, mint a férfiak esetében ($117,9 \pm 16,9$ MU/l). A nők alacsonyabb vér katalázaktivitása a periodikus vérvesztésükből származó alacsonyabb vörösvértestszámmal magyarázható. Az életkor hatása a katalázaktivitásra a férfiaknál és nőknél egyaránt megmutatkozik, de nem szignifikánsan, így életkor függést megadni nem szükséges. Az életkor függés, ha csekély mértékben is, de különbözően változik a férfiaknál és a nőknél, a nőknél az életkor előre haladásával kevésbé csökken, ami nem meglepő, hiszen a menopausa után a periodikus vérvesztés hatása már nem játszik szerepet.

6.2 A kataláz gén mutációinak és polimorfizmusainak vizsgálata

A katalázaktivitás referens tartományának meghatározása után több ezer egyénnél mértük a katalázaktivitást, hogy megtaláljuk azokat a személyeket, akiknél csökkent a katalázaktivitás. A mintegy 3300 vizsgált egyén közül 6 személyt találtunk, akiknél aktivitás csökkenést tudtuk detektálni. Az 1630 klinikai beteg közül három bizonyult csökkent aktivitásúnak, így összesen 9 személyt regisztráltunk, mint hipokatalázémiás. A 9 személy mindegyike más családhoz tartozott. A családok tagjainál szintén katalázaktivitás vizsgálatot végeztünk. A családok tagjai között 37 személy hipokatalázémiás ($57,5 \pm 11,7$ MU/l), míg 47 személy normokatalázémiás ($98,6 \pm 17,9$ MU/l) volt. Az így megtalált egyének DNS mintája képezte a genetikai vizsgálataink alapját.

A kataláz gén mutációinak illetve polimorfizmusainak a vizsgálatát az ismert mutációk magyarországi feltérképezésével kezdtük. A japán típusú akatalázémiában két pontmutációt találtak (15). Az egyik egy A→T szubsztitúció a promóter régió -21-es pozíciójában, amikor is az A nukleotidnak a cseréje megszüntet egy HinFI (GANTC)

hasítási helyet. A másik szubsztitúció a G→A átmenet, a 4-es intron 5. pozíciójában. Ez utóbbi nem volt megtalálható a magyarországi hipokatalázémiás egyéneknél, amint azt korábbi vizsgálatok bizonyították. Az A→T szubsztitúció vizsgálata során viszont váratlanul kiugróan nagyszámú mutációt kaptunk. A PCR termékek szekvenálása azonban magyarázatot adott erre az eredményre, ugyanis az analízis során három pontmutációt fedeztünk fel. Az A→T mutáció a hipokatalázémiás egyéneknél szignifikánsan ($P < 0,001$) magasabb volt, mint a normokatalázémiás betegeknél (2/36 vs 14/18). Mivel azonban ez a mutáció a kontroll egyéneknél is megtalálható, ezért ez nem tekinthető a csökkent katalázaktivitás kizárólagos és egyértelmű magyarázatának. A két újonnan megtalált mutáció közül az egyik a hipokatalázémiás betegeknél is alacsony frekvenciát mutatott (-20 C→A, 3/35 vs. 0/32), a másik esetén pedig a kontroll csoport és a hipokatalázémiás csoport között nem volt szignifikáns különbség az allél frekvenciában (-18 C→T, 18/20 vs. 20/12), így egyik újonnan megtalált mutációval sem magyarázhatjuk a csökkent katalázaktivitást.

A hipokatalázémiás egyének között magas volt a diabétesz gyakorisága (12,3%), ezért a mutáció illetve polimorfizmus vizsgálatainkat kiterjesztettük a diabéteszes populációkra. A kataláz gén 2. exonjára és közvetlen környezetére fókuszáltunk, és egyszerű konformációs polimorfizmus (SSCP) analízist végeztünk. PCR heteroduplex módszerrel pedig a GA illetve G inzerciót kerestük a 2-es exonban. A 308 diabéteszes beteg közül 11 személynél találtunk szekvencia analízissel is megerősített mutációt, ami 3,57%-nak felel meg, és a mutációk allél frekvenciája 1,78% volt. A kontroll csoportban nem detektáltunk mutációt. A megtalált mutációk közül öt újonnan detektált mutáció volt. Az 1. intron 60-as pozíciójában felfedezett G→C mutáció két páciens esetében jelent meg, de nem okozott szignifikáns katalázaktivitás csökkenést. Ez a mutáció az intronon helyezkedik el, ezért ezt úgy tekintjük, mint a kataláz gén egy benignus polimorfizmusát. A 2. exonban lévő T→G (96-os pozíció) és a G→C (135-ös pozíció) missense mutációk megváltoztatják az adott helyen lévő aminosavat. Az 53-as aminosav pozícióban az aszparagin helyett glutamin lesz, míg a 67-es aminosav pozícióban glutamin helyett cisztein. A kataláz enzim amino terminális doménjának van egy 75 aminosavból álló része, ami a központi régiójából karként nyúlik ki. Ez a kar két hélixből áll, és mindkét hélix részt vesz az alegységek egymás közötti kapcsolatában. A második hélix számos aminosavja (Val 44, Arg 72, Val 74 és His 75) nagyon fontos a hem-protein megkötésében. A két újonnan detektált missense mutáció (53-as és 67-es aminosav pozíció) nagyon közel van ehhez a szakaszhoz, ezért ezek az aminosav szubsztitúciók

katalázaktivitás csökkenést eredményezhetnek, ami hidrogén-peroxid emelkedést és folyamatos oxidatív stresszt okoz, mely hozzájárulhat a 2-es típusú diabétesz kialakulásához. A két frameshift mutáció (GA illetve G inzerció az 2-es exonban) stop kodon beépülését okozza a 134-as, illetve 57-es aminosav pozícióban (az 517-es pozícióban lévő stop kodon helyett), így trunkált kataláz proteinek keletkeznek, amelyek felelősek lehetnek a csökkent katalázaktivitásért.

6.3 A kataláz gén +22348C>T polimorfizmusa és a csontállapot kapcsolata

A kataláz gén +22348C>T polimorfizmusát vizsgáltuk, és összefüggéseket kerestünk a csontállapot és genotípusok között. Nemek szerinti bontásban szignifikáns különbséget találtunk a férfiaknál a femur nyak csontsűrűsége és a genotípusok között. A csak C alléllal (vad*CAT*) rendelkező férfiak csontdenzitása magasabb, mint a mutáns*CAT* genotípusban (CT+TT=mutáns*CAT*).

Az irodalom adatainak megfelelően a csontdenzitás szignifikáns különbözött a két nem között ($p < 0,001$), de amikor a genotípusokat is figyelembe vettük, a mutáns*CAT* genotípusban a csontdenzitás közötti különbség a nemek között kiegyenlítődött (BMD-F férfi mutáns*CAT* vs. nő mutáns*CAT*: $p = 0,247$; BMD- L_{1-4} férfi mutáns*CAT* vs. nő mutáns*CAT*: $p = 0,279$).

Férfiak esetében viszont a mutáns*CAT* csoportban a szignifikánsan magasabb D-3 vitamin szint ellenére alacsonyabb femur-nyak denzitást észleltünk. Ez férfiakban jobb inzulin érzékenységre utaló alacsonyabb éhomi inzulin szintekkel, az oszteocalcin és M-2 kapcsolat kialakulásával, valamint az izom és zsírszövetben történő cukorfelhasználás arányának jelzett változásával járt (M3/M2: vad*CAT*: $0,25 \pm 0,09$ vs. mutáns*CAT*: $0,28 \pm 0,06$, $p = 0,06$). A femur BMD értékek nem mutattak kapcsolatot az inzulin vérszintekkel, de igen szoros korrelációban voltak a pankreász β -sejtek valós inzulin szekréciónak tükröző C-peptid szintekkel (a plazmában mért inzulin szintek alacsonyabbak, mert a β -sejtek által szekretált inzulin egy része kötődik a májsejt receptorokhoz és már a májban elbomlik). Ez a kapcsolat esetünkben a férfi nemhez kötöttnek bizonyult és az oxidatív stresszhez történő alkalmazkodás változásával, a T allél megjelenésekor megbomlott.

A kataláz gén +22348C>T polimorfizmusának fontos szerepet tulajdonítottak a csontdenzitás és a csontformációs markerként számon tartott oszteocalcin és energia háztartás kapcsolatában, így a csont metabolizmusban is. A 22348-as pozícióban lévő C nukleotid cseréje T-re ugyanis szignifikáns oszteocalcin szérumszint koncentráció csökkenést és csontdenzitás növekedést (BMD-F és BMD L_{1-4}) okozott a koreai postmenopauzás

nőkben (32). A hazai vizsgált populáción ezt az összefüggést nem tapasztaltuk, ami felhívja a figyelmet arra, hogy a genetikai vizsgálatok populáció specifikus eredményeket hozhatnak, emiatt feltétlenül szükséges minden polimorfizmust a hazai populáción is megvizsgálni. Ehhez nyújthatnak nagy segítséget a populáció és/vagy betegség specifikus génbankok, mint például a Korányi András Dunántúli Génbank, amelynek mintáit a munkám során is felhasználtam.

A kataláz gén +22348C>T polimorfizmusát az oszteokalcin koncentrációjának, az inzulin érzékenységet kifejező egésztest glükóz felhasználás (M1), zsírmassza testtömeg glükóz felhasználás (M2) és zsírszövet glükóz felhasználás (M3) vonatkozásában is vizsgáltuk. Előzetes eredményeink bizonyították, hogy a glükóz felhasználás és az oszteokalcin szint között meglévő szignifikáns korreláció az inzulin érzékenység romlásával mindkét nemből megszűnik (35).

Ha azonban ezt a korrelációt a +22348C>T polimorfizmus függvényében vizsgáljuk, akkor azt látjuk, hogy a nőkben a vad típus esetén (CC) pozitív korreláció van az oszteokalcin és a M értékek között, a mutánsCAT genotípusban viszont ez a korreláció megszűnik, férfiaknál pedig a helyzet fordított. A +22348C>T nukleotid szubsztitúció az exon 9-ben nem okoz aminosav változást, így ez a polimorfizmus jelenleg még csak egy markernek tekinthető, és talán nem járul hozzá a kataláz aktivitás változásához, vagy eddig ismeretlen módon, az intronon elhelyezkedő eltérésekhez hasonlóan változtatja meg a gén átírását. A kapott összefüggéseket nem nagyszámú mintán kaptuk, így nagyon merész lenne azt kijelenteni, hogy a kataláz gén ezen polimorfizmusának eredménye predesztinálhatja az oszteokalcin, a csontmetabolizmus és a glükóz anyagcsere közötti állapotot, de okot adhat a vizsgálat szélesebb körben való kiterjesztésére.

A fenti adatok alapján a +22348C>T kataláz gén mutáció hatása tehát nemhez kötött. A T allél megjelenése *protektív anyagcsere hatású*, ami a fajfejlődés során kialakult negatív energia- és csontmetabolizmus kapcsolatnak (33) megfelelően a férfiak esetében kedvezőtlen a femur állapotára.

Vizsgálatunkban a mutánsCAT gént (T allél) hordozó nőkben a változó anyagcsere (adiponektin, leptin-M2) és csont kapcsolatok (adiponektin-BMD) nem jártak szignifikáns csontdenzitás változásokkal. Férfiakban a T allél megjelenése, talán a megváltozó adipokin-anyagcsere (M2) kapcsolatok miatt, denzitás csökkenést okoz a femuron. A már említett evolúciós kapcsolatnak megfelelően ebben az esetben is a javuló HOMA érték jelzi, hogy a jobb anyagcsere állapot gyengébb femur denzitással társult.

Vizsgálatunk e nemhez kötött hatás mechanizmusát nem tisztázta. A többszörös korrelációs számítások során észlelt adatok (a leptin/adiponektin arány nők esetében a femur, férfiak esetében az L1-4 BMD értékét befolyásolta, és ezek a kapcsolatok a T allél megjelenésekor megszűntek), valamint a T allél megjelenésével eltűnő negatív leptin-anyagcserehatás, és az ugyancsak megszűnő pozitív leptin-DHEAs és DHEAs-femur denzitás kapcsolat alapján felvetődik az ismerten nemi különbségeket hordozó leptin szerepe (73).

6.4 A differential display eredményei

A differential display analízis célja alapvetően gyógyszerjelölt molekulák hatásmechanizmusának a vizsgálata volt, amelyhez olyan géneket kellett találnunk, amelyek eltérően expresszálódnak bizonyos patológiás modellekben és a gyógyszerjelölt molekulák képesek ezt az expressziós különbséget kiegyenlíteni. Az analízis eredményeként három olyan gént találtunk, amelyekkel a további vizsgálatokat folytattuk, visszaigazolva az expressziós különbségeket. A legkecsegtetőbb génnek a GRB10 bizonyult. Megállapítottuk, hogy mind az 1-es, mind a 2-es típusú diabéteszes állatmodellekben eltérően expresszálódik, a magas glükóz koncentráció is növeli a mRNS mennyiségét.

6.5 A GRB10 +11275G>A polimorfizmusának eredményei hazai populáción

Genomszintű asszociációs vizsgálat során igazolták, hogy a GRB10 gén és a 2DM között kapcsolat van, és a GRB10 génnek több olyan polimorfizmusát ismerték meg, amely összefüggést mutatott a 2-es típusú diabétesz (2DM) kialakulásával (pl.: RS 4947710, RS 2237457). Munkánk során hazai egészséges és kezelést nem igénylő 2DM populáció esetében vizsgáltuk a GRB10 RS 2237457 (+11275G>A) allél frekvencia előfordulását; valamint az allél típusok összefüggését a biokémiai paraméterekkel, a glükóz anyagcsere mutatóival, a hormon, az adipokin, a citokin szintekkel és az inzulin érzékenységet tükröző, egésztest glükóz felhasználással.

A magyarországi 2DM betegek esetében nincs különbség a GRB10 gén vizsgált polimorfizmusában (RS 2237457, +11275G>A) az allél gyakoriság között a kontroll csoporthoz viszonyítva. Ez összhangban van a Skandináviában és Amerika több népcsoportjában mért adatokkal, de eltér az amerikai Amish közösségben talált adatoktól (magyarországi populáció egészséges G: 62% vs. 2DM G: 70 %; Amish közösség egészséges G: 68 % vs. 2DM G: 53 %). Az amerikai Amish népesség körében végzett vizsgálat során a GRB10 gén +11275G>A polimorfizmusa szoros összefüggést mutatott

a nem diabéteszes személyek orális glükóz terhelése során számított glükóz AUC értékével ($p = 1,07 \times 10^{-5}$). Mi a vizsgálataink során „prediabéteszes” személyeket, azaz az egészségestől az IFG és IGT-n keresztül a kezelést nem igénylő 2DM-ig vizsgáltunk. Ebben a populációban nem volt összefüggés a genotípus és glükóz AUC között, de a férfiaknál kapott nagyobb inzulin szekréció a vad típusban alátámasztja, hogy a gén polimorfizmusa az inzulin jelátvitelt befolyásolja, és ez összecseng azon állatkísérletes adatokkal is, amelyek a GRB10-t az inzulin-elválasztással hozzák kapcsolatba. Mivel ez a jelenség az intravénás glükóz terhelés során nem észlelhető, feltételezhető, hogy a GRB10 hatása az inzulin-elválasztásra az inkretin jelátvitelen keresztül valósul meg. Eredményeink megerősítésére nagyobb esetszámra lenne szükségünk, azonban a klempt vizsgálatok magas költsége ezt megnehezíti.

Az allél variációkkal összefüggő, leptin/adiponektin és lipidprofil alapján feltételezhetjük, hogy a GG homozigóták esetében egy funkciójában erősebb alléllal állunk szemben. Az aktívabb GG allél a posztnatális időszakban a zsírákkumulációt (zsírsejt proliferáció elősegítése a MAP kináz úton) és a metabolikus inzulin jelátvitelt (IR-IRS1 szinten) képes befolyásolni, így az egyéb poligénes és környezeti hatásokkal együtt szerepet kaphat az inzulin rezisztencia és a 2DM kialakulásában.

Vizsgálatunk alapján egyértelmű, hogy a nemek között jelentős különbség van a glükózfelhasználás, inzulinérzékenység és az adipokin kapcsolatok vonatkozásában. Bár az esetszám alacsony, úgy tűnik, hogy ezt a nemhez kötött kapcsolatot a jelenleg vizsgált GRB10 gén polimorfizmusa nem befolyásolja (74).

6.6 Korányi András Dunántúli Génbank létrehozása

A DNS, plazma és mononukleáris sejt mintatár funkciója többszörös.

Lehetőséget és alapot nyújt a specifikus diagnosztikus blokkok (Protein macro és micro array-k) kialakítására, a kialakított protein array-k gén szintű tesztelésére, annak ellenőrzésére, hogy a vizsgált fehérjék posztranszlációs állapot eltérései-e, mennyiben tükröznek genetikai hajlamot jelentő, a hazai (dunántúli régió) populációra jellemző géneltérést.

Lehetőséget nyújt a világirodalomban publikált géneltérések, „kandidáns gének” betegség és populáció specificitásának vizsgálatára a hazai mintákon.

Lehetőség nyílik új géneltérések feltárására és a betegség-kapcsolat genom szintű vizsgálatára. Ezek az eredmények biztosíthatják a „betegség specifikus” expressziós markerek feltárását, a korai és olcsó diagnosztikus tesztek kialakítását.

Vizsgálataink is bizonyították, hogy a fenotípust (betegséget) befolyásoló genetikai jegyek populáció specifikusak (lehetnek), emiatt azok ellenőrzése feltételenül szükséges, mielőtt a mai technikákkal (Chip) ígért, sok ezer gén-polimorfizmus azonnali feldolgozásáról szóló, egyénre szabott orvoslás szédülete elragadná a gyakorlati orvoslást. Ennek a munkának pedig az alapja a népeiséget jellemző génbankok létrehozása, melyek biztosítják a lehetőséget az eltérő populációkon nyert genetikai adatok ellenőrzésére.

A génbank létrehozása óriási, kitartó, következetes és tapasztalatom szerint sok évet átölelő, de kikerülhetetlen munkát jelent. A Balatonfüredi Szívközpont Alapítvány és a DRC Kft. támogatásával, valamint az aktív közreműködéssel kialakult és folyamatosan fejlődő, diabéteszes és korai (perimenopauzában már meglévő) osteoporózisos családokat gyűjtő balatonfürdi génbank, ha földrajzilag nem is reprezentálja hazánkat, de populációs vonatkozásban az itt lévő mintegy 7000 minta, ami egyben 700 családot is jelent (2010-es adat) nagy segítséget jelenthet az idegen népeiségben nyert genetikai adatok ellenőrzésében, friss kutatások támogatásában. A fenotípus adatok számítógépes adatbázisba való felvétele lehetőséget teremt arra, hogy a minták között a felvitt adatok alapján válogassunk és válasszuk ki a kutatási témánkhoz szükséges anyagot. Az időközben elvégzett közel kétszáz klempt vizsgálat, és a hozzájuk kapcsolódó tárolt minták (DNS, plazma, mononukleáris sejt), valamint a fenotípus adatok pedig további fenotípus–genotípus kapcsolatok elemzésében nyújthatnak majd segítséget.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Meghatároztuk a vér kataláz enzim referens tartományát nőkben és férfiakban egyaránt.

Megtaláltuk a magyarországi hipokatalázémiás betegekben a kataláz gén promoter régiójának -21-es pozíciójában azt az A→T szubsztitúciót, ami a japán típusú akatalázémiában is megtalálható, valamint két új mutációt detektáltunk a -20-as és -18-as pozícióban.

5 új pont és 2 ismert frameshift mutációt detektáltunk a 2. exon és közvetlen környezetének vizsgálata során diabéteszes betegekben. Két új pontmutáció, a 96-os pozícióban lévő T→G és a 135-ös pozícióban lévő G→C missense mutáció olyan helyen okoz aminosav cserét, ami enzimaktivitás csökkenéshez vezethet. A két frameshift mutáció (GA illetve G inzerció a 2-es exonban) stop kodon beépülését okozza, így trunkált kataláz proteinek keletkeznek, ami csökkent katalázaktivitást okozhat.

Megállapítottuk, hogy a kataláz gén +22348C>T polimorfizmusának hatása glükóz anyagcserére és a csontok állapotára nemhez kötött. A T allél megjelenése protektív anyagcsere hatású, ami a fajfejlődés során kialakult negatív energia- és csont-metabolizmus kapcsolatnak megfelelően a férfiak esetében kedvezőtlen a femur állapotára. A kataláz gén polimorfizmus nemi specificitásában a nemek közötti zsírmegoszlás (viscerális és szubkután zsír eltérő aránya) és az adipokin (leptin) hatásban megmutatkozó különbségek játszhatnak szerepet. Adataink nem erősítették meg a koreai nőknél tett megfigyeléseket, miszerint a T allél alacsonyabb osteocalcin vérszintekkel és magasabb femur denzitással társul.

Eltérően expresszáldott géneket mutattunk ki diabéteszben differential display analízissel, melyek jelentőségét a későbbi genom vizsgálatok is igazolták.

Nem találtunk szignifikáns eltérést a GRB10 +11275G>A polimorfizmusát vizsgálva a kontroll és diabéteszes csoport között a magyarországi populációban. A nemekre jellemző testzsír, inzulin érzékenység, leptin/adiponektin arány és az allél variációk közötti összefüggések alapján feltételezhető, hogy a GG allélnak szerepe van a 2-es típusú diabétesz kialakulásában.

8. IRODALOMJEGYZÉK

8.1 A dolgozat megírásához felhasznált irodalom

1. Góth L. Kataláz, egy régi enzim új arculatai (könyv) Akadémiai Kiadó 2008.
2. Houstis N, Rosen DE, Lander ES: Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of inzulin resistance. *Nature*. 2006; 440: 944-948
3. Li G, Zhang P, Wang J, Gregg EW, Yang W, Gong Q, Li H, Li H, Jiang Y, An Y, Shuai Y, Zhang B, Zhang J, Thompson TJ, Gerzoff RB, Roglic G, Hu Y, Bennett PH The long-term effect of lifestyle interventions to prevent diabetes in the China Da Qing Diabetes Prevention Study: a 20-year follow-up study. *Lancet*. 2008; 371(9626): 1783-1789.
4. Jermendy Gy: Megelőzhető-e a 2-es típusú diabetes? *Orv. Hetil*. 2003; 144: 1909-1917
5. Uusitupa M, Peltonen M, Lindström J, Aunola S, Ilanne-Parikka P, Keinänen-Kiukaanniemi S, Valle TT, Eriksson JG, Tuomilehto J: Finnish Diabetes Prevention Study Group. Ten-year mortality and cardiovascular morbidity in the Finnish Diabetes Prevention Study--secondary analysis of the randomized trial. *PLoS ONE*. 2009; 4(5): e5656
6. Lillioja S, Wilton A.: Agreement among type 2 diabetes linkage studies but a poor correlation with results from genome-wide association studies. *Diabetologia*. 2009; 52(6): 1061-1074
7. Hara I, Ichise N, Kojima K, Kondo H, Ohgiya S, Matsuyama H, Yumoto I.: Relationship between the size of the bottleneck 15 A from iron in the main channel and the reactivity of catalase corresponding to the molecular size of substrates. *Biochemistry*. 2007; 46(1): 11-22
8. Sen CK, Packer L.: Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J*. 1996; 10(7): 709-720 Review

9. Hampton MB, Orrenius S.: Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett.* 1997: 414(3): 552-556
10. Khan AU, Wilson T.: Reactive oxygen species as cellular messengers. *Chem Biol.* 1995: 2(7): 437-445 Review
11. Lazarow PB, de Duve C.: The synthesis and turnover of rat liver peroxisomes. V. Intracellular pathway of catalase synthesis. *J Cell Biol.* 1973: 59(2 Pt 1): 507-524
12. Chistiakov DA, Zotova EV, Savost'anov KV, Bursa TR, Galeev IV, Stokov IA, Nosikov VV.: The 262T>C promoter polymorphism of the catalase gene is associated with diabetic neuropathy in type 1 diabetic Russian patients. *Diabetes Metab.* 2006: 32(1): 63-68
13. Forsberg L, Lyrenäs L, de Faire U, Morgenstern R.: A common functional C-T substitution polymorphism in the promoter region of the human catalase gene influences transcription factor binding, reporter gene transcription and correlated to blood catalase levels. *Free Radic Biol Med.* 2001: 30(5): 500-505
14. Jiang Z, Akey JM, Shi J, Xiong M, Wang Y, Shen Y, Xu X, Chen H, Wu H, Xiao J, Lu D, Huang W, Jin L.: A polymorphism in the promoter region of catalase is associated with blood pressure levels. *Hum Genet.* 2001: 109(1): 95-98
15. Wen JK, Osumi T, Hashimoto T, Ogata M.: Molecular analysis of human acatalasemia: identification of a splicing mutation *J.Mol Biol.* 1990: 211: 383-393
16. Góth L, Vitai M.: Polymorphism of 5' of the catalase gene in Hungarian acatalasemia and hypocatalasemia. *Electrophoresis.* 1997: 18(7): 1105-1108
17. Góth L.: Genetic heterogeneity of the 5' uncoding region of the catalase gene in Hungarian acatalasemic and hypocatalasemic subjects. *Clin Chim Acta.* 1998: 271(1): 73-78
18. Casp CB, She JX, McCormack WT.: Genetic association of the catalase gene (CAT) with vitiligo susceptibility. *Pigment Cell Res.* 2002: 15(1): 62-66

19. Kishimoto Y, Murakami Y, Hayashi K, Takahara S, Sugimura T, Sekiya T
Detection of a common mutation of the catalase gene in Japanese acatalasemic patients. *Hum Genet.* 1992; 88: 487-490
20. Góth L, Vitai M, Rass P, Sükei E, Páy A.: Detection of a novel familial catalase mutation (Hungarian type D) and the possible risk of inherited catalase deficiency for diabetes mellitus. *Electrophoresis.* 2005; 26(9): 1646-1649
21. Vitai M, Fátrai S, Rass P, Csordás M, Tarnai I.: Simple PCR heteroduplex, SSCP mutation screening methods for the detection of novel catalase mutations in Hungarian patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Chem Lab Med.* 2005; 43(12): 1346-1350
22. Riggs BL., Melton III LJ., Oberg AL., Atkinson EK., Khosla S.: Substantial trabecular bone loss occurs in young adult women and men: a population-based longitudinal study. *J Bone Miner Res.* 2005: 20S4
23. Riggs BL, Melton LJ, Robb RA, Camp JJ, Atkinson EJ, McDaniel L, Amin S, Rouleau PA, Khosla S.: A population-based assessment of rates of bone loss at multiple skeletal sites: evidence for substantial trabecular bone loss in young adult women and men. *J Bone Miner Res.* 2008; 23(2): 205-214
24. Flekac M, Skrha J, Hilgertova J, Lacinova Z, Jarolimkova M.: Gene polymorphisms of superoxide dismutases and catalase in diabetes mellitus. *BMC Med Genet.* 2008; 9: 30
25. Manolagas SC, Almeida M.: Gone with Wnts: β -catenin, TCF, FOXO, and oxidative stress in age-dependent diseases of bone, lipid, and glucose metabolism. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 2605-2614
26. Lean JM, Davies JT, Fuller K, Jagger CJ, Kirstein B, Partington GA, Urry ZL, Chambers TJ.: A crucial role for thiol antioxidants in estrogen-deficiency bone loss. *J Clin Invest.* 2003; 112: 915-23
27. Ozgocmen S, Kaya H, Fadillioglu E, Aydogan R, Yilmaz Z.: Role of antioxidant systems, lipid peroxidation, and nitric oxide in postmenopausal osteoporosis. *Mol Cell Biochem.* 2007; 295: 45-52

28. Suda N, Morita I, Kuroda T, Murota S.: Participation of oxidative stress in the process of osteoclast differentiation. *Biochim Biophys Acta*. 1993; 1157(3): 318-323
29. Góth L.: Lipid and carbohydrate metabolism in acatalasemia. *Clin Chem*. 2000; 46(4): 564-566
30. Anderson EJ, Lustig ME, Boyle KE, Woodlief TL, Kane DA, Lin CT, Price JW 3rd, Kang L, Rabinovitch PS, Szeto HH, Houmard JA, Cortright RN, Wasserman DH, Neuffer PD.: Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *J Clin Invest*. 2009; 119(3): 573–581
31. Wei Y, Sowers JR, Clark SE, Li W, Ferrario CM, Stump CS.: Angiotensin II-induced skeletal muscle insulin resistance mediated by NF- κ B activation of NADPH oxidase. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008; 294(2): E345-351
32. Oh B, Kim SY, Kim DJ, Lee JY, Lee JK, Kimm K, Park BL, Shin HD, Kim TH, Park EK, Koh JM, Kim GS.: Associations of catalase gene polymorphisms with bone mineral density and bone turnover markers in postmenopausal women. *J Med Genet*. 2007; 44(1): e62
33. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G.: Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell*. 2007; 130(3): 456-469
34. Buday B, Horváth T, Kulcsár E, Salamon C, Literáti Nagy B, Barta K, Vitai M, Józsa R, Vecsei I, Bezzegh K, Kiss J, Péterfai E, Koltay L, Korányi L.: A progrediáló inzulinrezisztencia hatása a glükózanyagcsere csontállapot kapcsolatokra *Orv Hetil*. 2007; 148(24): 1127-1133 Hungarian.
35. Buday B, Kulcsár E, Literáti Nagy B, Horváth T, Vitai M, Vecsei I, Bezzegh K, Kiss J, Péterfai E, Koltay L, Korányi L. Az osteocalcin helye a humán cukor- és csontanyagcsere kapcsolatában *Orv Hetil*. 2008; 149(52): 2453-2461 Hungarian.

36. Halmos T, Jeremendy Gy.: Diabetes mellitus-Elmélet és klinikum (könyv) Medicina kiadó 2002
37. Reaven GM: Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human diseases. *Diabetes*. 1988; 37: 1595-1607
38. Petersen KF, Shulman GI.: Etiology of insulin resistance. *Am J Med*. 2006; 119: S10-S16
39. Buday B, Horváth T, Literáti Nagy B, Kulcsár E, Barta K, Salamon Cs, Péterfai É, Korányi L.: A hagyományosan használt inzulinrezisztencia- és béta-sejt-funkciós indexek diagnosztikus értéke. *Diabetologia Hungarica*. 2007; 15: 93-105
40. Jahn T, Seipel P, Urschel S, Peschel C, Duyster J.: Role for the adaptor protein GRB10 in the activation of Akt. *Mol Cell Biol*. 2002; 22(4): 979-91
41. Holt LJ, Siddle K.: GRB10 and Grb14: enigmatic regulators of insulin action--and more? *Biochem J*. 2005; 388(Pt 2): 393-406. Review
42. Wang L, Balas B, Christ-Roberts CY, Kim RY, Ramos FJ, Kikani CK, Li C, Deng C, Reyna S, Musi N, Dong LQ, DeFronzo RA, Liu F.: Peripheral disruption of the GRB10 gene enhances insulin signaling and sensitivity in vivo. *Mol Cell Biol*. 2007; 27(18): 6497-6505
43. Smith FM, Holt LJ, Garfield AS, Charalambous M, Koumanov F, Perry M, Bazzani R, Sheardown SA, Hegarty BD, Lyons RJ, Cooney GJ, Daly RJ, Ward A.: Mice with a disruption of the imprinted Grb10 gene exhibit altered body composition, glucose homeostasis, and insulin signaling during postnatal life. *Mol Cell Biol*. 2007; 27(16): 5871-5886
44. Deng Y, Zhang M, Riedel H.: Mitogenic roles of Gab1 and GRB10 as direct cellular partners in the regulation of MAP kinase signaling. *J Cell Biochem*. 2008; 105(5): 1172-1182

45. Rampersaud E, Damcott CM, Fu M, Shen H, McArdle P, Shi X, Shelton J, Yin J, Chang YP, Ott SH, Zhang L, Zhao Y, Mitchell BD, O'Connell J, Shuldiner AR.: Identification of novel candidate genes for type 2 diabetes from a genome-wide association scan in the Old Order Amish: evidence for replication from diabetes-related quantitative traits and from independent populations. *Diabetes*. 2007; 56(12): 3053-3062
46. Di Paola R, Ciociola E, Boonyasrisawat W, Nolan D, Duffy J, Miscio G, Cisternino C, Fini G, Tassi V, Doria A, Trischitta V.: Association of hGRB10 genetic variations with type2 diabetes in Caucasian subjects. *Diabetes Care*. 2006; 29: 1181-1183
47. Vitai M, Góth L.: Reference range of normal blood catalase activity and levels in familial hypocatalasemia. *Clin Chim Acta* 1997; 261: 35-42
48. Lahti A, Petersen PH, Boyd JC, Rustad P, Laake P, Solberg HE.: Partitioning of nongaussian-distributed biochemical reference data into subgroups. *Clin Chem*. 2004; 50(5): 891-900.
49. Koduah M, Iles TC, Nix BJ.: Centile charts I: new method of assessment for univariate reference intervals. *Clin Chem*. 2004; 50(5): 901-906.
50. Griffiths JK, Iles TC, Koduah M, Nix AB.: Centile charts II: alternative nonparametric approach for establishing time-specific reference centiles and assessment of the sample size required. *Clin Chem*. 2004; 50(5): 907-914.
51. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.: *Molecular cloning*, 2nd ed. Cold spring Harbor Laboratory press, 1989: 1659 pp.
52. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 1997;20(7): 1183-1197
53. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R.: Glucose clamp technique: a method for quantifying inzulin secretion and resistance. *Am J Physiol*. 1979; 237(3): E214-223
54. Solberg HE.: The IFCC recommendation on estimation of reference intervals. The RefVal program. *Clin Chem Lab Med*. 2004; 42(7): 710-714

55. Vitai M, Sükei E: A vér kataláz referencia tartományának vizsgálata
Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina 2004: 31: 89-95.
56. Crawford DR, Mirault ME, Moret R, Zbinden I, Cerutti PA.: Molecular defect
in human acatalasia fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988: 153(1):
59-66
57. Aebi H, Suter H, Feinstein RN.: Activity and stability of catalase in blood and
tissues of normal and acatalasemic mice. *Biochem Genet.* 1968: 2(3):245-251
58. Ogata M, Suzuki K, Satoh Y.: Characterization of human residual catalase of
an acatalasemic patient by isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate-
polyacrylamide gel electrophoresis followed by electrophoretic blotting and
immunodetection. *Electrophoresis.* 1989: 10(3): 194-198
59. Ogata M.: Acatalasemia *Hum Genet.* 1991: 86(4):331-340. Review
60. Góth L.: Two cases of acatalasemia in Hungary *Clin Chim Acta* 1992: 207:
155-156
61. Góth L, Páy A.: Genetic heterogeneity in acatalasemia. *Electrophoresis.* 1996:
17(8): 1302-1303
62. Góth L.: Charecterization of acatalasemia detected in two Hungarian sisters
Enzyme 1992: 46: 252-258
63. Góth L, Eaton JW.: Hereditary catalase deficiencies and increased risk of
diabetes. *Lancet* 2000: 356: 1820-1821
64. Góth L, Lenkey A, Bigler WN.: Blood catalase deficiency and diabetes in
Hungary. *Diabetes Care.* 2001: 24(10): 1839-1840
65. Góth L, Shemirani A, Kalmár T.: A novel catalase mutation (a GA insertion)
causes the Hungarian type A of acatalasemia. *Blood Cells Mol Dis* 2000: 26:
151-154
66. Góth L, Rass P, Madarasi I.: A novel catalase mutation detected by PCR-SSCP,
nucleotide sequencing and Western blot analyses is responsible for the type C
of Hungarian acatalasemia. *Electrophoresis.* 2001: 22: 49-51

67. Góth L.: A novel catalase mutation (a G insertion in exon 2) causes the type B of the Hungarian acatalasemia. *Clin Chim Acta* 2001; 311: 161-163.
68. Góth L.: A new type of inherited catalase deficiencies. Its characterization and comparison to the Japanese and Swiss type of acatalasemia. *Blood Cells Mol Dis.* 2001; 27: 512-517
69. Liang P, Pardee AB.: Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science.* 1992; 257(5072): 967-971
70. Kumagai S, Kishimoto H, Masatakasuwa, Zou B, Harukasasaki.: The leptin to adiponectin ratio is a good biomarker for the prevalence of metabolic syndrome, dependent on visceral fat accumulation and endurance fitness in obese patients with diabetes mellitus. *Metab Syndr Relat Disord.* 2005; 3: 85-94
71. Zhuo Q, Wang Z, Fu P, Piao J, Tian Y, Xu J, Yang X.: Comparison of adiponectin, leptin and leptin to adiponectin ratio as diagnostic marker for metabolic syndrome in older adults of Chinese major cities. *Diabetes Res Clin Pract.* 2009; 84: 27-33
72. Saad MF, Damani S, Gingerich RL, Riad-Gabriel MG, Khan A, Boyadjian R, Jinagouda SD, el-Tawil K, Rude RK, Kamdar V.: Sexual dimorphism in plasma leptin concentration. *Nat Med.* 1996; 2(9): 949-950
73. Vitai M, Kocsordi K, Buday B, Literáti Nagy B, Kulcsár E, Bezzegh K, Péterfai É, Koltay László, Korányi L.: Nemhez kötött a kataláz gén polimorfizmus (RS769217) hatása az energia háztartásra és a csontok állapotára *Orv Hetil.* 2010; 151(23): 923-931. Hungarian.
74. Vitai M, Buday B, Kulcsár E, Literáti-Nagy B, Vecsei I, Bezzegh K, Péterfai E, Kurucz I, Korányi L.: A GRB10 gén (+11275G > A) polimorfizmusának hazai előfordulása és kapcsolata a cukoranyagcserével *Orv Hetil.* 2009; 150(40): 1845-1851. Hungarian.

8.2 Saját közleményeim



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK /25/2011.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Dr. Vitai Márta
Neptun kód: Q37SRW
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Vitai M.**, Kocsordi K., Buday B., Literáti-Nagy B., Kulcsár E., Bezzegh K., Péterfai É., Koltay L., Korányi L.: Nemhez kötött a katalázgén-polimorfizmus (RS769217) hatása az energia-háztartásra és a csontok állapotára.
Orv. Hetil. 151 (23), 923-931, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2010.28893>
2. **Vitai M.**, Buday B., Kulcsár E., Literáti-Nagy B., Vecsei I., Bezzegh K., Péterfai É., Kurucz I., Korányi L.: A GRB10 gén (+11275G > A) polimorfizmusának hazai előfordulása és kapcsolata a cukoranyagcserével.
Orv. Hetil. 150 (40), 1845-1851, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2009.28729>
3. Góth, L., **Vitai, M.**, Rass, P., Sükei, E., Páy, A.: Detection of a novel familial catalase mutation (Hungarian type D) and the possible risk of inherited catalase deficiency for diabetes mellitus.
Electrophoresis. 26 (9), 1646-1649, 2005.
IF:3.85
DOI: <http://dx.doi.org/DOI 10.1002/elps.200410384>
4. **Vitai, M.**, Fátrai, S., Rass, P., Csordás, M., Tarnai, I.: Simple PCR heteroduplex, SSCP mutation screening methods for the detection of novel catalase mutations in Hungarian patients with type 2 diabetes mellitus.
Clin. Chem. Lab. Med. 43 (12), 1346-1350, 2005.
IF:1.918
DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/CCLM.2005.230>
5. **Vitai M.**, Sükei E.: A vér kataláz referencia tartományának vizsgálata.
Klin. Kísér. Lab. Med. 31, 89-95, 2004.



6. Góth, L., **Vitai, M.**: Polymorphism of 5' of the catalase gene in Hungarian acatalasemia and hypocatalasemia.
Electrophoresis. 18 (7), 1105-1108, 1997.
IF:2.848
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/elps.1150180714>
7. **Vitai, M.**, Góth, L.: Reference ranges of normal blood catalase activity and levels in familial hypocatalasemia in Hungary.
Clin. Chim. Acta. 261 (1), 35-42, 1997.
IF:1.067
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0009-8981\(97\)06514-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0009-8981(97)06514-5)

További Közlemények

8. Buday B., Kulcsár E., Literáti-Nagy B., Horváth T., **Vitai M.**, Vecsei I., Bezzegh K., Kiss J., Péterfai É., Koltay L., Korányi L.: Az osteocalcin helye a humán cukor- és csontanyagcsere kapcsolatában.
Orv. Hetil. 149 (52), 2453-2461, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2008.28518>
9. Buday B., Horváth T., Kulcsár E., Salamon C., Literáti-Nagy B., Barta K., **Vitai M.**, Józsa R., Vecsei I., Bezzegh K., Kiss J., Péterfai É., Koltay L., Korányi L.: A progrediáló inzulinrezisztencia hatása a glükózanyagcsere csontállapot kapcsolatokra.
Orv. Hetil. 148 (24), 1127-1133, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2007.28072>
10. Buday, B., Horváth, T., Kulcsár, E., Salamon, C., Literáti-Nagy, B., Barta, K., **Vitai, M.**, Józsa, R., Vecsei, Z., Bezzegh, K., Kiss, J., Koltay, L., Korányi, L.: The Effect of Progressive Insulin Resistance on the Relationship between Glucose Metabolism and Bone Status.
Hungarian Med. J. 1 (3), 295-305, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH-HMJ.2007.28072>
11. Rass P., **Vitai M.**, Tarnai I., Sükei E., Páy A.: A humán kataláz gén mutációi Magyarországon.
Klin. Kísér. Lab. Med. 31, 129-135, 2004.



12. Góth, L., **Vitai, M.**: The effects of hydrogen peroxide promoted by homocysteine and inherited catalase deficiency on human hypocatalasemic patients.
Free Radic. Biol. Med. 35 (8), 882-888, 2003.
IF:5.063
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(03\)00435-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(03)00435-0)
13. Kurucz, I., Tombor, B., Prechl, J., Erdő, F., Hegedűs, E., Nagy, Z., **Vitai, M.**, Korányi, L., László, L.: Ultrastructural localization of HSP-72 examined with a new polyclonal antibody raised against the truncated variable domen of the heat shock protein.
Cell Stress Chaperones. 4 (2), 139-152, 1999.
IF:2.847
14. Góth L., **Vitai M.**, Mészáros I.: A hidrogénperoxid polarográfiás féllépcsőpotenciáljának változása a szérum fehérje mátrixának hatására.
Klin. Kísér. Lab. Med. 24, 203-206, 1997.
15. Góth, L., **Vitai, M.**: Hypocatalasemia In Hospital Patients.
Clin. Chem. 42 (2), 341-342, 1996.
IF:3.422
16. Góth, L., **Vitai, M.**: Hungarian hereditary acatalasemia and hypocatalasemia are not associated with chronic hemolysis.
Clin. Chim. Acta. 233 (1-2), 75-79, 1995.
IF:1.101
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0009-8981\(94\)05957-T](http://dx.doi.org/10.1016/0009-8981(94)05957-T)

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2011.02.04



9. TÁRGYSZAVAK ÉS RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Tárgyszavak:

kataláz enzim, akatalázémia, hipokatalázémia, GRB10 protein, insulin rezisztencia, osteoporózis, polimorfizmus, csontdenzitás, hiperinsulinémiás-euglikémiás klempe, glükóz anyagcsere, csontanyagcsere

catalase enzyme, acatalasemia, hypocatalasemia, GRB10 protein, insulin resistance, osteoporosis, polymorphism, bone density, hyperinsulinemic-euglycemic clamp, glucose metabolism, bone metabolism

Rövidítések:

ADA: American Diabetes Association

BMD F (g/cm²): femur nyak csontdenzitás

BMD L₁₋₄ (g/cm²): lumbáris csontdenzitás

BMD: bone mineral density (csontdenzitás)

BPS domen: Between PH and SH2 domain

CAT: kataláz (EC 1.11.1.6; hidrogénperoxid-hidrogénperoxid oxidoreduktáz)

DEXA: kettős röntgensugár abszorpciometria

DHEAs: dehidro-epiandroszteron-szulfát

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

FCS: fetal calf sera (magzati borjú szérum)

FRET: Fluorescence resonance energy transfer

GAUC: glucose area under curve

GRB10: growth faktor feceptor binding protein 10

HNK: hiperinzulinémiás-euglikémiás klempe

HOMA-IR: homeostasis model assessment

IFCC: International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory

IFG: impaired fasting glucose (emelkedett éhomi glükóz)

IGFR: insulin-like growth factor

IGT: impaired glucose tolerance (csökkent glükóz tolerancia)

IR: insulin receptor

IRS: insulin-receptor substrat

IvGTT: intravénás glükóz tolerancia teszt

M1 érték: teljes test glükóz fogyasztása (mg/kg/min)

M2 érték: zsírmentes testtömeg glükóz felhasználása (mg/kg izom/min)

M3 érték: zsírszövet glükóz felhasználása (mg/kg zsírszövet/min)

MAPK: mitogén aktivált protein kináz

OGTT: orális glükóz tolerancia teszt

P1NP: 1-es típusú teljes prokollagén amino-terminális propeptid

PI-3 kináz: Phosphoinositide 3 kináz

PPAR : peroxisome proliferator-activated receptor

RFLP: restriction-fragment length polymorphism

ROS: reactiv oxigen species

SNP: single nucleotid polymorphism

SOD: szuperoxid dismutase

β crosslaps: 1-es típusú kollagén C terminális telopeptid

SSCP: single-stranght conformational polymorhism

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban köszönetemet szeretném kifejezni a témavezetőmnek, Prof. Dr. Góth László egyetemi tanárnak és a mentoromnak, Prof. Dr. Korányi László címzetes egyetemi tanárnak. Ahogy mondani szokás, nélkülük ez a dolgozat „nem jöhetett volna létre”. Góth László volt, aki először megszerettette velem a humán diagnosztikát, megtanította a szakmát, megkövetelte tőlem, hogy a rutin feladatokon kívül mással is foglalkozzak, képezem magamat, rendszerezem ismereteimet. Végig figyelemmel kísérte a munkámat, ösztönzött a dolgozat elkészítésére, szakmai tanácsokkal látott el, biztosította a kísérletek egy részének elvégzéséhez szükséges anyagokat és helyet. Miután más munkahelyre kerültem, Korányi László vette át az „atyai” szerepet, gondoskodott az újabb és újabb témákról, anyagokról, eszközökről és irányított. Híven követve Góth László példáját, ő is mindig arra inspirált, hogy ne hagyjam abba a kutatómunkát, írjak cikkeket, írjam meg a dolgozatomat. Mindketten rendszeresen és tisztán jóindulatból számon kérték rajtam a munkát. Az ő kettejük buzdítása és noszogatása nélkül sohasem lett volna erőm a napi munka mellett a dolgozatot megírni. Ők hitették el velem, hogy ezek az eredmények érdemesebbek annál, mintsem egy fiókban tároljam.

Köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Kurucz Istvánnak is, aki megtanított a molekuláris módszerek alapjaira, a kitartásra, a szisztematikus és precíz munkára, a hibakeresésre és a gondolkodásra.

Köszönöm azoknak a kollégáknak és kolléganőknek a segítségét, akik részt vettek a kísérleti munkák elvégzésében. Külön köszönet Vecsei Istvánné Zsuzsának, akivel heteken keresztül mértük az anyagcsere paramétereiket, Kiss Erzsébet Deninek, akivel hóban-fagyban gyűjtöttük a családmintákat, Handler Andrásné Zsuzsának és Trejer Ferencné Máriának, akik azt a rengeteg kataláz aktivitást megmérték, Kocsordi Krisztinának, aki kataláz polimorfizmus vizsgálatok egy részét végezte.

Köszönet azoknak a cégeknek és képviselőiknek, akik sokszor ingyenes reagenseket adtak, primer tervező szoftvert bocsátottak a rendelkezésemre stb.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a Mamának, a családomnak, a barátaimnak, hogy kibírták velem ezt a hosszú időt és megértették, hogy néha a „tudomány” miatt nincs kész valami, vagy a miatt nem mehetünk kirándulni, túrázni.

11. FÜGGELÉK

A Ph.D. alapjául szolgáló közleményeim másolata:

1. Orv Hetil. 2010: 151(23): 923-931. Hungarian. **(73)**
2. Orv Hetil. 2009: 150(40): 1845-51. Hungarian. **(74)**
3. Electrophoresis. 2005: 26(9): 1646-9 **(20)**
4. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2005: 43(12):1346-1350 **(21)**
5. Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina 2004: 31: 89-95 **(55)**
6. Electrophoresis. 1997: 18(7): 1105-1108. **(16)**
7. Clinica Chimica Acta 1997: 261 (1): 35-42 **(47)**