

ABC transzporterek genetikai polimorfizmusainak vizsgálata aszimmetrikus PCR-t követő olvadáspont analízis alkalmazásával

Doktori értekezés

Szilvási Anikó

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Sarkadi Balázs, kutatóorvos, MTA rendes tagja;
Dr. Tordai Attila, laboratóriumvezető, MTA doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Krikovszky Dóra, Ph.D.
Dr. Karcagi Veronika, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Fekete György igazgató, egyetemi tanár,
MTA rendes tagja

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Vásárhelyi Barna, laboratóriumvezető, MTA
doktora;
Dr. László Glória egyetemi adjunktus, tudományok
kandidátusa

Budapest
2011

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
Ábrák jegyzéke	5
Táblázatok jegyzéke	6
1 Bevezetés	7
1.1 Cerebro- és cardiovasculáris betegségek	7
1.1.1 Stroke	7
1.1.2 Ischaemiás szívbetegség	8
1.1.3 Kockázati tényezők	8
1.1.4 Genetikai rizikófaktorok azonosításának módszerei	9
1.2 Olvadáspont analízisen alapuló genotipizálás LightCycler készüléken	12
1.3 ABC transzporterek	14
1.3.1 Tangier betegség	15
1.3.2 ABCA1	17
1.3.3 Sitosterolémia	17
1.3.4 ABCG5 és ABCG8	18
1.3.5 ABC transzporterek a lipoprotein metabolizmusban	20
2 Célkitűzések	22
3 Módszerek	24
3.1 A vizsgálatokban résztvevő személyek	24
3.1.1 Stroke betegek csoportja	24
3.1.2 Ischaemiás szívbeteg csoportja	26
3.1.3 Kontroll csoport	26
3.2 Alkalmazott laboratóriumi módszerek	27
3.2.1 DNS izolálás	27
3.2.2 Polimorfizmusok kimutatása olvadásgörbe analízissel	27
3.2.3 Szekvenálás	30
3.2.4 Lipid paraméterek meghatározása	30
3.3 Statisztikai módszerek	31
4 Eredmények	33
4.1 Olvadáspont analízis optimalizálása a LightCycler készüléken	33
4.2 ABCA1 és ABCG8 polimorfizmusok vizsgálata	39

4.2.1	Genotípusok meghatározása	39
4.2.2	Allélgyakoriságok.....	40
4.2.3	Genotípus gyakoriságok	42
4.2.4	Alcsoport vizsgálatok	42
4.2.5	A variánsok kapcsoltsági eredményei	50
4.2.6	Szérum koleszterin szint vizsgálatok.....	53
4.2.7	Új ABCG8 variáns azonosítása	54
5	Megbeszélés	57
5.1	Aszimmetrikus PCR-t követő olvadáspont analízis	57
5.2	ABC transzporterek polimorfizmusainak vizsgálata.....	59
5.2.1	Allél gyakoriságok.....	59
5.2.2	Az ABCA1 és ABCG8 genotípusainak kapcsolata a stroke-kal és ISZB- vel	60
5.2.3	Kapcsoltsági eredmények	68
5.3	Új ABCG8 variáns (T401S) azonosítása.....	68
6	Következtetések.....	69
7	Összefoglalás.....	72
8	Summary.....	73
9	Irodalomjegyzék	74
10	Saját közlemények jegyzéke.....	88
11	Köszönetnyilvánítás	90
	Függelék	91
1. függelék:	Az allél diszkriminációs módszerekhez alkalmazott amplifikációs primerek és hibridizációs szondák nukleotid szekvenciái	91
2. függelék:	Asymmetric PCR increases efficiency of melting peak analysis on the LightCycler	92
3. függelék:	Decreased frequencies of ABCA1 polymorphisms R219K and V771M in Hungarian patients with cerebrovascular and cardiovascular diseases.....	96
4. függelék:	Frequencies of four ATP-binding cassette transporter G8 polymorphisms in patients with ischemic vascular diseases	102

Rövidítések jegyzéke

ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1 (ABC transzporter géncsalád A1-es génje)
ABCG2	ATP-binding cassette transporter G1 (ABC transzporter géncsalád G2-es génje; BCRP; MXR)
ABCG5	ATP-binding cassette transporter G5 (ABC transzporter géncsalád G5-ös génje; sterolin-1)
ABCG8	ATP-binding cassette transporter G8 (ABC transzporter géncsalád ABCG8-as génje; sterolin-2)
AF	Allele Frequency (allélgyakoriság)
ISZB	Ischaemiás szívbetegség
FII	II. véralvadási faktor (prothrombin)
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer (fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer)
FV	V. véralvadási faktor
HFE	Örökletes hemokromatózis gén
HDL	High Density Lipoprotein (nagy sűrűségű lipoprotein)
LDL	Low Density Lipoprotein (kis sűrűségű lipoprotein)
OR	Odds Ratio (esélyhányados; arányok aránya)
PCR	Polymerase Chain Reaction (polimeráz-láncreakció)
SD	Standard Deviation (tapasztalati szórás)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (egy nukleotidot érintő polimorfizmus)
TG	Triglicerid
TIA	Transient Ischaemic Attack (átmeneti keringési zavar)

Ábrák jegyzéke

1. ábra: Fluorofórral jelölt hibridizációs szondák és a fluoreszcencia energia transzfer (FRET) jelensége.....	13
2. ábra: Az ABCA (A) és ABCG (B) géncsaládok membrán topológiai modelljei.....	14
3. ábra: Az ABCA1 transzporter membrán topológiai modellje.....	16
4. ábra: A koleszterin és a β -sitosterol szerkezetének összehasonlítása.....	17
5. ábra: Az STSL lókuszon belüli ismert mutációk és polimorfizmusok.....	19
6. ábra: ABC transzporterek a lipoproteinek metabolizmusban.....	21
7. ábra: Az V. faktor Leiden mutáció vizsgálata során alkalmazott oligonukleotidok (primerek és szondapárok) sematikus elhelyezkedése az V. faktor génen... 29	
8. ábra: Szimmetrikus PCR-t követő olvadáspont analízis (FV Leiden).....	33
9. ábra: Aszimmetrikus PCR-t követő olvadáspont analízis (FV Leiden)	34
10. ábra: Különböző primer arányokkal kivitelezett PCR-t követő olvadáspont analízisek görbe alatti terület értékei	35
11. ábra: Nukleotid bázispárok stabilitási sora.....	36
12. ábra: A sense és antisense szondapárokkal és eltérő amplifikációs primer arányokkal végzett olvadáspont analízis görbék összehasonlítása.....	37
13. ábra: Különböző amplifikációs primer arányok hatása az olvadáspont analízis görbe alatti területének nagyságára négy genotipizáló rendszerben.....	39
14. ábra: ABCG8 polimorfizmusok (D19H, A632V, T400K és Y54C) olvadáspont görbéi.....	40
15. ábra: ABCA1 R219K hordozó (RK+KK) genotípusok (A) és ABCA1 V771M hordozó (VM+MM) genotípusok (B) gyakoriságának összehasonlítása a kontroll és betegcsoportokban.....	44
16. ábra: Y54C gyakori allélra (YY) homozigóták gyakoriságának összehasonlítása a kontroll és a stroke alcsoportokban.....	48
17. ábra: Új ABCG8 variáns (T401S) azonosítása.....	56

Táblázatok jegyzéke

1. táblázat: Stroke betegcsoport klinikai paraméterei.....	25
2. táblázat: Ischaemiás szívbetegek klinikai paraméterei.....	26
3. táblázat: Kontroll csoport klinikai paraméterei	26
4. táblázat: A vizsgált genetikai variánsok legfontosabb paraméterei.....	28
5. táblázat: ABCA1 R219K, V771M, M883I és ABCG8 D19H, Y54C, T400K, A632V allél variánsok genotípusok szerinti megoszlása a kontroll és a beteg csoportokban.....	41
6. táblázat: A beteg és kontroll csoportok allél- és genotípus gyakoriság eltérései különböző alcsoport bontásokban	46
7. táblázat: Az ABCA1 lókuszok (R219K, V771M, I883M) közötti kapcsoltsági analízis (linkage disequilibrium) eredménye.....	51
8. táblázat: Az ABCG8 lókuszok (D19H, Y54C, T400K, A632V) közötti kapcsoltsági analízis (linkage disequilibrium) eredménye.....	51
9. táblázat: ABCA1 haplotípus gyakoriságok a betegek és kontroll összevonásával létrehozott összesített csoportban	53
10. táblázat: ABCG8 haplotípus gyakoriságok a betegek és kontroll összevonásával létrehozott összesített csoportban	53
11. táblázat: A kontroll csoport koleszterin szint értékei (a teljes csoportban, illetve az Y54C genotípus szerint képzett alcsoportokban)	54
12. táblázat: Magyarországi ABCA1 és ABCG8 variánsok allélgyakoriság értékeinek (%) összehasonlítása külföldi adatokkal.....	60

1 Bevezetés

1.1 Cerebro- és cardiovasculáris betegségek

Az ischaemiás szívbetegség (ISZB) és a stroke a halálozási statisztikák élén állnak. Az ISZB a vezető halálok világszerte, amit a rangsorban a malignus betegségek, majd a stroke követ (Lloyd-Jones és *mtsai* 2010). ISZB-ben több mint 7 millióan, stroke következtében közel 6 millióan halnak meg évente (Mackay és *mtsai* 2004).

1.1.1 Stroke

A stroke az Egészségügyi Világszervezet (WHO) megfogalmazása szerint: „A stroke az agyműködés vérellátási zavara által okozott, globális vagy fokális zavarral jellemezhető, gyorsan kialakuló klinikai tünetegyüttes, amely több mint 24 órán keresztül áll fenn vagy halált okoz, s amelynek bizonyíthatóan nincs más oka, mint az agyi érrendszerben kialakult elváltozás.” A definíció egy igen heterogén betegségcsoportot takar (Truscott 1972).

Kialakulását tekintve az esetek 80-85%-a ischaemiás stroke, amit leggyakrabban artériás elzáródás okoz (mintegy 75%-ban atherotrombózis, 25%-ban embólia). A fennmaradó 15-20% kialakulását tekintve vérzéses stroke (Adams és *mtsai* 1993).

Időbeli lefolyása alapján a stroke négy fajtáját különböztetjük meg. A legenyhébb az átmeneti keringési zavar (TIA: transient ischaemic attack), amelynek tünetei 24 órán belül oldódnak. A következő alcsoport a reverzibilis ischaemiás neurológiai deficit (RIND), melynek tünetei 24 órán túl, általában 3 héten belül oldódnak. A progresszív stroke (PRIND: progresszív reverzibilis ischaemiás neurológiai deficit) esetében a tünetek a beteg megfigyelése alatt fokozatosan alakulnak ki, illetve rosszabbodnak. A komplett stroke esetében a tünetek hirtelen teljes súlyosságukban alakulnak ki, később nem romlanak tovább.

A betegséget további szempontok szerint is csoportosítják. Súlyosság alapján megkülönböztetünk minor (rokkantságot nem okozó) és major (rokkantságot okozó) stroke-ot, etiológiája szerint trombotikus, embóliás és hemodinamikai zavar okozta stroke-ot (Maász és *mtsai* 2011).

1.1.2 Ischaemiás szívbetegség

Az ISZB a szívizom elégtelen vérellátásából eredő kórkép. Ha a szívizom oxigénigénye nő, azt bizonyos fiziológiás határon belül az artériák tágulása révén a fokozott vérátáramlás képes kiegyenlíteni. Az ISZB kialakulásának hátterében a legtöbb esetben atherosclerosis áll, vagyis koleszterin és lipid halmozódik fel az érfalban, az erek lumene beszűkül, vagy teljesen elzáródik.

A betegségnek 4 típusát különböztetjük meg: angina pectoris, akut myocardialis infarktus, krónikus ISZB és szív eredetű hirtelen halál. Az angina pectoris átmeneti myocardialis ischaemia, amely nem jár myocardialis elhalással. Az akut myocardialis infarktus esetében a szívizomsejtek irreverzibilis ischaemiás eredetű elhalása, nekrozisa következik be, a myocardium nem regenerálódik. A krónikus ISZB a myocardium lassú lefolyású ischaemiás károsodása, a kórlefordulás során kialakulhat angina pectoris vagy akut myocardialis infarktus is. Szív eredetű hirtelen halálról akkor beszélünk, ha a szívpanaszok jelentkezésétől számított hat órán belül beálló halál szív eredetű halál.

1.1.3 Kockázati tényezők

Az ischaemiás szívbetegségben szenvedők esetében az eltérő lipid és koagulációs faktor értékeket, illetve a magas vérnyomást már az 1940-es évek elején leírták (Jones és *mtsai* 1948). 1981-re több mint 200 ISZB rizikófaktort azonosítottak (Hopkins és *mtsai* 1981). Számos olyan rizikófaktor ismert, melyek mind az ISZB, mind a stroke kialakulásában szerepet játszanak. Ezek közé tartoznak a magas vérnyomás, az emelkedett low density lipoprotein (LDL) és triglicerid (TG) szintek, a csökkent high density lipoprotein (HDL) szint, a fizikai inaktivitás, az egészségtelen táplálkozás és a diabetes mellitus (Mackay és *mtsai* 2004).

Az ISZB esetében 75%-ban a hagyományos rizikófaktorok felelősek a betegség kialakulásáért (Mackay és *mtsai* 2004). A klasszikus rizikófaktorok a stroke előfordulásának csupán kb. 60%-ért felelősek, a maradék 40% esetében genetikai tényezők működnek közre a betegség kialakulásában.

A genetikai faktorok szerepét bizonyítja a mindkét betegség esetében megfigyelhető családi halmozottság. Egy elsőfokú családtag korai ISZB eseménye kb. duplájára emeli az egyén esetében a betegség kialakulásának kockázatát (Lloyd-Jones és *mtsai* 2004, Kaikkonen és *mtsai* 2006, Yusuf és *mtsai* 2004). Az ikervizsgálatok szintén

alátámasztják az örökletes tényezők szerepét. Egy svéd tanulmányban 21000 ikerpár 36 éves követése során, a myocardialis infarktus konkordanciája (annak a valószínűsége, hogy ha az ikerpár egyik tagja beteg, akkor a másik is beteg lesz) egypetűjű férfi ikerpároknál 26%, női ikerpároknál 27% volt, a kétpetűjű ikerpároknál ez az érték férfiak esetében 20%, nők esetében 16% volt. Az örökletes tényezők hozzájárulását férfiak esetében 57%-ra, nők esetében 38%-ra becsülték (Zdravkovic és *mtsai* 2002). A családi halmozottság és az egypetűjű ikrek magasabb konkordanciája a stroke esetében is kimutatható (Flossmann és *mtsai* 2004).

Szintén a genetikai tényezők fontos szerepét bizonyítja, hogy az ismert kockázati tényezők kialakulásához is viszonylag nagy arányban járulnak hozzá örökletes faktorok: például az emelkedett koleszterinhez szinthez 40-60%-ban, a HDL szinthez 45-75%-ban, a TG szinthez 40-80%-ban, a testtömeg indexhez 25-60%-ban, a szisztolés vérnyomáshoz 50-70%-ban (Lusis és *mtsai* 2004).

A genetikai tényezők számottevő hozzájárulása ellenére a mendeli öröklésmentet mutató (egygénese) ISZB formák ritkák. Az eddig azonosított mendeli öröklésmentet mutató ISZB esetében a mutációk általában az LDL és a HDL metabolizmusával vagy homeosztázisával kapcsolatos géneket érintik (Lusis és *mtsai* 2004). A két legismertebb ilyen betegség az örökletes hypercholesterinaemia és a familiáris defektív apolipoprotein B betegség. A cerebro- és cardiovascularis betegségek esetében jóval gyakoribbak a komplex öröklésmentű, multifaktoriális, azaz egy vagy több gén polimorfizmusai és a környezeti tényezők által együttesen befolyásolt formák. Az ilyen öröklésmentet mutató kórképeknél az egyes polimorfizmusok hozzájárulása csekély mértékű, amit egyéb polimorfizmusok vagy akár a környezeti tényezők jelentős mértékben befolyásolhatnak. A multifaktoriális betegségek kialakulásához hozzájáruló genetikai tényezők azonosítására többféle vizsgálati megközelítést alkalmaznak.

1.1.4 Genetikai rizikófaktorok azonosításának módszerei

1.1.4.1 Családvizsgálatok

A kapcsoltsági vizsgálatok során olyan családokat vizsgálnak, ahol a család tagjai között a betegség előfordulása gyakoribb az átlagnál. Olyan régiókat keresnek, ahol a genetikai polimorfizmusok a családfa érintett tagjai körében gyakrabban fordulnak elő, mint azt a mendeli öröklésment alapján várnánk. A kapcsoltsági

elemzések klasszikusan a monogénes mendeli öröklésmentet mutató betegségeknél sikeresek (Peltonen és *mtsai* 2001). Az ISZB esetében a családvizsgálatokat a betegség időskori megjelenése is nehezíti, a szülői minták gyakran már nem elérhetők, a fiatalabb generációk tagjai még sok esetben tünetmentesek. A cardiovascularis betegségek esetében a myocardiális infarktus és a stroke kialakulásában feltehetően szerepet játszó 5-lipoxigenáz aktiváló fehérjét (ALOX5AP) kódoló gén azonosítása egyike azon kevés eseteknek, ahol a kapcsoltsági analízis a cardiovascularis betegségek kutatása során sikerrel zárult (Helgadottir és *mtsai* 2004).

1.1.4.2 Betegség asszociációs vizsgálatok

Az asszociációs vizsgálatoknál egymással rokoni kapcsolatban nem álló személyeket vizsgálnak. Egyrészt a genetikai variánsok gyakoriságát hasonlítják össze a betegséget mutató és a betegséget nem mutató csoportok között (eset-kontroll vizsgálatok), másrészt a variáns és egy mennyiségi paraméter (mint például egy szérumban lipid értékek) kapcsolatát vizsgálják.

A kandidáns gén asszociációs vizsgálatánál, ismereteink alapján kiválasztanak egy (vagy akár több) gént, amelyet kandidáns génnek neveznek, és amelyről feltételezik, hogy szerepet játszhat egy adott betegség kialakulásában. A cardiovascularis betegségek esetén gyakran a lipid anyagcserében szerepet játszó géneket vizsgálják, ahogy a jelen dolgozatban bemutatott kutatások során magunk is két, a koleszterin transzportjában szerepet játszó ABC transzportert vizsgáltunk. A kandidáns gén asszociációs vizsgálatok során egyszerre egy vagy csak néhány variáns vizsgálnak, szemben a teljes-genom vizsgálatokkal, ahol akár milliós nagyságrendű SNP is vizsgálható egyszerre (Bevan és *mtsa* 2011). Az ISZB esetében a kandidáns gén vizsgálatával azonosított összefüggések tekintetében az egyéb populációkon végzett ismételt tanulmányok nem minden esetben végződtek az előzővel egyező eredménnyel (Arnett és *mtsai* 2007).

Az asszociációs vizsgálatok statisztikai erejének növelésére meta analíziseket végeznek, ahol több tanulmány betegadatait és eredményeit egyesítik. Az ilyen összehasonlítások esetében komoly limitáló tényező lehet, ha az egyedi tanulmányoknál esetlegesen eltérő a fenotípus definíciója/értelmezése, illetve ha a különböző vizsgált populációk nagyfokú heterogenitással rendelkeznek.

A teljes-genom vizsgálat (GWA: Genome Wide Association study) annyiban hasonlít a kandidáns gén asszociációs vizsgálatához, hogy itt is több ezer egymással nem-rokon személyt vizsgálnak, viszont nagyságrendekkel több marker meghatározását végzik el, a markerek a teljes genomon elszórtan helyezkednek el. A teljes-genom vizsgálatok statisztikai ereje nagy, viszont a jól jellemzett esetek ezrei szükségesek a vizsgálatához, és még így csak a betegséghez közepes mértékben hozzájáruló (tipikusan 1,2-1,5 közötti esélyhányados értékkel rendelkező) kockázati tényezők azonosítására alkalmasak (Bevan és *mtsa* 2011).

1.1.4.3 Egy nukleotidra kiterjedő polimorfizmusok (SNP-k)

A humán genomot kb. 3×10^9 bázispár alkotja, amiben eddig 20000 gént azonosítottak. A genomon számottevő genetikai változatosság figyelhető meg, melynek leggyakoribb megjelenési formája az egy nukleotidra kiterjedő polimorfizmus (SNP, single nucleotide polymorphism). A gének kódoló és szabályozó régióin kívül elhelyezkedő, ezáltal funkcióval feltehetően nem rendelkező SNP-ket, mint genetikai markereket, arra használják, hogy segítségükkel a velük genetikai kapcsoltságot mutató gének betegséget okozó variánsait azonosítsák (az ilyen esetekben az SNP-k közvetett kapcsolatban állnak a betegséggel). Az SNP-k kisebb hányada a gének kódoló vagy szabályozó régióin belül található. A kódoló régióban található SNP-k, amennyiben megváltoztatják a fehérje elsődleges szerkezetét, hatással lehetnek a fehérje funkciójára, míg a szabályozó régiót érintő SNP-k a fehérje expressziós szintjének változtatásával annak mennyiségi viszonyaira (az ilyen esetekben az SNP-k okozati, azaz közvetlen kapcsolatban állnak a betegséggel).

Az SNP-k vizsgálatára számos módszer terjedt el, ilyenek a restrikciós fragmens hosszúság polimorfizmus vizsgálat (RFLP), az allél-specifikus PCR-ek különböző fajtái, a DNS szekvenálás és a hibridizáción alapuló metodikák (a teljesség igénye nélkül).

A jelen dolgozat részben egy hibridizáción alapuló SNP vizsgálati metodikával, a PCR-termék és a hozzá hibridizáló szonda olvadási görbe analízisének alapuló allél-diszkrimináló technika optimalizálásával foglalkozik.

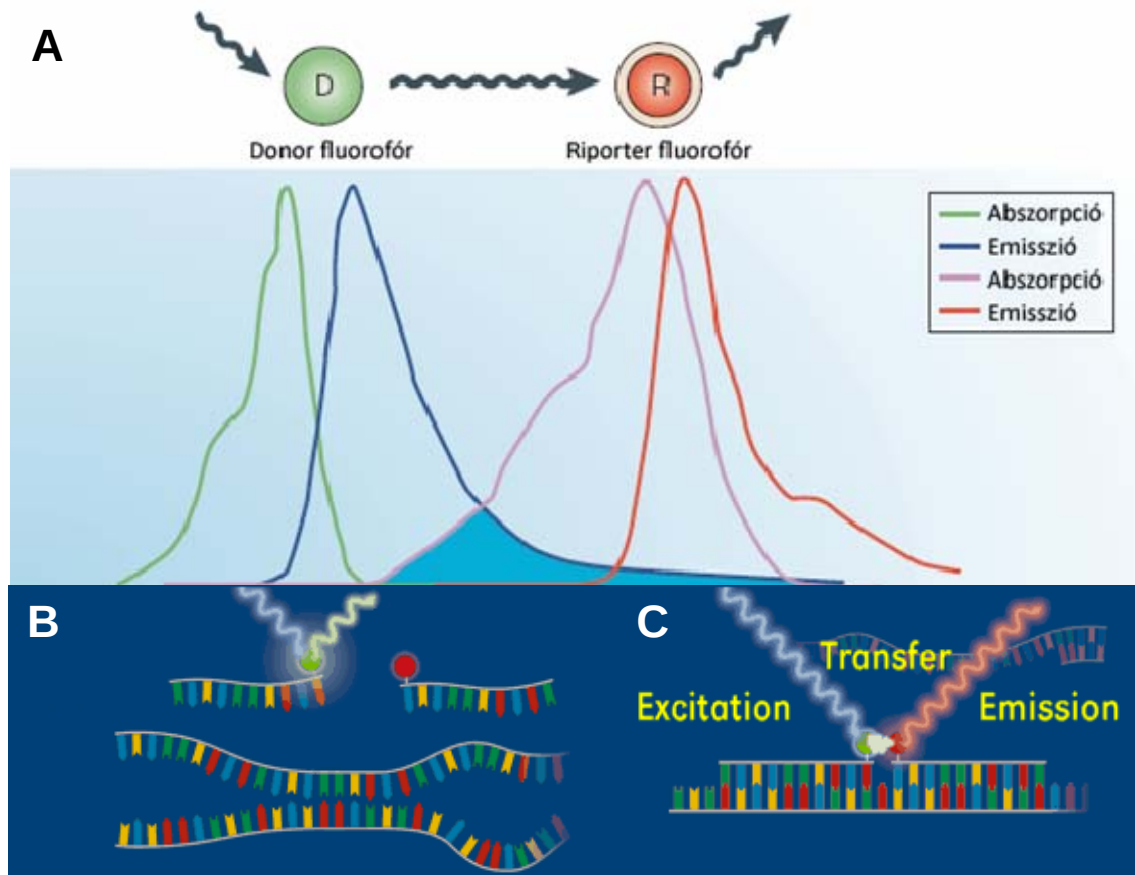
1.2 Olvadáspontra analízisen alapuló genotipizálás LightCycler készüléken

A LightCycler® egy PCR készülék és egy fluoriméter kombinációja (Wittwer és *mtsai* 1997b). A készüléken kivitelezhető allél-diszkrimináció két részfolyamatra tagolható. Az első lépés egy hagyományos PCR reakció, annyi eltéréssel, hogy a reakció nagy hőátadási felülettel rendelkező üveg kapillárisokban játszódik le, ami igen gyors (akár 20°C/mp) hűtési/fűtési sebességet tesz lehetővé, így egy 45 ciklusból álló PCR reakció akár 30 perc alatt végbemehet. A PCR-t időbeli megszakítás nélkül követi a második részfolyamat, az olvadáspontra meghatározás.

A LightCycler készüléken történő olvadáspontra meghatározás elve, hogy az amplifikált DNS termék egy általunk kiválasztott szakaszához a bázis komplementaritás elve alapján, egymástól 1-3 bázispárnyi távolságra két oligonukleotid, ún. hibridizációs szonda kötődik. A szondák egymáshoz közeli végein egy-egy kovalensen kapcsolt fluorofór található. A donor fluorofór gerjesztés hatására jellemző hullámhossz tartományban fényt emittál, amit a készülék regisztrál (1/B ábra). A PCR-termékhez kötődés (hibridizáció) következtében a két fluorofór megfelelő fizikai közelségbe (egymástól 1-10 nm távolságra) kerül. Ilyen távolságban a gerjesztés következtében a donor fluorofór energiát ad át a riporter fluorofórnak, fluoreszcencia energia transzfer (FRET) játszódik le. A FRET feltétele, hogy a donor fluorofór abszorpciós spektruma átfedjen a riporter emissziós spektrumával (1/A ábra). A riporter fluorofór a donor fluorofórtól eltérő hullámhosszú fényt emittál, amit a készülék a donor által emittált fénytől elkülönít, szintén regisztrál (1/C ábra). Így végső soron a készülék által mért két hullámhosszú fény aránya az elegyben lévő, DNS termékhez kötött és nem kötött állapotú szondák arányáról nyújt információt.

A genotipizáláshoz használt szondák specifikusan kötődnek az általunk kiválasztott DNS szakaszhoz, amely vagy tartalmazza, vagy nem tartalmazza a vizsgálni kívánt genetikai variánst. Az olvadáspontra-elemzés során, a mintát először 40°C-ra lehűtjük (a szondák a DNS-szálakhoz kötődnek, hibridizálnak), majd a mintát lassan (0,1-0,3°C/mp sebességgel) melegítjük 95°C-ig, miközben a fluoreszcencia szignál folyamatosan detektáljuk. A szondák a bázissorrendjük által meghatározott hőmérséklet értéknél leválnak („leolvadnak”) a DNS-szálról, ezáltal hirtelen lecsökken a riporter

fluoroforra jellemző tartományban mérhető fluoreszcencia. Amennyiben a szonda nem teljesen komplementer szakaszhoz kötődött (a minta a szondával nem komplementer variánst tartalmazza) a kevésbé erős kötődés következtében a szonda leválása, ezáltal a fluoreszcencia jel csökkenése alacsonyabb hőmérsékleten következik be.



1. ábra: Fluorofórral jelölt hibridizációs szondák és a fluoreszcencia energia transzfer (FRET) jelensége

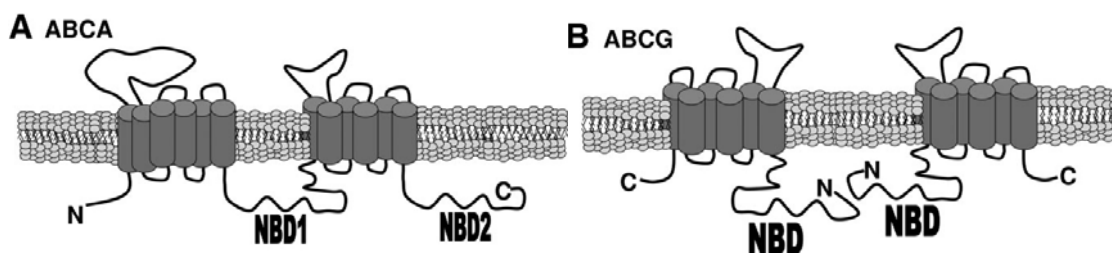
A) A fluoreszcencia energia transzferben (FRET) részt vevő donor és riporter fluorofórok spektrális átfedése. A donor abszorpciós spektruma átfed a riporter emissziós spektrumával. Koch és *mtsai* (2004) nyomán. A PCR-termékhez nem hibridizált (B) és PCR-termékhez hibridizált (C) fluorofórral jelölt szondapárok. Gerjesztés hatására a donor fluorofór (zöld korong) jellemző hullámhossz tartományban fényt emittál (A). A DNS-hez hibridizált szondák egymástól 1-3 bázispárnyi távolságra kerülnek (C), ami lehetővé teszi, hogy a donor fluorofór a riporter fluorofórnak (piros korong) energiát adjon át, amelynek hatására a riporter fluorofór az donorétől eltérő hullámhosszú fényt emittál, a jelenséget FRET-nek nevezzük.

Az értékeléshez a készülék szoftvere a hőmérséklet függvényében mért fluoreszcencia jel negatív deriváltját $[-d(F_2/F_1)/dT]$ ábrázolja, ahol F_2 a riporter és F_1 a donor fluorofór emissziós hullámhossz tartományában mért fluoreszcencia, T a

hőmérséklet. Az így kapott görbén a szonda olvadási pontjának megfelelő hőmérsékletnél „csúcs” látható, ezen a ponton a legintenzívebb a fluoreszcencia jel változása. A szonda olvadási hőmérséklete (a csúcs helye) függ a minta típusától, vagyis attól, hogy a PCR termék és a szonda között volt-e mismatch, vagy sem. A heterozigóta minták görbéjén a két olvadási maximumnak megfelelő hőmérsékleti értékeknél 2 csúcs látható.

1.3 ABC transzporterek

Az ATP Binding Cassette (ABC) transzporterek egy igen népes gén családot alkotnak. A humán genomban eddig 49 ABC transzportert azonosítottak, melyeket felépítésük (aminosav szekvenciájuk és domain szerkezetük) alapján 7 alcsoportba sorolnak, ezeket az abc betűvel ABCA-tól ABCG-ig elnevezve (Dean és *mtsai* 2001). A gén család tagjai a szubsztátok igen széles skáláját képesek az extra- és intracelluláris membránokon keresztül transzportálni. A transzport energiaigényét az ATP hidrolízise szolgáltatja (Higgins 1992). Felépítésük szerint két nagy csoportba sorolhatók: az egész transzporterek esetében két szerkezetileg hasonló egység egymáshoz kovalensen kapcsolt (2/A ábra), a féltranszporterek esetében a két hasonló egység homo- vagy heterodimert képezve alkot egy funkcionális, működőképes egységet (2/B ábra).



2. ábra: Az ABCA (A) és ABCG (B) gén családok membrán topológiai modelljei
Oram és *mtsai* (2006) nyomán

Az ábra egy ABCA (A) és egy ABCG (B) transzporter membrán topológiai modelljét ábrázolja. Az ABCA családba tartozó transzporterek két transzmembrán domaint és két nukleotid kötő domaint (NBD) tartalmaznak, ezáltal a transzporter egy funkcionális egységet alkot, szemben a fél transzporterekkel (mint például az ABCG család tagjai), amelyek egy transzmembrán domaint és egy NBD-t tartalmaznak, a funkcionális egység két fehérje dimeréből épül fel. Ilyen dimer például az ABCG5 és ABCG8 heterodimerje.

Az ABC transzporterekre jellemző a két erősen konzervált hidrofíl citoplazmatikus nukleotid kötő domain (NBD), és a két hidrofób transzmembrán

domain (TMD). Mindkét TMD 6-12 membránon átívelő α -hélixet tartalmaz. A szubsztrát specificitást a TMD határozza meg (Schneider és *mtsai* 1998). A NBD 200-250 aminosav által felépített globuláris egység, amely tartalmazza a konzervált Walker A és Walker B nukleotid kötő motívumot, továbbá az ABC signature vagy C-loop motívumot. Az ABC signature motívum kizárólag az ABC transzporterekre jellemző.

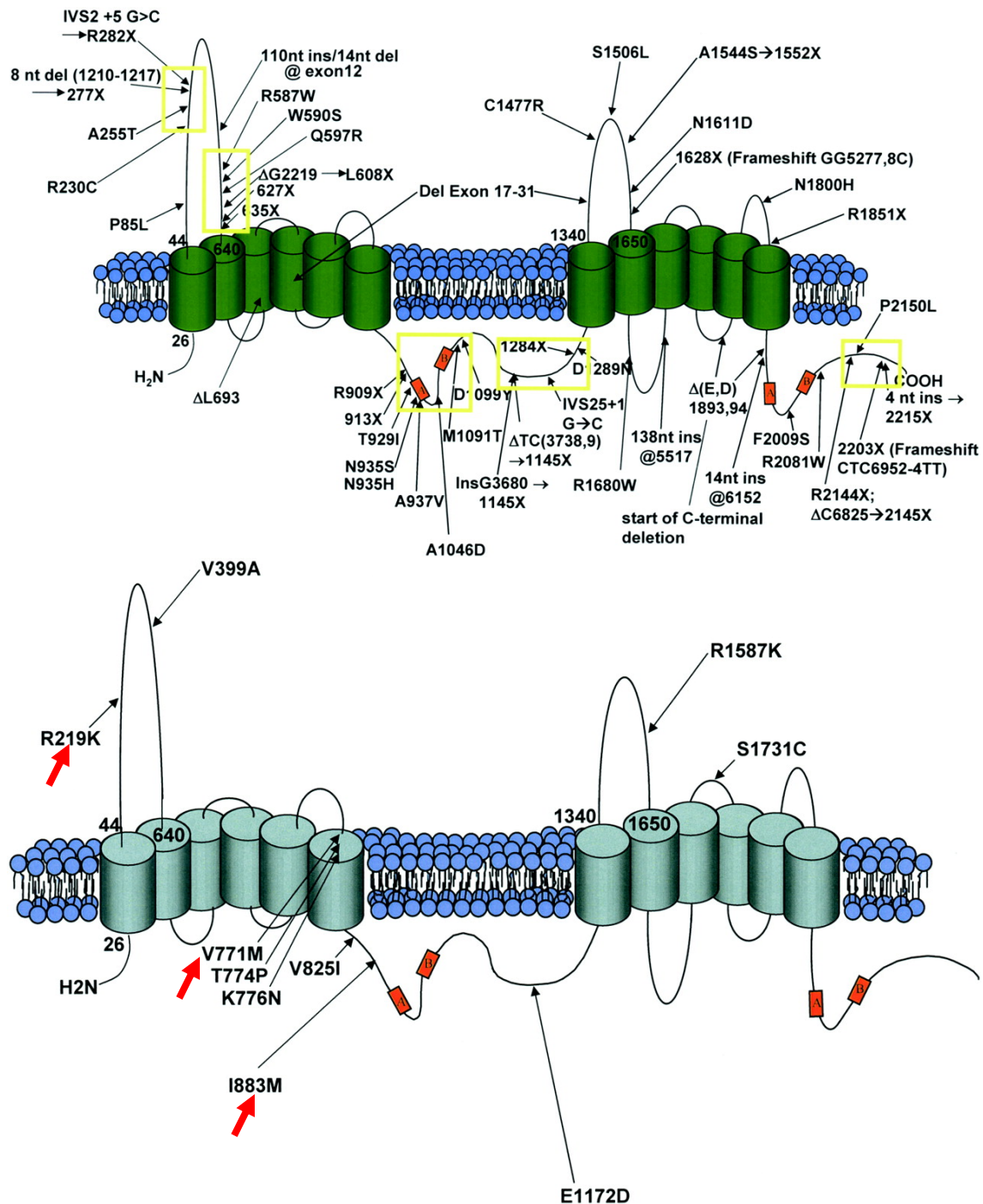
Az ABC transzporterek számos élettani folyamatban játszanak kulcsfontosságú szerepet, mutációk klinikai jelentőséggel bírnak. Eddig 13 olyan humán betegség ismert, amelynek hátterében valamely ABC transzporterben bekövetkezett mutáció áll. Ezek közé tartozik például a Tangier betegség (ABCA1; Brooks-Wilson és *mtsai* 1999, Rust és *mtsai* 1999), Dubin-Johnson szindróma (ABCC2; Paulusma és *mtsai* 1996, Wada és *mtsai* 1998), cisztás fibrózis (ABCC7; Riordan és *mtsai* 1989), pseudoxanthoma elasticum (ABCC6; Ringpfeil és *mtsai* 2000), Stargardt-betegség (ABCA4; Sun és *mtsai* 1999), progressiv familiaris intrahepaticus cholestasis (ABCB4, ABCB11; Strautniesks és *mtsai* 1998, Vree és *mtsai* 1998), sitosterolémia (ABCG5, ABCG8; Berge és *mtsai* 2000, Lee és *mtsai* 2001), de előfordulnak daganatos sejtekben multidrog rezisztenciát okozó mutációk is (ABCB1, ABCC1, ABCG2; Cole és *mtsai* 1992, Bakos és *mtsai* 2007, Robey és *mtsai* 2007).

A lipoprotein anyagcserében a géncsalád négy tagjának (ABCA1, ABCG1, ABCG5 és ABCG8) meghatározó szerepe van, ezek közül hárommal részletesen is foglalkozunk.

1.3.1 Tangier betegség

A Tangier betegség egy igen ritka, autoszomális recesszív öröklésmentet mutató anyagcserezavar, amelyet a szérum HDL csökkenése vagy teljes hiánya jellemez. Elsőként 1961-ben írták le Tangier szigetén (Virginia állam, USA), egy ott élő kisfiú esetében (Fredrickson és *mtsai* 1961). Pár évre rá már ismert volt, hogy a betegség hátterében egy autoszomális recesszív öröklésmentet mutató gén áll (Fredrickson és *mtsai* 1964), de a betegségért felelős gén lókuszának (9q31) azonosítására csak 1998-ban került sor (Rust és *mtsai* 1998). A következő évben a 9q31.1 kromoszóma régiójában kódolt ABCA1 transzporterben belül több kutatócsoport is azonosított a betegség fenotípusával kapcsolt mutációkat (Bodzioch és *mtsai* 1999,

Brooks-Wilson és *mtsai* 1999, Lawn és *mtsai* 1999, Rust és *mtsai* 1999). Az elmúlt 50 évben összesen kb. 100 Tangier-esetet regisztráltak világszerte.



3. ábra: Az ABCA1 transzporter membrán topológiai modellje

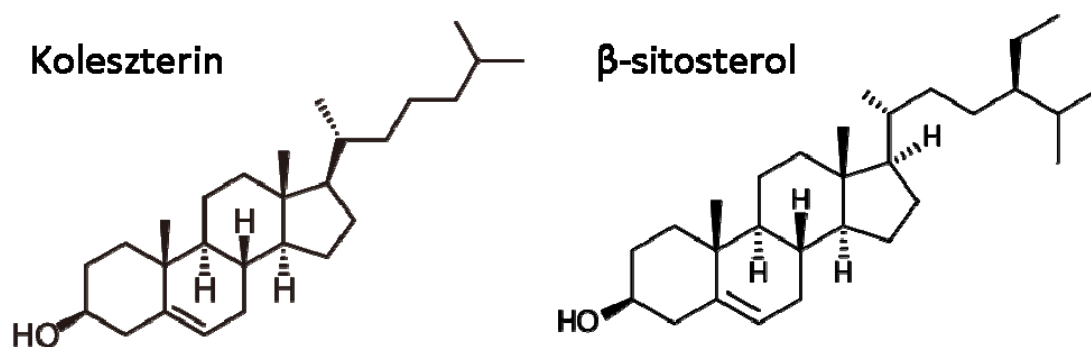
Az ABCA1 transzporter domain szerkezete. Az A ábrarész az azonosított mutációkat szemlélteti. A mutációk eloszlása nem egyenletes, a fehérje speciális funkcióval rendelkező részein halmozottan fordulnak elő (sárga négyzetek). A B ábrarész a kódoló szakaszon található SNP-eket (cSNP) szemlélteti. Az általunk is vizsgált három variáns (R219K, V771M és I883M) elhelyezkedését piros nyilak mutatják. Singaraja és *mtsai* 2003 nyomán.

1.3.2 ABCA1

Az ABCA1 az ABC géncsalád A alcsaládjának tagja. A 2261 aminosavból álló, 220 kD tömegű fehérjét egy 50 exonból álló gén kódolja. Membrán topológiai modelljét a 2/A és 3. ábra mutatja. Többféle sejttípus expresszálja: makrofágok, endotél sejtek, hepatociták és hízósejtek (Voloshyna és *mtsai* 2011). Az ABCA1 a koleszterin apolipoprotein A1-re (ApoA1) történő effluxában működik közre, ezáltal alapvető szerepet tölt be a HDL partikulumok kialakulásában (lásd később).

1.3.3 Sitosterolémia

A sitosterolémiát elsőként Bhattacharyya és Connor írta le 1974-ben egy testvérpár esetében, akik már korai gyermekkorban megjelent xantómáikról számoltak be (Bhattacharyya és Connor 1974). A xantómák megjelenésének hátterében leggyakrabban a örökletes hypercholesterinaemia áll, ami az emelkedett szérumszint koleszterin szint következményeként alakul ki. A testvérpár esetében a várakozással ellentétben nem a szérumszint koleszterin szintje, hanem egy növényi szterol, a sitosterol szintje emelkedett. A betegségre xantómák korai megjelenése, a családban és a betegekben nem azonosítható örökletes hypercholesterinaemia, az emelkedett szérumszint sitosterol szint, emellett normál, vagy néhány esetben mérsékelten emelkedett koleszterin szint, továbbá az atherosclerosis korai kialakulása jellemző (Salen és *mtsai* 1992). A betegség későbbi szövődésként ISZB is előfordulhat (Salen és *mtsai* 1985).



4. ábra: A koleszterin és a β-sitosterol szerkezetének összehasonlítása.

A koleszterin és a β-sitosterol egymáshoz hasonló szerkezetű, szteránvázis vegyületek, amelyek között csak a C24-es szénatomhoz kapcsolódó oldalláncban található eltérés.

A növények több, mint 20 féle növényi szterolt szintetizálnak (Ling és *mtsai* 1995), amelyek magas fokú hasonlóságot mutatnak a koleszterinnel. A 4. ábrán a

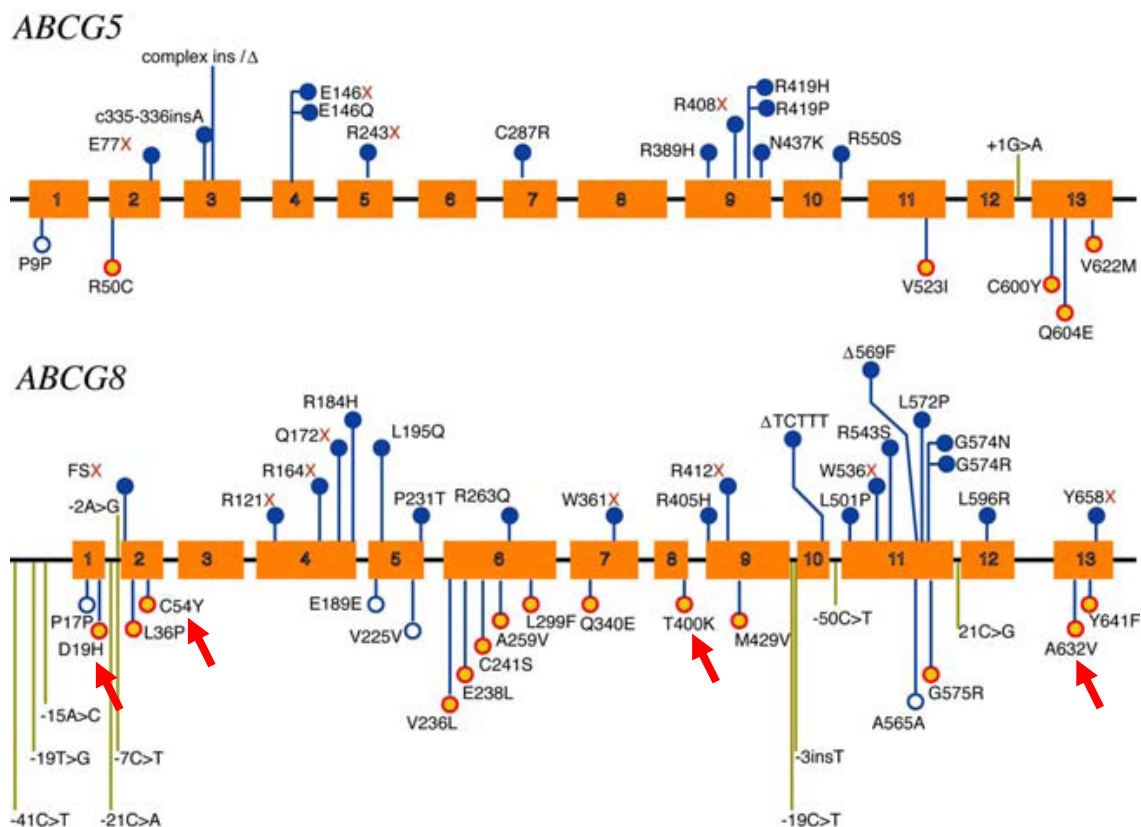
leggyakoribb növényi sterol, a β -sitosterol és koleszterin szerkezetének összehasonlítása látható.

A sitosterolémia kialakulásáért felelős lókuszt (STSL) a 2p21 kromoszóma régióban azonosították (Patel és *mtsai* 1998). A lókuszt két közeli, egymással nagyfokú homológiát mutató gént, az ABCG5 és ABCG8 géneket kódolja (régebbi elnevezésükön sterolin-1 és sterolin-2).

1.3.4 ABCG5 és ABCG8

Az ABCG5 és az ABCG8 az ABC géncsalád G alcsaládjának tagjai. A gének 13 exont tartalmaznak (lásd 5 ábra). Fél transzporterek, amelyek egymással heterodimert képezve együttesen alkotnak egy funkcióképes transzportert, azaz obligát heterodimerek. (Graf és *mtsai* 2002 és 2003, lásd 2/B). A heterodimer bármely tagjában bekövetkező mutáció sitosterolémia kialakulásához vezethet (Berge és *mtsai* 2000). A heterodimer az enterociták és a májsejtek apikális membránjában lokalizálódnak, ahol növényi sterolok és a koleszterin transzportját végzik a vékonybél ürege és az epecsatornák lumene felé (Klett és *mtsai* 2004). A növényi sterolokat az emberi szervezet nem képes szintetizálni, így a keringésben jelen lévő növényi sterolok mind az étrendből származnak. A tipikus nyugati étrend napi 150-400 mg növényi sterolt tartalmaz és nagyságrendben ugyanennyi koleszterint is. Az elfogyasztott növényi sterolok abszorpciója 5% alatti, míg a koleszterin esetében ez az arány átlagosan 55% (Bosner és *mtsai* 1999). A sitosterolémiában szenvedők plazma sitosterol szintje 10-25-ször magasabb, mint egy normál személyé, ugyanakkor a koleszterin szint nem vagy csak mérsékelten emelkedett. A sitosterol és a koleszterin szint közötti különbség annak tulajdonítható, hogy a sitosterolémiában szenvedők koleszterin bioszintézise gátlás alatt áll (Nguyen és *mtsai* 1990).

A betegségért felelős mutációkon kívül számos SNP-t is azonosítottak (Berge és *mtsai* 2002, Iida és *mtsai* 2002). A kaukázusi populációkban az ABCG8 gént érintő genetikai variációk a gyakoribbak, míg a kínai, japán és indiai betegekre (az összes eset 20%-a) inkább az ABCG5 gént érintő eltérések jellemzőek (Lu és *mtsai* 2001). A gének kódoló szakaszait érintő mutációkat a 5. ábra szemlélteti (Hazard és *mtsai* 2007).



5. ábra: Az STSL lókuszon belüli ismert mutációk és polimorfizmusok

Az ábra az ABCG5 és ABCG8 géneket mutatja. Mindkét gén 13 exonból áll (narancssárga négyzetek), az ábrázolás nem méretarányos. Mindkét gén fölött kék körök ábrázolják az ismert, sitosterolémiát okozó mutációkat. A gének alatt látható körök ismert SNP-k helyét mutatják (a teli körök missense, az üres körök szinonim polimorfizmusokat jelölnek), a felsorolás nem teljes. Az általunk vizsgált 4 ABCG8 SNP-t (D19H, Y54C [az ábrán C54Y], T400K, A632V) piros nyilak mutatják. Hazard és *mtsai* (2007) nyomán.

A polimorfizmusok közül az ABCG5-ben leírt Q604E és az ABCG8-ban azonosított D19H, Y54C, T400K és A632V variánsok számos humán klinikai tanulmány tárgyát képezték. Vizsgálták a genotípusok összefüggéseit a szérumban lévő lipid szinttel (Weggemans és *mtsai* 2002), hogy hogyan változik a különböző genotípussal rendelkező személyek esetén a szérumban lévő lipid szint az étrendi változások (Hubacek és *mtsai* 2004) vagy gyógyszeres kezelés hatására (Kajinami és *mtsai* 2004). Vizsgálták a polimorfizmusok kapcsolatát a növényi sterolok abszorpciójával (Plat és *mtsai* 2005), és az epekő képződéssel (Acalovschi és *mtsai* 2006). Koeijvoets és *mtsai* (2009) publikációjukban két ABCG8 polimorfizmus és az ISZB kapcsolatát vizsgálták.

1.3.5 ABC transzporterek a lipoprotein metabolizmusban

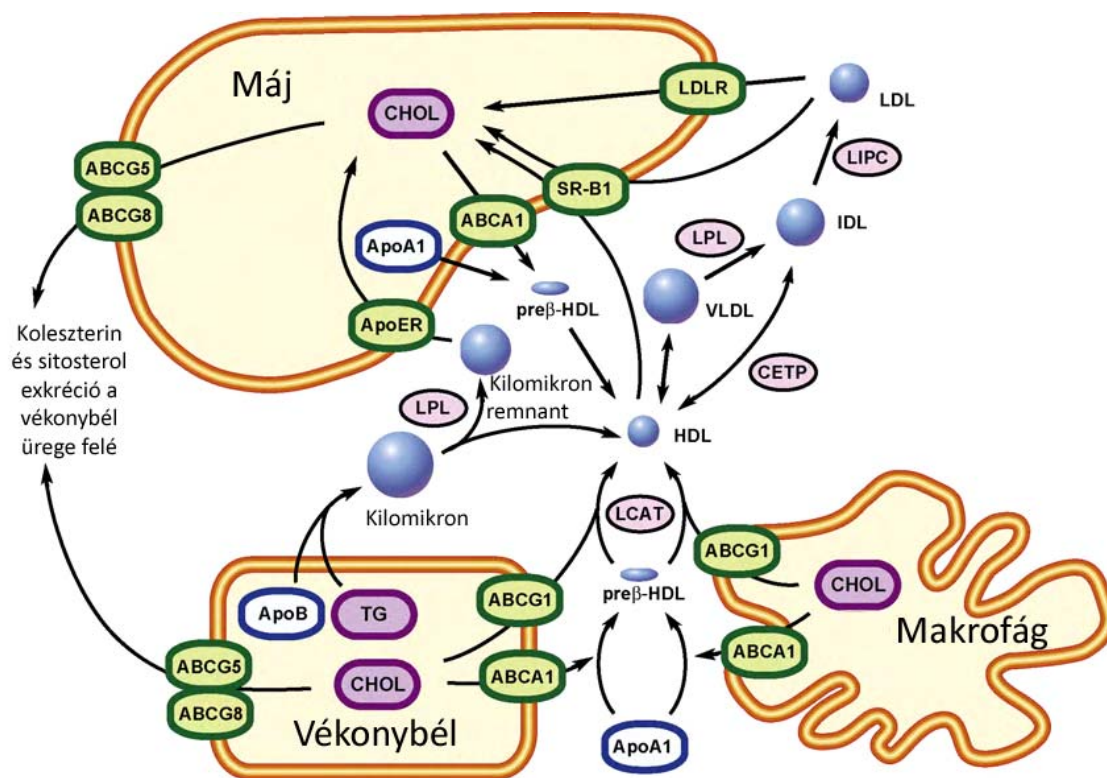
A szervezet számára szükséges hidrofób lipid molekulák szállítása a vér vizes fázisában lipoproteinek segítségével valósul meg. Az egyes lipoprotein partikulumok jellemző lipoprotein és lipid összetétellel rendelkeznek. A fehérje és lipid természetű összetevők meghatározzák a partikulumok denzitását (sűrűségét), ami alapján 4 fő csoportba sorolhatók: high density lipoprotein (HDL), low density lipoprotein (LDL), very low density lipoprotein (VLDL) és kilomikron. A lipoproteinek metabolizmusában több ABC transzporter játszik kulcsszerepet. Fitzgerald és *mtsai* 2010-ben megjelent ábrája segítségével bemutatjuk a 4 ABC transzporter szerepét a lipid abszorpcióban és a reverse koleszterin transzportban (RCT) (6. ábra).

A HDL kialakulása a foszfolipidek és a koleszterin apolipoprotein A1-re (ApoA1) történő transzferével veszi kezdetét, aminek eredményeként pre β -HDL alakul ki. A folyamatot a perifériás szövetekben, a vékonybélben és a májban kifejeződő ABCA1 katalizálja. Az érett HDL kialakulásának részeként az éretlen pre β -HDL-ben jelen lévő koleszterint a lecitin-koleszterin-aciltranszferáz (LCAT) észterifikálja. Az ABCG1 transzporter további koleszterint képes a perifériás szövetekből az érett HDL partikulumokba juttatni. Az ABCA1 és az ABCG1 transzporterek részt vesznek a makrofágok által mediált artériás érfalról történő koleszterin eltávolítás folyamatában. Ezáltal fontos szerepet töltenek be az atherosclerosis-sal járó betegségekkel szembeni védelemben. A HDL koleszterinészter tartalma a scavenger receptor B1 (SR-BI) közreműködésével a májsejtekbe kerül, ahol a májenzimek hatására epesavvá alakul. Az epesavak további szabad koleszterinnel együtt kiválasztódnak az epecsatornák üregébe. Az efflux folyamatát további ABC transzporterek, az ABCG5 és az ABCG8 végzik.

A lipid felszívódás folyamán a vékonybélben abszorbeált zsírsavak trigliceriddé (TG) konvertálódnak, majd, mint kilomikron a véráramba szekretálódnak. A kilomikron a TG mellett apolipoprotein B48-at (ApoB48) tartalmaz. A kilomikron TG tartalmát a lipoprotein lipáz szabad zsírsavakká hidrolizálja, így kilomikron remnant alakul ki, amit a máj az apolipoprotein E receptora (ApoER) segítségével felvesz. Az étrendből származó koleszterin az ABCA1 és ABCG1 segítségével szintén a HDL partikulumokba kerül. A keringő HDL apolipoprotein összetétele a VLDL partikulumokkal történő apolipoprotein csere következtében módosul. A koleszterin-észter-transzfer-protein (CETP) koleszterinésztert szállít a VLDL remnant (IDL)

partikulumra, ami az apoB-n kívül, szinte összes apolipoprotein tartalmát elveszíti és a hepatikus lipáz (LIPC) közreműködésével LDL partikulummá alakul át. Végül a máj és egyéb szövetek az LDL-t az LDL receptor (LDLR) által közvetített endocitózissal veszik fel.

Az LDL receptor mutációi emelkedett szérumszintű LDL szinthez (hypercholesterinaemiához), az ABCA1 mutációi a keringő HDL szint csökkenéséhez vagy teljes hiányához (Tangier betegséghez, lásd 1.3.1 fejezet), az ABCG5/ABCG8 mutációi emelkedett koleszterin és növényi sterol szinthez (sitosterolémiához, lásd 1.3.2 fejezet) vezetnek.



6. ábra: ABC transzporterek a lipoproteinek metabolizmusban.

Az ábra leírása a szövegben található. Rövidítések: ApoA1: apolipoprotein A1; ApoB: apolipoprotein B; ApoER: apolipoprotein E receptor; CHOL: koleszterin; HDL: high density lipoprotein; IDL: intermediate density lipoprotein; LCAT: lecitin-koleszterin-aciltranszferáz; LDLR: low density lipoprotein receptor; LIPC: hepatikus lipáz; LPL: lipoprotein lipáz; pre-β-HDL: pre-β high density lipoprotein; SR-B1: scavenger receptor B1; TG: triglicerid; VLDL: very low density lipoprotein. Fitzgerald és mtsai 2010 nyomán (módosított ábra).

2 Célkitűzések

A multifaktoriális betegségek kialakulásához számottevő mértékben örökletes tényezők is hozzájárulnak. A genetikai faktorok azonosítása segítséget nyújthat a betegség patomechanizmusának tisztázásában, a folyamatban részt vevő fehérjék szerepének megértésében. Az újonnan azonosított fehérjék, új gyógyszeres kezelési célpontok lehetnek. A genetikai tényezők ismerete hosszú távon hozzájárulhat az egyénre szabott orvoslás lehetőségének megteremtéséhez.

Munkánk célja két, a lipid metabolizmusban fontos szerepet betöltő ABC transzporter polimorfizmusainak (ABCA1: R219K, V771M, I883M; és ABCG8: D19H, Y54C, T400K, A632V), illetve két multifaktoriális betegség, a stroke és az ISZB összefüggéseinek elemzése, továbbá a polimorfizmusok és a lipid szint kapcsolatának vizsgálata volt.

Egyrészt célunk volt, az allél diszkriminációs technikánk optimalizálása. Előzetes eredményeink alapján az aszimmetrikus PCR jelentős mértékben növelte a hibridizációs szondák olvadáspont analízisen alapuló allél-diszkriminációs módszerünk megbízhatóságát és értékelhetőségét. Ezért célul tűztük ki az aszimmetrikus körülmény szisztematikus vizsgálatát, hogy azt a későbbiekben a diagnosztikai és klinikai vizsgálatokban alkalmazhassuk. Ezen belül, az alábbi céljaink voltak.

- Az optimális primer arány meghatározása.
- Az eredetivel reciprok primer arány és az eredeti hibridizációs szondákkal komplementer szondapár viselkedésének tesztelése.
- Az aszimmetrikus PCR egyéb genotipizáló rendszerekre adaptálhatóságának vizsgálata.

Másrészt, az ABC transzporterek polimorfizmusainak cerebro- és cardiovascularis betegségekkel, illetve a szérum lipid szintekkel mutatott esetleges kapcsolatainak vizsgálatával kapcsolatban az alábbi céljaink voltak.

- Az allél- és genotípus gyakoriságok meghatározása a hazai stroke, ISZB és az egészséges kontroll csoportokban.

- A hazai allélgyakoriság (AF) értékek összevetése más populációkban észlelt adatokkal.
- A kapott AF vagy genotípus gyakoriság értékek összehasonlítása a beteg és a kontroll csoportok vonatkozásában az esetleges polimorfizmus-betegség kapcsolat(ok) azonosítására.
- Annak vizsgálata, hogy a variánsok megoszlása mutat-e valamilyen különbséget a különböző életkorban diagnosztizált beteg alcsoportok között.
- Annak vizsgálata, hogy a variánsok megoszlása mutat-e valamilyen különbséget a két nem alcsoportja között.
- Annak vizsgálata, hogy van-e összefüggés a variánsok és a stroke betegség különböző megjelenési (súlyossági) formái között.
- A haplotípus gyakoriságok megállapítása és gyakoriságuk összehasonlítása a betegcsoportok, illetve a kontroll vonatkozásában.
- Végül annak vizsgálata, hogy a variánsok mutatnak-e összefüggést az egyedi csoportokon (stroke, ISZB, kontroll) belül a szérum lipid szintekkel (koleszterin, TG, LDL, HDL).

3 Módszerek

3.1 A vizsgálatokban résztvevő személyek

Az olvadáspont analízis optimalizálására irányuló kísérletsorozathoz a vizsgált polimorfizmusoknak megfelelően választottunk a már ismert genotípus alapján egy-egy homozigóta normál, heterozigóta és homozigóta variáns személyt. Ezeknél a kísérleteknél a vizsgált személyekről klinikai információra nem volt szükség, ezért ezekre nem térünk ki.

A polimorfizmus-betegség összefüggések vizsgálatánál két betegcsoporttal dolgoztunk (stroke- és ischaemiás szívbetegek), amelyek mellett rendelkezünk még egy véradókból összeállított egészséges kontroll csoporttal is. Minden vizsgált személy a kaukázusi populációhoz tartozott, akiktől klinikai vizsgálatok elvégzéséhez írásos hozzájárulást kértünk. Az alábbiakban az említett csoportok részletes jellemzése olvasható, az adatokat táblázatosan is megadtuk. A betegek perifériás véréből izolált DNS-mintákon két ABC transzporter vizsgálatát végeztük el, először az ABCA1 polimorfizmusait, később az ABCG8 polimorfizmusait vizsgáltuk. A rendelkezésre álló vizsgálati anyag mennyiségi és/vagy minőségi korlátai miatt az időrendben később vizsgált transzporter (ABCG8) polimorfizmusainak esetében, a korábbi vizsgálatokhoz képest a három csoport esetében összesen 7 személy kiesett, ami nem okozott lényeges változást a csoportok összetételében (587 helyett összesen 580 esetet vizsgáltunk). Az egyszerűbb bemutatathóság kedvéért az elsőnek tanulmányozott transzporter (ABCA1) esetében is az említett 7 fővel csökkentett esetszámmal újra elvégeztük az elemzéseket, melyek eredményei számszerűleg így kis mértékben változtak.

3.1.1 Stroke betegek csoportja

A stroke betegek csoportjába 1998. január 1 és 1999. november 30 között a hajdani Honvéd Kórházban (Budapest) stroke-kal diagnosztizált és kezelt 241 beteget (164 férfit és 77 nőt) vontunk be. A diagnózis felállításának időpontjában az átlagéletkor $53,4 \pm 14,5$ év volt (18-tól 86 évig terjedő életkor intervallummal). A stroke csoport klinikai paramétereit az 1. táblázatban foglaltuk össze.

1. táblázat: Stroke betegcsoport klinikai paramétereit

Klinikai jellemző	Érték
Betegszám	241
Férfi/nő arány	164/77
Átlagos diagnóziskori életkor $\pm$ SD (életkor tartomány)	53,4 $\pm$ 14,5 év (18-86)
Betegség súlyossága szerinti felosztás	
TIA	32,0% (77/241)
RIND	50,2% (121/241)
PRIND	17,8% (43/241)
CDS	
negatív	45,8% (110/240)
pozitív, <85% stenózis	43,8% (105/240)
pozitív, >85% stenózis	10,4% (25/240)
ISZB együttes előfordulása	14,9% (36/241)
További rizikófaktorok gyakorisága	
magas vérnyomás	49,0% (118/241)
cukorbetegség	11,6% (28/241)
dohányzás	53,5% (121/226)
fokozott alkoholbevitel	19,9% (45/226)

A százalékosan megadott adatok az adott sajátossággal rendelkező esetek arányát mutatják, a konkrét esetszámokat a százalékos adat után zárójelben tüntettük fel. Rövidítések: SD: standard deviáció (tapasztalati szórás); TIA: tranziens ischaemiás attack (átmeneti keringési zavar); RIND: reverzibilis ischaemiás neurológiai deficit; PRIND: progresszív reverzibilis ischaemiás neurológiai deficit; CDS: carotis duplex scan; ISZB: ischaemiás szívbetegség

A stroke-betegek jellemzése képalkotó vizsgálatok (CT: computed tomography) alapján, az etiológiai alcsoportok kialakítása a carotis duplex scan (CDS) vizsgálattal történt (110 esetben negatív, 105 esetben pozitív <85% stenózissal, 25 esetben pozitív, >85% stenózissal, 1 esetben hiányzott az adat). A stroke betegeket a betegség súlyossága alapján három csoportba soroltuk: TIA (transient ischaemic attack) 77 fő (32,0%), RIND (reverzibilis ischaemiás neurológiai deficit) 121 fő (50,2%), valamint PRIND (progresszív reverzibilis ischaemiás neurológiai deficit) 43 fő (17,8%). A betegek 14,9%-ánál (36 esetben) az anamnézisében a stroke mellett ISZB is szerepelt. Az ismert stroke rizikófaktorok közül a magas vérnyomásra vagy az együttesen előforduló cukorbetegségre vonatkozóan a teljes csoport esetében rendelkezünk adattal. Az érintett személyek száma az alábbiak szerint alakult: magas vérnyomás 49,0% (118/241), cukorbetegség 11,6% (28/241). A betegek nagy részénél további két rizikófaktorról is rendelkezünk információval, úgy, mint rendszeres dohányzás 53,5% (121/228) és fokozott alkoholbevitel 19,9% (45/226).

3.1.2 Ischaemiás szívbetegek csoportja

A szívkoszorúér betegségben szenvedők csoportjába 148 olyan nem-rokon személyt (107 férfit és 41 nőt) vontunk be, akiknél a betegséget 1998. szeptember 1 és 1999. október 30 között az akkori MÁV Kórházban (Budapest) diagnosztizálták. A diagnózis időpontjában az átlagos életkor $61,4 \pm 9,3$ év volt (32-86 év tartomány). A diagnózist minden esetben koszorúér angiográfiás vizsgálat támasztotta alá, 97 beteg (65,5%) esetében angina pectoris, míg 51 betegnél (34,5%) akut myocardialis infarktus volt kimutatható. A betegcsoport klinikai jellemzőit a 2. táblázatban foglaltuk össze.

2. táblázat: Ischaemiás szívbetegek klinikai paraméterei

Klinikai jellemző	Érték
Betegszám	148
Férfi/nő arány	107/41
Átlagos diagnóziskori életkor $\pm$ SD (életkor tartomány)	$61,4 \pm 9,3$ év (32-86)
Betegség súlyossága szerinti felosztás	
angina pectoris	65,5% (97 eset)
akut myocardialis infarktus	34,5% (51 eset)

Rövidítések: SD: standard deviáció (tapasztalati szórás).

3.1.3 Kontroll csoport

A kontroll csoportot 191 nem-rokon önkéntes véradó alkotta (a mintagyűjtésig 2-5 alkalommal adtak vért). A kontroll csoport 92 férfit és 99 nőt foglalt magába, a mintagyűjtés időpontjában az átlagos életkoruk $35,3 \pm 11,8$ év volt (19-63 év tartomány; lásd 3. táblázat). A vérmintákat és a hozzájuk tartozó adatokat az Országos Vérellátó Szolgálat bocsátotta rendelkezésünkre. A donorokat véradáskor egy orvos kolléga kérdezte ki korábbi, illetve aktuális betegségek szempontjából, amelyek jelenléte vagy korábbi előfordulása a véradásból való kizárást vonja maga után. A kontroll csoport tagjai, ennek megfelelően kikérdezés alapján nem szenvedtek malignus betegségben, fertőzésekben, szívkoszorúér betegségben, illetve stroke-ban.

3. táblázat: Kontroll csoport klinikai paraméterei

Klinikai jellemző	Érték
Esetszám	191
Férfi/nő arány	92/99
Életkor $\pm$ SD (életkor tartomány)	$35,3 \pm 11,8$ év (19-63)

Rövidítések: SD: standard deviáció (tapasztalati szórás).

3.2 Alkalmazott laboratóriumi módszerek

3.2.1 DNS izolálás

A DNS-t a frissen levett vagy a -20°C -on tárolt, alvadásgátolt perifériás vérmintából izoláltuk, amelyhez a „kisózással” módszert alkalmaztuk (Miller és *mtsai* 1988). A módszer lényege az volt, hogy a vörösvérsejtek hipozmotikus lízisét követően a fehérvérsejteket proteináz K-val emésztettük, majd a megemésztett fehérjét nagy koncentrációjú NaCl-dal, ezt követően a DNS-t etanollal kicsaptuk. A DNS oldatot -20°C -on tároltuk.

3.2.2 Polimorfizmusok kimutatása olvadásgörbe analízissel

3.2.2.1 A vizsgált genetikai variánsok jellemzői

Az aszimmetrikus PCR optimalizálása során vizsgált genetikai variánsok klinikai relevanciával rendelkeznek, tehát mutációnak minősülnek. Esetükben a genotípusokra történő hivatkozáskor ez alapján a normál, heterozigóta és mutáns kifejezéseket használtuk.

Az ABC transzporterek mind a hét általunk vizsgált genetikai variánsa egy nukleotidra kiterjedő, kódoló régióban található, aminosav cserével járó (missense) polimorfizmus (cSNP). Klinikai relevanciájuk nem bizonyított, viszont a fehérje aminosavsorrendjének módosítása révén, annak funkciójában változást okozhatnak. A dolgozatban a polimorfizmusokra mindig az aminosav pozícióra és cserére utaló elnevezéssel hivatkozunk (pl.: R219K), az allélra a pozíció-aminosav kombinációval (pl.: 219K), a genotípusra a pozíció-aminosavak kombinációval, vagy, amennyiben a szövegkörnyezetből egyértelműen kiderül, akkor az aminosavak egybetűs kódjaival (pl.: 219KK vagy KK).

A genetikai variánsok legfontosabb paramétereit (gén, génen belüli régió, nukleotid és aminosav csere, referencia SNP [rs] azonosító szám) a 4. táblázatban foglaltuk össze.

4. táblázat: A vizsgált genetikai variánsok legfontosabb paraméterei

Variáns	Gén	Régió	Nukleotid csere	Aminosav csere	rs azonosító szám
R219K	ABCA1	7. exon	c.969A>G	Arg→Lys	rs2230806
V771M	ABCA1	16. exon	c.2624G>A	Val→Met	rs2066718
I883M	ABCA1	18. exon	c.2962A>G	Ile→Met	rs2066714
Q141K	ABCG2	5. exon	c.421C>G	Gln→Lys	rs2231142
D19H	ABCG8	1. exon	c.52G>C	Asp→His	rs11887534
Y54C	ABCG8	2. exon	c.161A>G	Tyr→Cis	rs4148211
T400K	ABCG8	8. exon	c.1199C>A	Thr→Lys	rs4148217
A632V	ABCG8	13. exon	c.1895C>T	Ala→Val	rs6544718
g.20210G>A	II. faktor	3'UTR	g.20210G>A	-	rs1799963
Leiden	V. faktor	10. exon	c.1601G>A	Arg→Gln	rs6025
H63D	HFE	2. exon	c.187C>G	His→Asp	rs1799945

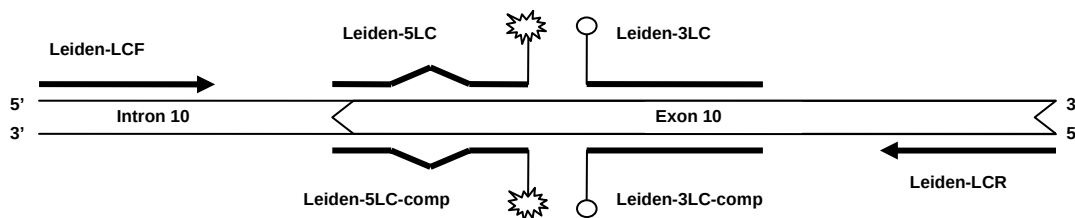
A táblázat a vizsgált genetikai variánsok általunk használt elnevezéseit, a gén és a génen belüli régiók megjelölését, a variánsok által okozott nukleotid és aminosav cserét, illetve a referencia SNP (rs) azonosító számokat tartalmazza. A II. faktor mutáció nem kódoló (3'UTR) régióban található, ezért nem jár aminosav cserével. Rövidítések: HFE: örökletes hemokromatózis.

3.2.2.2 Oligonukleotid tervezés

Az ABCA1 SNP-k (R219K, V771M, I883M) vizsgálatához egy korábbi közleményben megjelent primer és szonda készletet használtunk (Brousseau és *mtsai* 2001). A dolgozatban érintett minden egyéb allél-diszkriminációs módszerhez (ABCG2: Q141K, ABCG8: D19H, Y54C, T400K és A632V, FII: g.20210G>A, FV: Leiden, HFE: H63D) saját tervezésű oligonukleotidokat használtunk.

Az aszimmetrikus PCR vizsgálatához használt primerek (Leiden-LCF és Leiden-LCR) a véralvadási kaszkád V. faktor (FV) gén 10. exonjának egy 210 bázispáros szakaszát amplifikálták, a termék tartalmazta a Leiden mutációt. Két hibridizációs szondapárt használtunk, melyek az amplifikált PCR termék azonos szakaszához hibridizáltak, de a PCR termékben jelen lévő komplementer DNS szálak eltérő szálaihoz kötődtek. Ezeket „sense” (Leiden-3LC, Leiden-5LC) és „antisense” (Leiden-3LC-comp, Leiden-5LC-comp) szondapároknak neveztük el. A Leiden-5LC szonda a vad típusú allél értelmes szálával (a Leiden-LCR primer elongátumával) mutatott komplementaritást, míg a Leiden-5LC-comp a gén ugyanezen szakaszának antisense szálához (a Leiden-LCF primer elongátumához) kötődött. A két hibridizációs szondapár a mutáció pozíciójától eltekintve egymás tökéletes komplementere volt

(részletesebben lásd később, 4.1 fejezet). A FV Leiden mutáció esetében alkalmazott primerek és szondapárok sematikus elhelyezkedését a 7. ábra szemlélteti.



7. ábra. Az V. faktor Leiden mutáció vizsgálata során alkalmazott oligonukleotidok (primerek és szondapárok) sematikus elhelyezkedése az V. faktor génen

Az ábra az V. faktor (FV) gén 10. exonjának az amplifikációs primerek (Leiden-LCF, Leiden-LCR) által amplifikált 210 bázispár hosszú szakaszát ábrázolja. Az ábrán feltüntettük a „sense” (Leiden-3LC, Leiden-5LC) és „antisense” (Leiden-3LC-comp, Leiden-5LC-comp) szondapárokat. A FV Leiden mutáció a Leiden-5LC, illetve Leiden-5LC-comp szondák által felismert szakaszon található. Az ábra nem méretarányos.

Az aszimmetrikus PCR sajátosságainak vizsgálatához használt további tesztrendszerek az ABCG2 gén Q141K polimorfizmusa, a véralvadási kaszkád II. faktor (FII, prothrombin) génjének g.20210G>A mutációja és az örökletes hemokromatózis (HFE) gén H63D variánsa voltak.

Az amplifikációs primereket és a hibridizációs szondákat a LightCycler Probe Design programmal terveztük (Roche Diagnostics). Minden oligonukleotidot az Integrated DNA Technologies (Coralville, USA) szintetizált. A primerek és szondák szekvenciáit az 1. függelékben foglaltuk össze.

3.2.2.3 Amplifikáció és olvadáspont analízis

Az amplifikációt és olvadásgörbe analízist LightCycler®1.2 (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, USA) készülékben végeztük. A PCR térfogata 20 µl volt, ami 10 µl 2 x PCR Master Mix-et (Promega Corp., Madison, USA) tartalmazott, 0,7 U Taq polimerázzal (Finnzyme, Espoo, Finnország) és 0,75 mM MgCl₂-vel kiegészítve. Különböző mennyiségű primerekkel amplifikáltunk (ABCA1 R219K, V771M, I883M: 0,5 µmol/L mindkét primerből; ABCG8 Y54C, A632V: 0,5 µmol/L a forward és 0,15 µmol/L a reverse primerből; ABCG8 D19H, T400K: 0,15 µmol/L a forward és 0,5 µmol/L a reverse primerből). A hibridizációs szondapár mindkét tagjából 0,25 µmol/L mennyiséget használtunk minden esetben. A templátként bevitt DNS mennyisége 200

ng volt. Az amplifikáció során a denaturációs lépés egységesen 95°C/30 mp volt, amelyet 70 PCR ciklus követett (95°C/0 mp, 50°C/10 mp, 72°C/10 mp [kivéve ABCG2 Q141K: 72°C/15 mp]). Az olvadáspont analízis során, kezdeti lépésként először 60 mp-ig 40°C-on inkubáltuk a mintákat, majd a hőmérsékletet 0,1°C/mp sebességgel emeltük 80°C-ig, miközben a fluoreszcencia szignált folyamatosan detektáltuk.

A kiértékelés során a mérési adatokból a LightCycler készülék szoftvere olvadási görbét (a hőmérséklet függvényében felvett fluoreszcencia jelintenzitás negatív deriváltja) generált, a genotípusok beazonosítása a görbék vizuális értékelésével történt. Emellett szükség volt az optimalizációs mérések eredményeinek objektív összehasonlítására, ehhez a szoftver által számolt görbe alatti területet elnevezésű paramétert választottuk.

3.2.3 Szekvenálás

Az ABCG8 gén T400K variánsának vizsgálata kapcsán egy esetben szükség volt a várt olvadási görbétől ismételten lényegesen eltérő eredményt mutató minta genotípusának tisztázása céljából nukleotid szekvencia meghatározásra. Az amplifikációs lépés (PCR) 30 µl térfogatban zajlott, 200 ng genomiális DNS-t, 2 x PCR Master Mixet (Promega) és mindkét primerből 0,5 µmol/L tartalmazott. A PCR programban 95°C/3 perc kezdeti denaturáció után 35 ciklus következett (95°C/30 mp, 55°C/40 mp, 72°C/60 mp), amit 72°C/7 perc végső extenziós lépés zárt. A PCR terméket Montage PCR Kittel (Millipore Corp., Billerica, USA) tisztítottuk. A szekvenáló reakcióhoz a BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Kitet (Applied Biosystems, Foster City, USA) használtuk a gyártó leírásának megfelelően. A szekvenáló reakció tisztítása Multiscreen-HV tálcában (Millipore) kialakított Sephadex™ G-50 Superfine gyöngy oszlopon (Amersham Biosciences, Arlington Heights, USA) történt. A kapilláris elektroforézist és szekvencia analízist ABI PRISM 310 Genetic Analyzer készüléken és a Sequencing Analysis 5.3.1 programmal (Applied Biosystems) végeztük.

3.2.4 Lipid paraméterek meghatározása

A szérum koleszterin, a TG és a HDL szintek meghatározására standard kolorimetriás módszerrel történt. Az LDL szintet a Friedewald képlet alapján

számoltuk, amennyiben a koleszterin, a TG és a HDL szint értékek egyaránt rendelkezésre álltak. A kontroll csoport szérum mintáit centrifugálással szeparáltuk és a mérés elvégzéséig -70°C -on tároltuk. A donorok esetében nem mértünk TG szintet, mivel az ő esetükben a vérvétel nem éhgyomri állapotban történt, következésképpen esetükben LDL szintet sem számoltunk.

3.3 Statisztikai módszerek

Az allél-diszkriminációs módszer optimalizálására irányuló kísérleteknél a görbe alatti területek összehasonlítására Student-féle t-tesztet alkalmaztunk.

A klinikai vizsgálatoknál az allélgyakoriságokat (AF) 95%-os konfidencia tartománnyal (CI 95%) adtuk meg. A különböző betegcsoportok és a kontroll csoport allélgyakoriságának összehasonlítására többféle genetikai (allélikus, recesszív és domináns) modellt alkalmaztunk. Mindhárom modellnél külön a stroke és külön az ISZB csoport értékeit vetettük össze a kontrolléval. Az AF értékek összehasonlításánál mindig a betegcsoportok értékeit hasonlítottuk a kontroll csoport értékeihez. A genotípus megoszlások összehasonlítását elvégeztük a recesszív modell szerint (a ritka allélt homozigóta formában hordozók számát viszonyítva a gyakori allélt egy vagy két példányban hordozók számához) és a domináns modell szerint is (a ritka allélt egy vagy két példányban hordozók számát hasonlítottuk össze a gyakori allélt homozigóta formában hordozók számával). A genetikai modellek vizsgálatánál 2 x 2-es kontingencia táblát használtunk, ahol Fisher-féle egzakt tesztet alkalmazva két-oldalú p értéket és esélyhányadost (OR: odds ratio) számoltunk a GraphPad InStat v3.06 for Windows program segítségével (GraphPad Software, San Diego, USA, www.graphpad.com). Vizsgálatainkban az OR azt mutatja meg, hogy a vizsgált markert hordozók esetében hányszorosa a betegség kialakulásának az esélye, a markert nem hordozókhoz képest. Az 1 feletti OR magasabb kockázatot jelent, a marker feltehetően hajlamosít a betegség kialakulására. Az 1 alatti OR alacsonyabb kockázatot jelent, a marker feltehetően védőfaktor a betegséggel szemben. Az esélyhányados akkor mutat szignifikáns eltérést, ha a 95%-os konfidencia tartománya (CI 95%) nem tartalmazza az 1-et.

A vizsgált SNP-k hatásának függetlenségét a nemtől és életkortól multinomiális logisztikus regresszióval teszteltük, az SPSS 13.0 for Windows program (SPSS Inc, Chicago, USA) segítségével.

A Hardy-Weinberg egyensúly vizsgálata, a kapcsoltsági analízis és a haplotípus gyakoriságok becslése az SNPstats online szoftverrel történt (<http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats>, Solé és *mtsai* 2006).

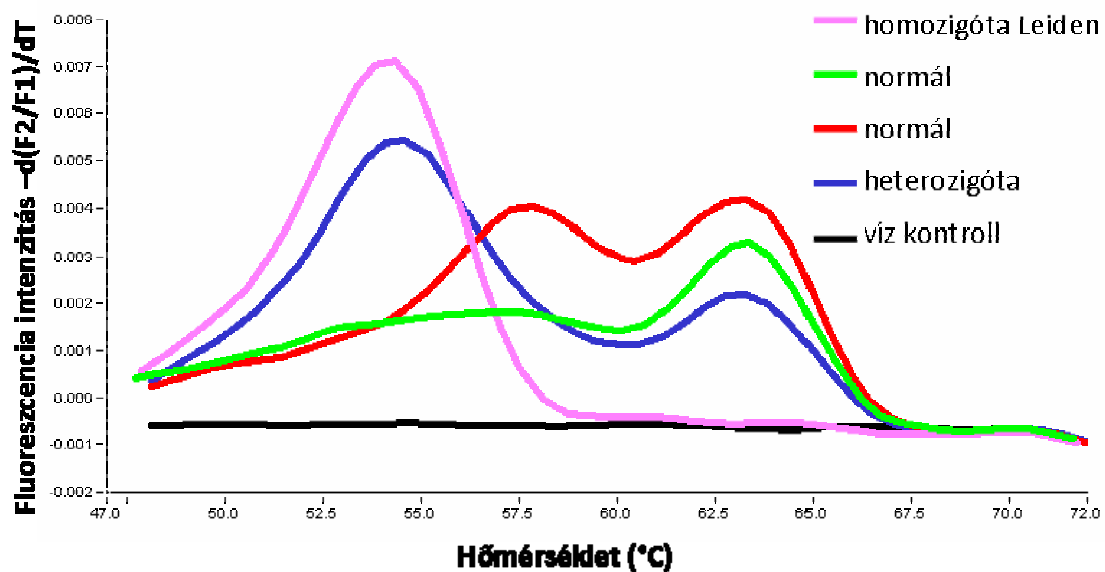
A lipid értékekkel kapcsolatos statisztikai értékeléseket az SPSS 13.0. for Windows program segítségével végeztünk. A lipid adatok eloszlás-vizsgálatára a Kolmogorov-Smirnov tesztet használtuk. A lipid értékek eloszlása a normál eloszlástól eltérő eloszlást mutatott, ezért nem-parametrikus próbákat (Kruskal-Wallis tesztet és Mann-Whitney tesztet) alkalmaztunk a különböző genotípusú csoportok lipid paramétereinek összehasonlítására. A lipid paraméterek megadására a mediánt, a 25. és a 75. percentilis értékeket használtuk. A két betegcsoport, illetve kontroll csoport lipid adatait külön-külön értékeltük, mivel a lipid érték meghatározása eltérő centrumokban történt. (Minden esetben csak egy adott betegcsoporton vagy csak a kontroll csoporton belüli összehasonlításokat végeztünk, a három csoport lipid értékeit egyik vizsgálatnál sem hasonlítottuk egymáshoz.)

A választott szignifikancia szint minden esetben $p < 0,05$ volt.

4 Eredmények

4.1 Olvadáspont analízis optimalizálása a LightCycler készüléken

Az V. faktor (FV) Leiden mutáció diagnosztikai kimutatására saját tervezésű genotipizáló rendszert alkalmaztunk a LightCycler készüléken. Az optimalizálást követően egyértelműen el tudtuk különíteni a három lehetséges genotípust egymástól. A homozigóta normál minták egy részénél viszont a specifikus olvadáspontoknak megfelelő csúcsok között egy harmadik csúcsot is detektáltunk, ami a 8. ábrán látható (piros és zöld görbék).

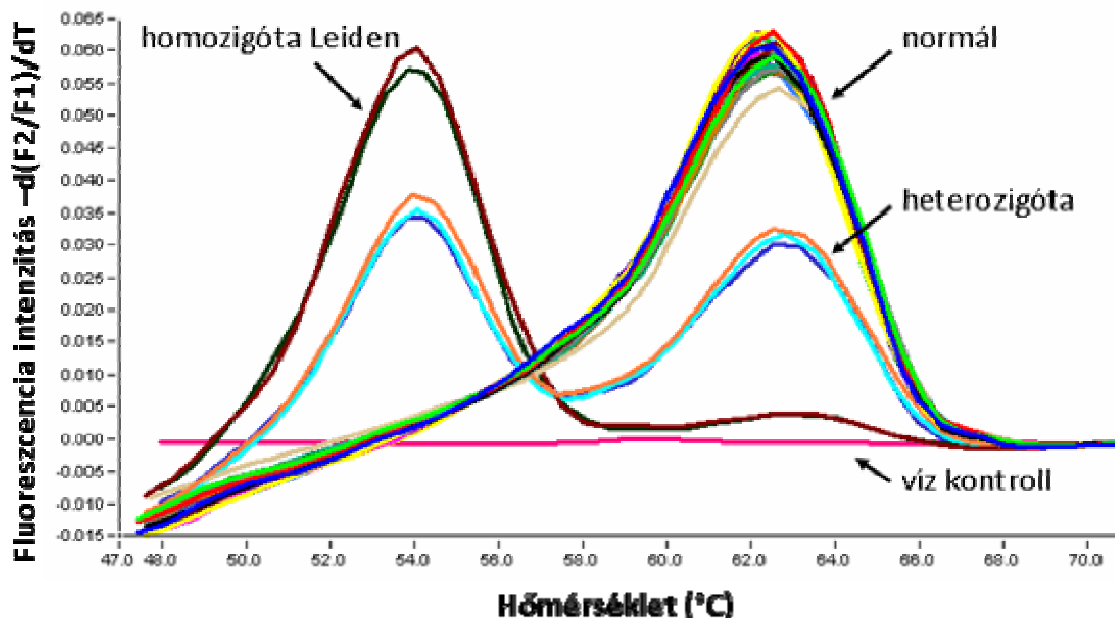


8. ábra: Szimmetrikus PCR-t követő olvadáspont analízis (FV Leiden)

Az V. faktor (FV) Leiden mutáció vizsgálata szimmetrikus (1:1 primer arányú) PCR-t követő olvadáspont analízissel. A különböző genotípusú minták görbéi: homozigóta Leiden (rózsaszín), heterozigóta (kék) és homozigóta normál (zöld és piros). A homozigóta normál minták egy részénél egy aspecifikus közbenső csúcsot tapasztaltunk (piros görbe).

A probléma megoldására (az aspecifikus csúcs eltüntetésére) többféle körülmény változtatásával próbálkoztunk. Az két amplifikációs primert eltérő (1:6,7 forward:reverse) arányban alkalmazva az olvadáspont analízis során a fluoreszcencia

intenzitás növekedését és a közbelső csúcs eltűnését tapasztaltuk. A 9. ábra 31 minta aszimmetrikus PCR-t követő olvadási görbe analízisét szemlélteti.



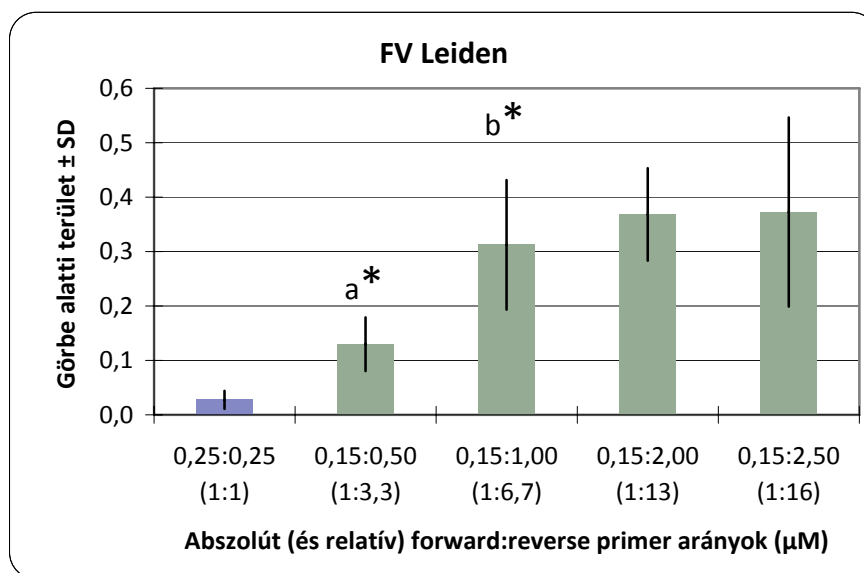
9. ábra: Aszimmetrikus PCR-t követő olvadáspont analízis (FV Leiden)

Az V. faktor (FV) Leiden mutáció vizsgálata aszimmetrikus (1:3,3 forward:reverse primer arányú) PCR-t követő olvadáspont analízissel. A különböző genotípusú minták (n=31) görbéi egymástól egyértelműen elkülönülnek, a szimmetrikus PCR-nél észlelt aspecifikus közbelső csúcs egyetlen mintánál sem tapasztalható.

Az FV Leiden genotipizálást modell rendszernek használva szisztematikusan megvizsgáltuk az eltérő arányban használt amplifikációs primerek (aszimmetrikus PCR) hatását az olvadásgörbe analízisre. A hatékonyság számszerű összehasonlításához az olvadási görbe görbe alatti területe, vagy a csúcsok magassága, mint két objektív, a LightCycler szoftvere által számított paraméter közül választhattunk. Előzetes vizsgálataink alapján a két paraméter egyenértékűnek tűnt (számszerűen eltértek ugyan, de hányadosuk – amire az összehasonlításokhoz szükségünk volt – közel azonos volt). Eredményeink összehasonlításához a görbe alatti területet választottuk.

Ahogy a reverse primert a forward primerhez képest egyre nagyobb feleslegben alkalmaztuk, a görbe alatti terület fokozatos növekedését tapasztaltuk. Az 1:3,3 arányban használt forward:reverse primer arány mellett a görbe alatti terület három párhuzamos mérés eredményeit értékelve szignifikáns mértékben, átlagosan 4,7-szeresére növekedett ($0,13 \pm 0,049$ SD vö. $0,028 \pm 0,017$ SD; $p=0,014$; lásd 10. ábra). A reverse primert még nagyobb feleslegben alkalmazva, 1:6,7 arány mellett, a görbe alatti

terület további, átlagosan 2,4-szeres emelkedést mutatott az 1:3,3-as primer arányú körülményhez viszonyítva ($0,31 \pm 0,12$ SD vö. $0,13 \pm 0,049$ SD; $p=0,035$). A primer arány ennél nagyobb mértékű eltolása (1:13 és 1:16 arányban) további, de már nem szignifikáns görbe alatti terület emelkedést eredményezett. Az 1:16 fölé emelt primer arány használata nem eredményezett további emelkedést (az ábra nem mutatja). A primer arány változtatása mellett teszteltük a primerek mennyiségének együttes (azaz 1:1 arányú) emelése, továbbá a hibridizációs szondapár mennyiség megduplázásának hatását is. A fenti változtatások nem szignifikáns mértékben és inkonzisztens módon befolyásolták a görbe alatti terület nagyságát.



10. ábra: Különböző primer arányokkal kivitelezett PCR-t követő olvadáspont analízisek görbe alatti terület értékei

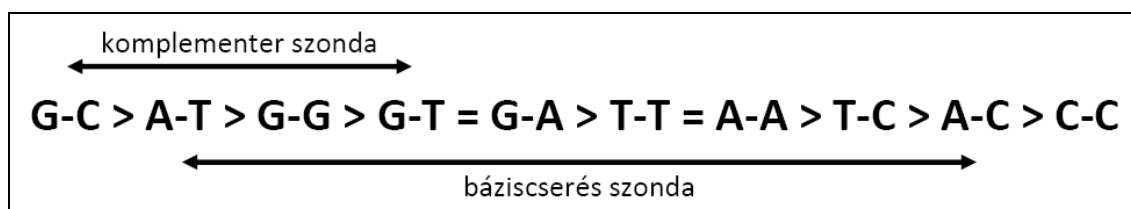
Szimmetrikus (kék oszlop) és aszimmetrikus (zöld oszlopok) primer arányokkal végeztünk PCR-t, 3 párhuzamos mérésben. A primer arányokat abszolút (és relatív) értékben, μM koncentrációban adtuk meg. A párhuzamos mérések olvadáspont görbéi átlagos görbe alatti területi értékeit ábrázoltuk, a hibásávok a tapasztalati szórásnak (SD) felelnek meg.

a* Az 1:3,3 arányú PCR-t követő olvadáspont analízis görbe alatti területe 4,7-szeresére emelkedett az 1:1 arányú körülményhez képest ($p=0,014$).

b* Az 1:6,7 arányú PCR-t követő olvadáspont analízis görbe alatti területe további 2,4-szeres emelkedést mutat az 1:3,3 arányú körülményhez viszonyítva ($p=0,035$).

Hipotézisünk alátámasztására, miszerint a PCR termék szondákkal komplementer DNS szálának relatív mennyiségét növelve fokozódhat az allél-diszkrimináció hatékonysága, egy új szondapárt terveztünk. Ezt az új szondapárt

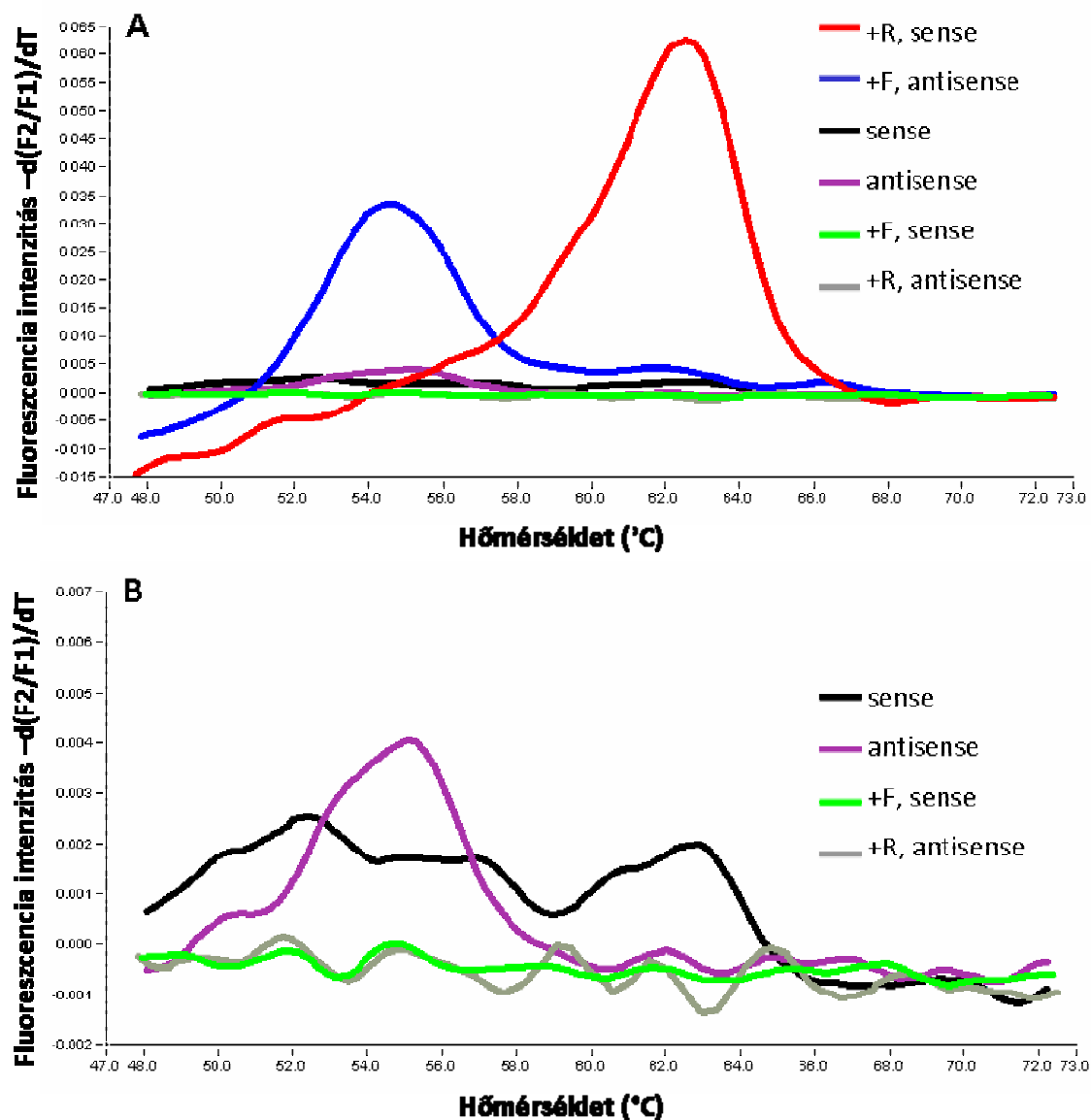
„antisense” szondapárnak neveztük el, mivel egy bázistól eltekintve tökéletesen komplementer az eredeti szondapárral. Az eltérés a mutáció helyének megfelelő bázis módosítása (1691. pozícióban G helyett A), amire azért volt szükség, mert az eredetivel komplementer szonda feltehetően kis hőmérsékletkülönbséggel vált volna le a normál, illetve a mutációt hordozó DNS szálakról. A komplementer szonda a kérdéses pozíció helyén G-t tartalmazna, amely a minta típusától függően vagy C, vagy T bázissal kerülne szembe (G-C vagy G-T párt alkotna). A szondában a G>A cserével így egy A kerül majd szembe a minta típusától függően vagy C, vagy T bázissal (A-C vagy A-T párok). Az egymással párba kerülő bázisok stabilitása a 10. ábrán bemutatott sorrendben csökken (Peyret és *mtsai* 1999).



11. ábra: Nukleotid bázispárok stabilitási sora

A 10 lehetséges nukleotid bázispár stabilitása csökkenő sorrendben feltüntetve (Peyret és *mtsai* 1999 nyomán). A nyilak a sense szondával tökéletes komplementaritást mutató és a mutáció helyén egy báziscserét tartalmazó szonda jósolható, a vad és mutáns allélt tartalmazó DNS-szálak közötti stabilitási különbségeit szemléltetik.

A módosítással a stabilitási sorban egymástól nagyobb távolságban található párokat kaptunk (A-C és A-T távolabb van egymástól, mint G-C és G-T), így a normál és a mutációt hordozó DNS szál olvadáspontja között nagyobb hőmérséklet-különbség várható, vagyis az olvadáspont görbén a két típusnak megfelelő csúcs egymástól távolabb kerül, ezáltal a vizuális kiértékelés során a csúcsok egymástól jobban elkülöníthetővé válnak. A báziscsere egyben azt is eredményezi, hogy az antisense szondapár a variáns Leiden allélnek megfelelő termékhez kötődik erősebben (azzal mutat teljes komplementaritást), így az antisense szondapárral végzett kísérletnél, az eredeti elrendezéssel ellentétben, a magasabb olvadáspontot mutató csúcs felel meg a variáns (Leiden) allélnek.

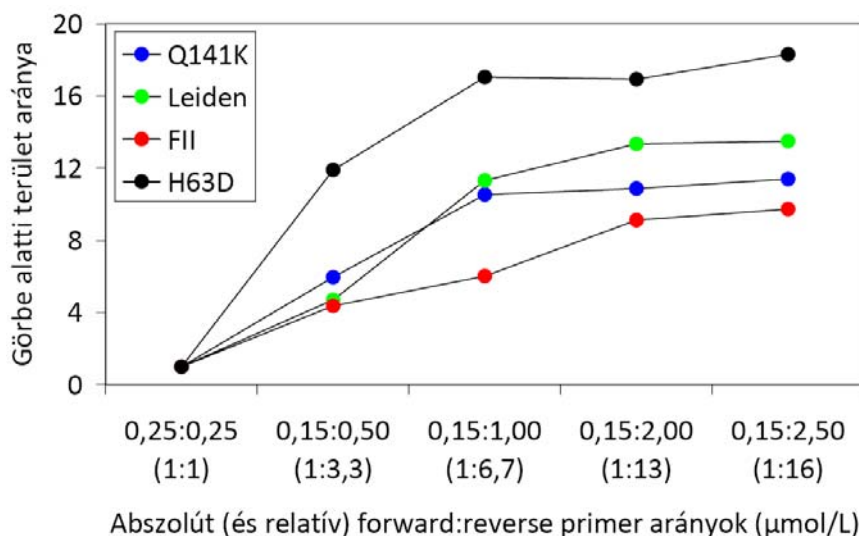


12. ábra: A sense és antisense szondapárokkal és eltérő amplifikációs primer arányokkal végzett olvadáspont analízis görbék összehasonlítása.

Szimmetrikus (1:1 primer arányú) és aszimmetrikus (1:3,3 és 3,3:1 primer arányú) PCR-t, majd mindhárom körülmény PCR termékén olvadásgörbe analízist végeztünk a sense és antisense szondapárokkal (külön reakcióban). (A) A legmagasabb csúcsot a sense szondapárt és a reverse primer feleslegét tartalmazó reakcióban mértük (piros). Alacsonyabb csúcsot kaptunk az antisense szondapárt és a forward primer feleslegét tartalmazó reakcióban (kék). A kedvezőtlen arányú primer felesleggel végzett (sense szondapár reverse primer többlettel [szürke], antisense szondapár forward primer többlettel [zöld]) és a szimmetrikus PCR-ek termékeinek olvadáspont görbéi az (A) ábrarész felbontásánál egymástól elkülöníthetetlen görbéket mutatnak. A (B) ábrarész ennek az alsó szakasznak a kinagyítása, kb. 9-szeres nagyítás. Mindkét szondapár szimmetrikus PCR-t követő olvadáspont görbéi (lila és fekete) ennél a felbontásnál értékelhető eredményt adnak, míg a kedvezőtlen arányban alkalmazott primer arányok esetében a görbék továbbra is értékelhetetlenek.

Következő kísérletünkben a sense és antisense szondapárokkal végeztünk párhuzamos olvadáspont analízist, azonos PCR körülményekből kiindulva. Egy homoizgota normál mintát amplifikáltunk 3 különböző primer arányt alkalmazva (3,3:1; 1:1 és 1:3,3), mindhárom körülményből 2-2 párhuzamos PCR-rel. Az olvadáspont analízishez a párhuzamos mérések közül az egyik esetben a sense, a másikban pedig az antisense szondapárokat alkalmaztuk. Az olvadáspont analízissel kapott eredményeinket a 12. ábra mutatja. Az eredeti szondapár a reverse primer felesleget tartalmazó PCR-t követő olvadási görbén mutatott kimagasló jelintenzitást, a komplementer szondapár pedig a forward felesleggel rendelkező PCR-t követően. A szimmetrikus PCR körülménynek megfelelő és a kedvezőtlen arányban alkalmazott primerekkel amplifikált kísérletekben jóval alacsonyabb fluoreszcencia intenzitást tapasztaltunk, az utóbbi reakcióknak megfelelő olvadási görbék a 12/A ábrán látható fluoreszcencia skálán ábrázolva szinte teljesen egymásra fekszenek. A 12/B ábra megfelel a 12/A ábrának, azzal a különbséggel, hogy a fluoreszcencia intenzitás skála maximumát 0,065-ről 0,007-re változtattuk (kb. 9-szeres nagyítás). A szimmetrikus PCR körülményt követő olvadási görbék mindkét szondapár esetén a kedvező arányban eltolt arányban alkalmazott primerekkel végzett kísérlethez képest jóval alacsonyabb, de értékelhető jelet adtak. A kedvezőtlen arányban alkalmazott primerekkel végzett aszimmetrikus PCR utáni olvadási görbéken, még további felbontás növelésnél sem észlelhető a genotípusnak megfelelő hőmérsékletnél olvadási csúcs, egyik szondapár esetében sem.

További három genotipizáló rendszeren (ABCG2 Q141K, FII g.20210G>A, HFE H63D) vizsgáltuk az aszimmetrikus PCR olvadási görbe jelintenzitására gyakorolt hatását. A szimmetrikus primer körülmény mellett négy aszimmetrikus körülményt teszteltük, 1:3,3; 1:1,6; 1:13 és 1:16 primer arányokkal (mindig az adott rendszernél előnyös primert alkalmazva feleslegben). Valamennyi vizsgált genotipizáló rendszerben hasonló tendenciát tapasztaltunk: a szimmetrikus PCR körülményhez viszonyítva, az 1:3,3 és 1:6,7 primer arányoknál minden esetben növekedett a csúcs alatti terület nagysága (lásd 10. ábra). Az ennél nagyobb mértékű primer arányok esetében (1:13 és 1:16) már nem minden esetben tapasztaltunk jelintenzitás növekedést. A szimmetrikus körülményhez viszonyítva az 1:6,7 arányban alkalmazott amplifikációs primerek mellett a 4 vizsgált rendszer esetében átlagosan 11,2-szeresére emelkedett a jelintenzitás (6-17-szeresig terjedő tartományban).



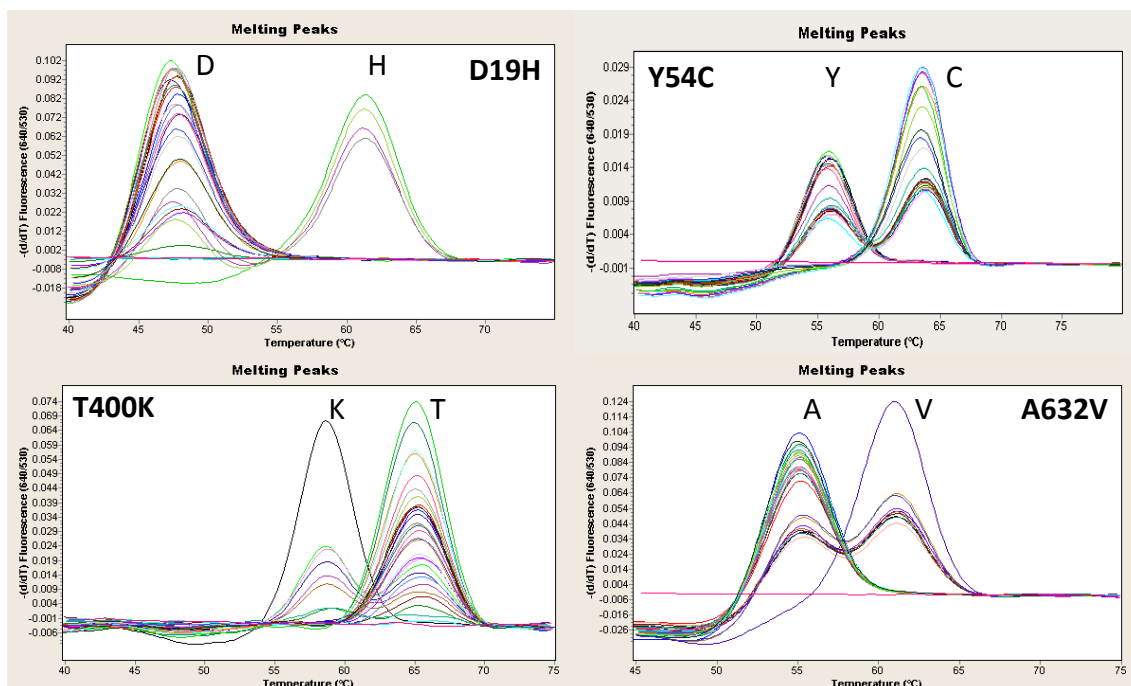
13. ábra: Különböző amplifikációs primer arányok hatása az olvadáspont analízis görbe alatti területének nagyságára négy genotipizáló rendszerben

Az ABCG2 Q141K (Q141K), prothrombin g.20210G>A (FII), FV Leiden (Leiden) és HFE H63D (H63D) variánsok amplifikációját az ábrán feltüntetett eltérő primer arányokkal, de egyébként azonos körülmények között, homozigóta mintákon végeztük. A relatív arányok mindig az adott tipizáló rendszernek megfelelő kedvező primer többletét mutatják, az abszolút értékek μmol/L-ben értendők (végső koncentrációk). Az olvadásgörbe analízist követően a LightCycler software megadta a görbe alatti terület nagyságát. A jobb összehasonlíthatóság kedvéért a relatív görbe alatti terület növekedését adtuk meg, amihez a görbe alatti területek értékeit elosztottuk a megfelelő 1:1 primer arányú görbe értékével.

4.2 ABCA1 és ABCG8 polimorfizmusok vizsgálata

4.2.1 Genotípusok meghatározása

Genomiális DNS mintából kiindulva PCR-t követő fluoreszcens allél-diszkriminációs módszerrel határoztuk meg az ABCA1 (R219K, V771M, I883M) és ABCG8 polimorfizmusok (D19H, Y54C, T400K, A632V) genotípusát a kontroll és a betegcsoportokban. A 14. ábrán azoknak az allél-diszkriminációs metodikáknak a tipikus olvadáspont analízis görbéit mutatjuk be, ahol az olvadáspont meghatározást aszimmetrikus PCR előzte meg (ABCG8 SNP-k). Az ABCA1 variánsok meghatározására még az aszimmetrikus PCR bevezetése előtt került sor.



14. ábra: ABCG8 polimorfizmusok (D19H, A632V, T400K és Y54C) olvadáspont görbéi. Az ABCG8 alléleknek megfelelő csúcsot az adott pozícióban az allél által meghatározott aminosav kódjával jelöltük. Az ábrán minden SNP esetén mindhárom lehetséges genotípust legalább egy minta reprezentál.

4.2.2 Allélgyakoriságok

A kontroll- és a betegcsoportokon belül tapasztalt genotípus megoszlásokat és az ebből számított allélgyakoriság (AF) értékeket azok 95%-os konfidencia intervallumával (95% CI) a 5. táblázatban foglaltuk össze. Annak eldöntésére, hogy a különböző allélek, hozzájárulhatnak-e a stroke vagy ISZB kialakulásához, összehasonlítottuk a betegcsoportban mért AF értékeket a kontroll csoportban mért értékekkel. Mind a stroke, mind az ISZB csoportban csökkent AF értékeket tapasztaltunk az R219K és V771M variánsok esetében (stroke: $28,6 \pm 4,1\%$ [R219K] és $3,1 \pm 1,6\%$ [V771M]; ISZB: $25,7 \pm 5,1\%$ [R219K] és $1,4 \pm 1,3\%$ [V771M]) a kontroll csoporthoz viszonyítva ($31,2 \pm 4,7\%$ [R219K] és $5,0 \pm 2,2\%$ [V771M]). Az ISZB csoportban az ABCA1 V771M polimorfizmusának a kontroll csoporthoz viszonyított allélgyakoriság csökkenése szignifikáns eltérésnek bizonyult ($p=0,010$). Mivel a ritka allél (771M) a betegcsoportban kisebb gyakorisággal fordul elő, vagyis akik ilyen alléllal rendelkeztek, azoknál ritkábban manifesztálódott a betegség, ezért védőfaktornak tekinthető, amit az 1-nél kisebb értékű esélyhányados is mutat (OR [95% CI]: $0,3 [0,1-0,8]$; lásd 6. táblázat).

5. táblázat: ABCA1 R219K, V771M, M883I és ABCG8 D19H, Y54C, T400K, A632V allél variánsok genotípusok szerinti megoszlása a kontroll és a beteg csoportokban

Genotípus megoszlás	Kontroll n (%)	Stroke n (%)	ISZB n (%)
ABCA1 R219K			
RR	95 (49,8)	132 (54,8)	83 (56,1)
RK	73 (38,2)	80 (33,2)	54 (36,5)
KK	23 (12,0)	29 (12,0)	11 (7,4)
AF (%) $\pm$ 95% CI	31,2 $\pm$ 4,7	28,6 $\pm$ 4,1	25,7 $\pm$ 5,1
ABCA1 V771M			
VV	172 (90,1)	227 (94,2)	144 (97,3)
VM	19 (9,9)	13 (5,4)	4 (2,7)
MM	0	1 (0,4)	0
AF (%) $\pm$ 95% CI	5,0 $\pm$ 2,2	3,1 $\pm$ 1,6	1,4 $\pm$ 1,3*
ABCA1 I883M^a			
II	79 (76,7)	175 (72,6)	115 (77,7)
IM	23 (22,3)	59 (24,5)	29 (19,6)
MM	1 (1,0)	7 (2,9)	4 (2,7)
AF (%) $\pm$ 95% CI	12,1 $\pm$ 4,6	15,1 $\pm$ 3,3	12,5 $\pm$ 3,8
ABCG8 D19H			
DD	173 (90,6)	220 (91,3)	132 (89,2)
DH	18 (9,4)	20 (8,3)	15 (10,1)
HH	0	1 (0,4)	1 (0,7)
AF (%) $\pm$ 95% CI	4,7 $\pm$ 2,2	4,6 $\pm$ 1,9	5,7 $\pm$ 2,7
ABCG8 Y54C			
YY	71 (37,2)	80 (33,2)	58 (39,2)
YC	84 (44,0)	123 (51,0)	62 (41,9)
CC	36 (18,8)	38 (15,8)	28 (18,9)
AF (%) $\pm$ 95% CI	40,8 $\pm$ 5,0	41,3 $\pm$ 4,5	39,9 $\pm$ 5,7
ABCG8 T400K			
TT	124 (64,9)	164 (68,1)	94 (63,5)
TK	62 (32,5)	67 (27,8)	51 (34,5)
KK	5 (2,6)	10 (4,1)	3 (2,0)
AF (%) $\pm$ 95% CI	18,8 $\pm$ 4,0	18,0 $\pm$ 3,5	19,3 $\pm$ 4,6
ABCG8 A632V			
AA	119 (62,3)	156 (64,7)	94 (63,5)
AV	63 (33,0)	70 (29,1)	52 (35,1)
VV	9 (4,7)	15 (6,2)	2 (1,4)
AF (%) $\pm$ 95% CI	21,2 $\pm$ 4,2	20,7 $\pm$ 3,7	18,9 $\pm$ 4,6
Összesen	n=191^a	n=241	n=148

A táblázat adatai az egyes genotípusokhoz tartozó személyek számát és zárójelben azok gyakoriságát (%) mutatják. Az allélgyakoriság (AF) értékeket százalékban (%) adtuk meg, azok 95%-os konfidencia intervallumával (95% CI).

*Az ISZB csoport V771M AF értéke szignifikáns eltérést mutatott a kontrollhoz képest ($p=0,010$; OR [95% CI]: 0,3 [0,1-0,8]; a 771M variáns védőfaktor szerepet játszhat).

^a Az I883M esetében a kontroll csoport a többi SNP-től eltérően 103 főből állt.

A statisztikai elemzés során a többi AF eltérés nem bizonyult szignifikánsnak. Az ABCG8 variánsok AF értékei nem mutattak szignifikáns eltérést a kontroll csoporthoz viszonyítva egyik vizsgált betegcsoport esetében sem.

4.2.3 Genotípus gyakoriságok

Sok esetben célszerű a vizsgált csoportok összehasonlítását dichotomizált bontásokban is elvégezni. A domináns genetikai modell szerinti elemzés során a ritka allélt (1 vagy 2 példányban) hordozók gyakoriságát és a gyakori allélra nézve homozigóta személyek gyakoriságát hasonlítjuk össze a beteg és kontroll csoportok között, feltételezve, hogy a ritka allél a domináns, így hatását már egy példányban is kifejtheti, vagyis a homozigóta ritka és a heterozigóta genotípusok azonos hatást gyakorolhatnak a fenotípusra. A recesszív genetikai modell szerinti megközelítésnél a ritka allélt recesszívnek feltételezve, a homozigóta ritka allélt hordozók gyakoriságát viszonyítjuk az összes többi együttes gyakoriságához, feltételezve, hogy a fenotípusos változás kialakulásához a variáns allélnek homozigóta formában kell jelen lennie.

Mind a 7 említett genetikai variáns esetében elvégeztük a domináns genetikai modell szerint a betegcsoportok összehasonlítását a kontrollal, és azoknál a polimorfizmusoknál, ahol a ritka allélre homozigóták aránya 5% felett volt, ott a recesszív modell szerint is. A V771M variáns az ISZB csoport esetében a domináns genetikai modell szerint vizsgálva szignifikáns eltérést mutatott a kontrollhoz viszonyítva ($p=0,008$; OR [95% CI]: 0,2 [0,1-0,7]; lásd 15/B ábra és 6. táblázat). Ez megerősíti az allél frekvencia elemzés során észlelt összefüggést (lásd 4.2.2 fejezet): a 771M hordozók védettebbek lehetnek az ISZB manifesztációjával szemben. A V771M variáns esetében a stroke betegséggel kapcsolatban nem észleltünk hasonló összefüggést. A genetikai modellekkel a többi variáns esetében nem észleltünk további összefüggéseket a genotípusok és a teljes betegcsoportok között.

4.2.4 Alcsoport vizsgálatok

Az ABCA1 R219K és a V771M variánsok esetében szeretnénk volna kideríteni, milyen tényező húzódhat meg a beteg- és kontroll csoportok között kimutatható eltérő AF értékek hátterében (lásd 4.2.2 fejezet). Ennek eldöntésére a betegcsoportokat különféle szempontok szerint alcsoportokra osztottuk (pl. a nem vagy a diagnózis

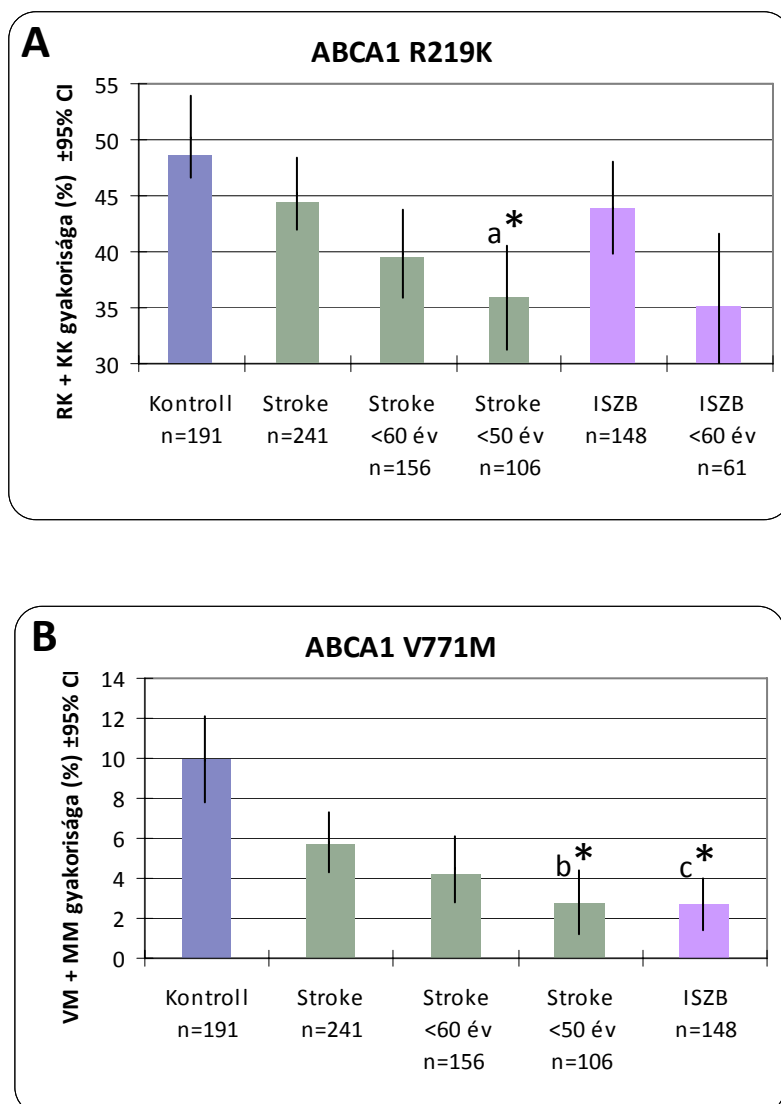
időpontjában betöltött életkor alapján) és ezekben vizsgáltuk a genotípusok kontrollhoz viszonyított gyakoriságát. A stroke csoport esetében különböző klinikai paraméterek alapján további alcsoportokat képeztünk a betegség súlyossága és a carotis duplex scan eredménye szerint. Vizsgáltuk az egyidejűleg jelen lévő ISZB hatását, végül összehasonlítottuk az egyéb ismert kockázati tényezők száma alapján létrehozott „alacsony” és „magas” kockázatú csoportokat.

4.2.4.1 Nemek alapján képzett alcsoportok vizsgálata

A férfiakat és nőket külön alcsoportként is megvizsgáltuk. Erre a bontásra egyrészt az adott indokot, hogy a kontroll csoportban a nemek aránya kb. 1:1, míg mindkét betegcsoportban kb. 2,5:1 a férfi:nő arány (lásd 1-3. táblázatok), másrészt az irodalmi adatok arra utaltak, hogy a két nem esetében jelentős eltérések lehetnek a lipid metabolizmus tekintetében. A genotípus gyakoriságokat a férfiakra és nőkre szűkített kontroll alcsoportok értékeivel vetettük össze. Egyik nem esetében sem találtunk szignifikáns eltérést a vizsgált variánsok esetében.

4.2.4.2 Diagnózis felállításakor betöltött életévek alapján képzett beteg alcsoportok vizsgálata

A betegcsoportok az átlagéletkor tekintetében nem mutattak teljes egyezést a kontroll csoporttal (stroke: $53,4 \pm 14,5$; ISZB: $61,4 \pm 9,3$; kontroll: $35,3 \pm 11,8$ év). Emellett a multifaktoriális betegségek esetében, az olyan esetek vizsgálatával, akiknél a betegség fiatalabb korban manifesztálódott, nagyobb esély van az örökletes tényezők azonosítására, mivel náluk a környezeti tényezők hatása még kevésbé kifejezett. Ezért a következő felosztásban a betegeket diagnóziskori életkoruk alapján soroltuk alcsoportokba. Az idősebb korban diagnosztizált betegeket 5 éves intervallumos egységekben fokozatosan kizárva, sorra létrehoztuk a 60-ik, 55-ik és 50-ik életévük alatt, külön a stroke-kal, majd külön az ISZB-vel diagnosztizált betegek alcsoportjait. Így a felsorolás sorrendjében egyre kisebb esetszámú csoportokat képeztünk. A genotípus gyakoriságokat mindkét betegség összes alcsoportja esetén, mindig a teljes kontroll csoport adataival hasonlítottuk össze.



15. ábra: ABCA1 R219K hordozó (RK+KK) genotípusok (A) és ABCA1 V771M hordozó (VM+MM) genotípusok (B) gyakoriságának összehasonlítása a kontroll és betegcsoportokban.

Az oszlopok a hordozók gyakoriságát jelölik a teljes kontroll csoportban (kék), illetve a stroke (zöld) és az ISZB (lila) életkor szerint képzett alcsoportjaiban. A hibasávok a 95%-os konfidencia intervallumnak felelnek meg. A kontrollhoz viszonyítva csökkent hordozó gyakoriságot észlelünk mindkét betegcsoport esetében, amely még markánsabbá válik, az egyre fiatalabb életkorban diagnosztizált beteg alcsoportok felé haladva.

a* Az 50 év alatt diagnosztizált stroke betegek esetében az R219K hordozó gyakoriság szignifikánsan eltér a kontrollhoz viszonyítva ($p=0,022$; OR [95% CI]: 0,6 [0,3-0,9]).

b* Az 50 év alatt diagnosztizált stroke betegek esetében a V771M hordozó gyakoriság szignifikánsan eltér a kontrollhoz viszonyítva ($p=0,035$; OR [95% CI]: 0,3 [0,1-0,9]).

c* Az ISZB csoportban a V771M hordozók gyakorisága szignifikánsan eltér a kontrollhoz viszonyítva ($p=0,008$; OR [95% CI]: 0,2 [0,1-0,7]).

Két ABCA1 variáns esetében (R219K, V771M) az alacsonyabb korban diagnosztizált betegek felé haladva csökkenő tendencia mutatkozott a ritkább allélt (219K, illetve 771M) hordozó egyének gyakoriságában. Egy ABCG8 variáns esetében (Y54C) hasonló tendenciát észleltünk, de ebben az esetben a gyakoribb allélra homozigóta egyének (54YY) gyakorisága mutatott csökkenő tendenciát az alacsonyabb életkorban felállított diagnózisú alcsoportok felé haladva. Az R219K allél esetében a tendencia mindkét betegcsoportban megfigyelhető volt (lásd 15/A). A V771M esetében a tendencia szintén mindkét betegcsoport esetében jelen volt (15/B ábra), de a 60 év alatt ISZB-vel diagnosztizáltak körében egyetlen fő sem hordozta a ritka (771M) allélt (az ábrán nem tüntettük fel). Az Y54C esetében ezt a jelenséget csak a stroke csoportban tapasztaltuk (ábra nem mutatja).

Az R219K variánst a domináns genetikai modell szerint vizsgálva, az 50 év alatt stroke-kal diagnosztizált betegek csoportjában ($n=106$) az eltérés szignifikánsnak mutatkozott ($p=0,022$), a ritka allélt hordozó státusz (219RK+219KK) védőfaktorként szerepelhet a stroke-kal szemben (OR [95%CI]: 0,6 [0,3-0,9]). Az R219K variáns és az ISZB vonatkozásában tapasztalt tendencia nem bizonyult szignifikánsnak. A 15/A ábra a ritka allélt hordozók gyakoriságát szemlélteti a diagnózis felállításakor betöltött életkor alapján képzett alcsoportokban és a kontrollban.

A V771M variáns esetében szintén a domináns modellnek megfelelő összehasonlításban szignifikáns eltérés mutatkozott az 50 év alatt stroke-kal diagnosztizált betegeket ($n=106$) a kontrollhoz viszonyítva ($p=0,035$; OR [95% CI]: 0,3 [0,1-0,9]), továbbá a teljes ISZB csoportot ($n=148$) a kontrollhoz viszonyítva (lásd fentebb, 4.2.3 fejezet). Mindkét összefüggésben a 771M variáns hordozó formában feltehetően védőfaktor szerepet tölt be. A 15/B ábrán a V771M variáns esetében – az R219K-hoz hasonlóan – szintén a ritka allélt hordozók gyakoriságát tüntettük fel.

Az Y54C variáns esetében tapasztalt tendencia (az 54YY genotípus csökkenése az egyre alacsonyabb életkorban stroke-kal diagnosztizált beteg alcsoportok felé haladva) nem bizonyult szignifikáns mértékűnek.

A harmadik ABCA1 variáns (az I883M) és a többi ABCG8 variáns (D19H, T400K, A632V) genotípus gyakorisága nem mutatott szignifikáns eltérést a kontrollhoz viszonyítva egyik vizsgált betegcsoportban sem, az életkor szerint létrehozott alcsoportok összehasonlítása során.

6. táblázat: A beteg és kontroll csoportok allél- és genotípus gyakoriság eltérései különböző alcsoport bontásokban

Genetikai modell	Alcsoport		Stroke			ISZB	
	n	ABCA1 R219K	ABCA1 V771M	ABCG8 Y54C	n	ABCA1 V771M	
Allélikus	241	n.sz.	n.sz.	n.sz.	148	p=0,010 OR: 0,3 [0,1-0,8]	
	241	n.sz.	n.sz.	n.sz.	148	p=0,008 OR: 0,2 [0,1-0,7]	
	<60 év	n.sz.	n.sz.	n.sz.	61	p=0,009 OR: 0,1 [0,1-1,2]	
	<50 év	p=0,022 OR: 0,6 [0,3-0,9]	p=0,035 OR: 0,3 [0,1-0,9]	n.sz.	15	- ^a	
	férfi	n.sz.	n.sz.	n.sz.	105	n.sz.	
Domináns	férfi, <60 év	p=0,028 OR: 0,5 [0,3-0,9]	n.sz.	n.sz.	40	n.sz.	
	férfi, <50 év	p=0,031 OR: 0,5 [0,2-0,9]	n.sz.	p=0,038 OR: 2,2 [1,1-4,5]	12	- ^a	

A táblázatban feltüntetjük az alkalmazott genetikai modell tesztet, az alcsoportba sorolási feltételt, a vizsgált esetszámot (n) külön a stroke és ISZB betegcsoportokban, valamint a beteg és kontroll csoport vonatkozásában szignifikáns eltérést mutató esetekben a szignifikancia (p) és esélyhányados (OR [95% CI]) értékeket.

Allélikus modell: allélgyakoriság értékek összehasonlítása.

Domináns modell: ritka allélt hordozók gyakoriságának hasonlítása a gyakori allélre homozigóta egyénekkel.

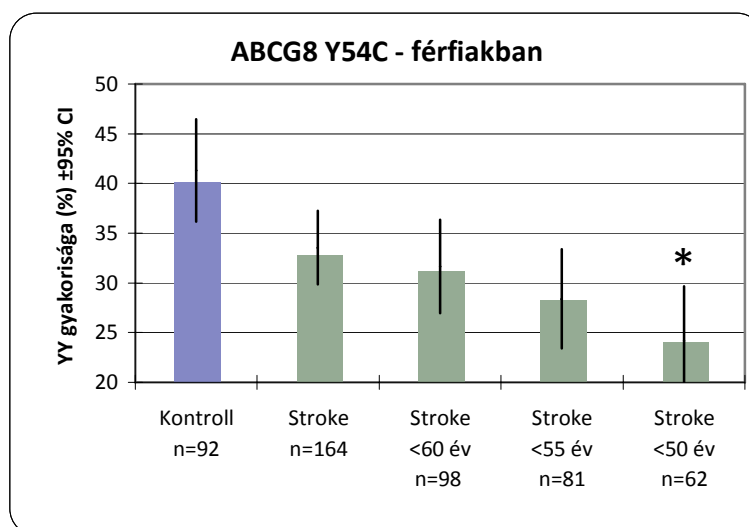
^aAhol az alcsoport esetszáma 40 alá csökkent, ott az alacsony esetszáma való tekintettel nem végeztünk összehasonlítást.

Rövidítések: ISZB: ischaemiás szívbetegség; n.sz.: nem szignifikáns.

4.2.4.3 Életkor szerinti csoportosítás további bontása a nemek szerint

Az R219K, V771M és Y54C variánsok esetében multivariancia analízissel (logisztikus regresszióval) megvizsgáltuk, hogy a kérdéses variánsok függetlenek-e a diagnóziskori életkortól és a nemtől. Kimutattuk, hogy az R219K és V771M variánsok az életkortól és a nemtől független védőfaktorok a stroke-kal szemben (R219K: $p=0,026$; OR [95% CI]: 0,7 [0,5-0,9]; V771M: $p=0,016$, OR [95% CI]: 0,3 [0,1-0,8]), ugyanakkor egymástól nem függetlenek. A V771M variáns az ISZB-vel szemben is független védőfaktornak bizonyult ($p=0,027$, OR [95% CI]: 0,1 [0,1-0,8]). Kiderült, hogy az Y54C nem független sem az életkortól, sem a nemtől, ezért Y54C esetében az életkor szerinti alcsoportokat a nemek szerinti további bontásban is megvizsgáltuk.

A 16. ábrán az 54YY gyakoriságának értékei láthatók a férfi kontroll és férfi stroke alcsoportokban. Az ábra jól szemlélteti, hogy már a teljes férfi stroke csoportban is csökkent YY gyakoriság tapasztalható a férfi kontrollhoz képest, de az eltérés nem szignifikáns. A gyakoriság tovább csökken, ahogy sorra szűkítjük az alcsoportot a 60, 55, ill. 50 év felett diagnosztizált betegek kizárásával. Az 50 év alatt diagnosztizált csoport (62 fő) YY gyakorisága szignifikáns eltérést mutat a kontrollhoz képest ($24,2\% \pm 5,4$ vö. $41,3\% \pm 5,1$; $p=0,038$; OR [95% CI]: 0,5 [0,2-0,9]). Az 54Y allél homozigóta formában védőfaktor lehet a stroke kialakulásával szemben 50 év alatti férfiak esetében. (A 6. táblázatban 1 feletti esélyhányados érték található az említett összefüggésre, mivel ott a domináns genetikai modellnek megfelelő eredmény szerepel, azaz az YC+CC genotípus hajlamosító tényező a fenti összefüggésben.) A nők esetében hasonló összefüggést nem mutattunk ki.



16. ábra: Y54C gyakori allélra (YY) homozigóták gyakoriságának összehasonlítása a kontroll és a stroke alcsoportokban.

Az oszlopok az 54YY genotípus gyakoriságát jelölik a kontrollban (kék) illetve a stroke életkor szerint képzett alcsoportjaiban (zöld), a hibasávok a 95%-os konfidencia intervallumnak felelnek meg. A férfi kontrollhoz viszonyítva csökkent gyakoriságot észlelünk a férfi stroke betegek esetében, amely még határozottabbá válik, az egyre fiatalabb életkorban diagnosztizált stroke alcsoportok felé haladva.

* Az 50 év alatt diagnosztizált stroke betegek esetében az 54YY genotípust mutató egyének gyakorisága szignifikánsan eltér a kontroll csoport gyakoriságához viszonyítva ($p=0,038$; OR [95% CI]: 0,5 [0,2-0,9]).

Mivel logisztikus regressziós analízissel igazoltuk, hogy a stroke betegek esetében az R219K és V771M, illetve az ISZB betegek esetében a V771M a nemtől és életkortól független védőfaktorok, így nem lett volna feltétlen szükséges ezen csoportoknak a nemek szerinti szétválasztása és analízise. Csak a férfiakat vizsgálva az R219K variáns a domináns genetikai modellnek megfelelően már a 60 év alatt diagnosztizált stroke betegek esetén is szignifikáns hordozó gyakoriság-eltérést mutatott a kontrollhoz képest ($p=0,028$; OR [95% CI]: 0,5 [0,3-0,9]; lásd 6. táblázat). Az előzőekben, nőkkel együttesen vizsgálva, hasonló összefüggést (csökkent hordozó gyakoriságot) csak egy szűkebb, az 50 év alatt diagnosztizált csoportban tudtuk kimutatni. Szintén csak a férfiakat vizsgálva a V771M variáns esetében nem tudtuk a variáns védőfaktor szerepét statisztikailag megerősíteni, egyik betegcsoportban sem, feltehetően a variáns igen alacsony AF értéke miatt (átlagosan 3,3%). Csak a nőket vizsgálva egyik variáns esetén sem találtunk szignifikáns eltérést.

Végül, csak az 50 év alatti férfiakat vizsgálva, logisztikus regressziós analízissel megállapítottuk, hogy az életkor, az R219K és V771M genotípusok, valamint az 54YY státusz egymástól független tényezők a stroke kialakulása szempontjából ($p < 0,001$; $p = 0,037$; $p = 0,023$ és $p = 0,023$; a felsorolás sorrendjében).

A vizsgálataink során tapasztalt AF és genotípus gyakoriság összefüggéseket egy áttekintő táblázatban foglaltuk össze, lásd 6. táblázat.

4.2.4.4 Klinikai jellemzők alapján képzett stroke alcsoportok vizsgálata

Annak kiderítésére, hogy a vizsgált polimorfizmusok hatással vannak-e a betegség súlyosságára, klinikai megjelenési formájára, további alcsoportokat képeztünk ismert klinikai paraméterek alapján. Az egyik ilyen összehasonlításban egy olyan stroke alcsoportot vizsgáltunk, amelyből kizártuk a TIA-val diagnosztizált betegeket. A TIA-mentes stroke alcsoportban ($n = 164$) logisztikus regressziós analízissel az R219K ($p = 0,013$) és a V771M ($p = 0,042$) továbbra is a nemtől és életkortól független védőfaktorok bizonyultak. Az Y54C esetében a TIA-mentes csoportban – a teljes stroke csoporthoz hasonlóan – nem észleltünk hasonló összefüggést.

Annak érdekében, hogy kizárjuk a stroke-kal társult ISZB esetleges módosító hatását a stroke-kal diagnosztizált betegek eredményeire, logisztikus regressziós analízist végeztünk azokon a stroke betegeken, akik anamnézisében ISZB nem szerepelt ($n = 205$; a teljes stroke csoport 85,1%-a). Az eredmények azt mutatták, hogy az R219K és V771M variánsok az életkortól és nemtől független védőfaktorok az ISZB-mentes stroke alcsoportban is (R219K: $p = 0,033$, OR [95% CI]: 0,7 [0,5-0,9], és V771M: $p = 0,033$, OR [95% CI]: 0,4 [0,2-0,9]). A V771M stroke csoportban tapasztalt védő szerepe nem tulajdonítható a stroke-kal gyakran együtt előforduló ISZB-ben kimutatott védő szerepének.

Egy következő összehasonlításban, a stroke betegeket a carotis duplex scan eredményeik alapján három alcsoportba soroltuk: (1) negatív, (2) 85% alatti és (3) 85% feletti stenózissal pozitív csoportok (lásd 1. táblázat). Az említett három csoportban az AF értékek nem mutattak szignifikáns eltérést egyik vizsgált SNP esetében sem.

Végül, az ismert kockázati tényezők száma szerint a stroke csoportot két alcsoportra osztottuk. Az alacsony kockázatú csoportba azokat a stroke betegeket soroltuk, akiknél a figyelembe vett négy kockázati tényező (magas vérnyomás, diabetes,

dohányzás és fokozott alkohol bevitel) közül legfeljebb egy szerepelt (148/226 beteg). A magas kockázatú csoportba a 2-4 rizikófaktorral rendelkező személyeket soroltuk (78/226 beteg), míg 15 főt az adatok hiányosságából kifolyólag kizártunk az analízisből (lásd 1. táblázat). Az alacsony és magas kockázatú csoportok allélgyakoriságát összehasonlítva, nem mutatkozott szignifikáns eltérés egyik vizsgált SNP esetében sem.

4.2.5 A variánsok kapcsoltsági eredményei

A Hardy–Weinberg egyensúly vizsgálatát, a kapcsoltsági analízist (linkage disequilibrium) és a haplotípus gyakoriságok számítását az SNPStats online programmal végeztük, csak az egy génen belül elhelyezkedő variánsok közötti genetikai kapcsoltság és haplotípus gyakoriság elemzésével.

4.2.5.1 Hardy–Weinberg egyensúly vizsgálata

Az ABCA1 V771M és I883M variánsai, továbbá az ABCG8 összes vizsgált variánsa Hardy–Weinberg egyensúlyban (HWE) volt, minden vizsgált beteg és kontroll populációban. Ezzel szemben, az R219K szignifikáns eltérést mutatott a HWE-től a stroke érintettségű csoportban ($p=0,004$). Az egyensúlytól való eltérést csak a stroke csoportban mutattuk ki, az ISZB és kontroll csoportokban az R219K variáns esetében is fennállt a Hardy–Weinberg egyensúly. Az egyensúlytól való eltérést esetünkben nem lehet az SNP közelmúltbeli létrejöttével, vagy a nem véletlenszerű párválasztással magyarázni, így az egyensúlytól való eltérés feltehetően a csoportba választási kritériummal (stroke érintettséggel) hozható összefüggésbe (Bardoczy és *mtsai* 2004).

4.2.5.2 Kapcsoltsági analízis (linkage disequilibrium)

Az allélek kapcsoltsági analíziséhez összevontuk a beteg és a kontroll csoport adatait és a vizsgálatokat az összes egyént (580 személyt) tartalmazó csoporton végeztük el. Az ABCA1 lókuszt kapcsoltsági analíziséhez tartozó p értékeket a 7. táblázatban, az ABCG8 lókuszt értékeit a 8. táblázatban tüntettük fel. Az ABCA1 lókusztai közül az R219K mutatott kapcsoltságot a V771M lókusszal és az I883M lókusszal, míg ez utóbbi kettő egymással nem állt kapcsoltságban. Az ABCG8 esetében minden szomszédos lókuszt (D19H-Y54C, Y54C-T400K, T400K-A632V), továbbá a legszélső lókuszok (D19H-A632V) mutattak egymással kapcsoltságot.

7. táblázat: Az ABCA1 lókuszok (R219K, V771M, I883M) közötti kapcsoltsági analízis (linkage disequilibrium) eredménye

Lókusz párok	V771M	I883M
R219K	p<0,0001	p<0,0001
V771M		p=0,3072

A kapcsoltsági analízis (linkage disequilibrium) eredménye a 3 ABCA1 lókusz (R219K, V771M és I883M) esetében a lókusz párokhoz tartozó p értékekkel. Az R219K lókusz kapcsolt a V771M és I883M lókuszokkal, ugyanakkor az V771M és I883M lókuszok között nem áll fenn kapcsoltság. Az elemzést a kontroll és betegcsoportok összevonásával létrehozott 580 esetet tartalmazó kombinált csoporton végeztük.

8. táblázat: Az ABCG8 lókuszok (D19H, Y54C, T400K, A632V) közötti kapcsoltsági analízis (linkage disequilibrium) eredménye

Lókusz párok	Y54C	T400K	A632V
D19H	p<0,0001	p=0,0510	p=0,0122
Y54C		p<0,0001	p=0,6064
T400K			p<0,0001

A kapcsoltsági analízis (linkage disequilibrium) eredménye a 4 ABCG8 lókusz (D19H, Y54C, T400K és A632V) esetében a lókusz párokhoz tartozó p értékekkel. A szomszédos lókuszok, továbbá a D19H-A632V lókuszok között szignifikáns p értékeket kaptunk, tehát ezek a lókuszok egymással kapcsoltak. Az elemzést a kontroll és betegcsoportok összevonásával létrehozott 580 esetet tartalmazó kombinált csoporton végeztük.

Megvizsgáltuk, hogy a kapcsolt lókuszok mely alléljai fordulnak elő preferáltan egymás mellett. A 310 fő 219KK genotípusú személyből csupán 1 fő hordozta a 771M allélt, míg a 270 fő 219RK+KK genotípusú személyből 36 hordozta a 771M allélt (1/310 vö. 36/270 arány). Ezek alapján megállapítható, hogy a 771M allél preferáltan a 219K alléllal fordul elő egy kromoszómán.

Hasonló gondolatmenetet követve, a 263 fő 219RR genotípusú személyből 39 hordozta a 883M allélt, míg a 229 RK vagy KK genotípusú személyből 84 fő volt 881M hordozó (39/269 vö. 84/229 arány), a 883M allél elsősorban a 219K alléllal található egy kromoszómán.

Az ABCG8 variánsok esetében a 19H allél preferáltan az 54Y alléllal fordul elő (209 YY esetből 36 eset DH+HH; 371 YC+CC esetből 19 eset DH), végül a 400K szintén az 54Y-al azonos kromoszómán található (209 YY esetből 115 eset TK+KK; 371 YC+CC esetből 83 eset TK). Statisztikailag a T400K-A632V és D19H-A632V lókuszok között szintén kimutatható kapcsoltság, viszont az, hogy mely allélek fordulnak elő egy kromoszómán, a fenti megközelítéssel egyértelműen nem állapítható meg.

Az R219K és a V771M lókuszok között azonosított igen erős kapcsolat egy további problémát vetett fel. Annak kizárására, hogy az R219K statisztikailag azonosított védőfaktor szerepe nem a V771M kapcsolatnak köszönhető-e, újabb vizsgálatot végeztünk. Kizártuk a 771M hordozókat mind a stroke, mind a kontroll csoportból, és az így megmaradt (172 kontroll és 227 stroke esetet magába foglaló) 771M variánsra negatív csoporton végzett logisztikus regressziós analízis eredményeként az R219K nem bizonyult a nemtől és életkortól független védőfaktornak. A kérdést a másik irányban (a V771M védőfaktor szerepe nem az R219K kapcsolatnak köszönhető-e) a fenti megközelítéssel nem lehet elemezni, mert a 219K hordozó esetek kizárásával, a 37 fő 771M hordozóból 36-ot kizárnánk az analízisből.

4.2.5.3 Haplotípus gyakoriságok vizsgálata

Az SNPStats program segítségével megvizsgáltuk az ABCA1 és ABCG8 haplotípusok gyakoriságát külön a kontroll és betegcsoportokban, illetve a kontroll és betegcsoportok összevonásával készült összesített (n=580) csoportban. Az egyes haplotípusokon belül a vizsgált csoportok (kontroll, illetve beteg csoportok) nem mutattak szignifikáns eltérést egymáshoz képest a gyakoriságot illetően. Az összesített csoportban az ABCA1 esetében 7, az ABCG8 esetében 9 különböző haplotípust azonosítottunk, melyeket a gyakoriságuk szerint csökkenő sorrendben felsorolva a 9. (ABCA1) és 10. (ABCG8) táblázatban adtuk meg, illetve sorszámmal látunk el (№). A haplotípusokat a megfelelő egybetűs aminosav kóddal adtuk meg, a félkövér betűtípussal mindig a ritkább allélt jelölve. Az esetek 90%-át lefedi az ABCA1 variánsnál a három leggyakoribb, az ABCG8 variánsnál pedig az öt leggyakoribb haplotípus.

9. táblázat: ABCA1 haplotípus gyakoriságok a betegek és kontroll összevonásával létrehozott összesített csoportban

N _o	R219K	V771M	I883M	Gyakoriság	Összesített gyakoriság
1	R	V	I	0,6518	0,6518
2	K	V	I	0,1810	0,8329
3	K	V	M	0,0744	0,9073
4	R	V	M	0,0599	0,9672
5	K	M	I	0,0290	0,9962
6	K	M	M	0,0027	0,9989
7	R	M	I	0,0011	1,0000

Az SNPStats program által becsült ABCA1 haplotípus gyakoriságok a kontroll és a betegcsoportok összevonásával készült összesített (n=580) csoportban. Összesen 7 különböző haplotípust azonosítottunk, melyeket a gyakoriságuk alapján csökkenő sorrendben felsorolva adtunk meg, illetve sorszámmal látunk el (N_o). A haplotípusokat a megfelelő egybetűs aminosav kóddal adtuk meg, a félkövér betűtípussal mindig a ritkább allélt jelölve. Az összesített gyakoriság oszlopban az összes, a listában a rangsorban feljebb szereplő haplotípus gyakoriságainak összege látható.

10. táblázat: ABCG8 haplotípus gyakoriságok a betegek és kontroll összevonásával létrehozott összesített csoportban

N _o	D19H	Y54C	T400K	A632V	Gyakoriság	Összesített gyakoriság
1	D	C	T	A	0,3182	0,3182
2	D	Y	T	A	0,2672	0,5854
3	D	Y	K	A	0,1646	0,7500
4	D	Y	T	V	0,0996	0,8496
5	D	C	T	V	0,0896	0,9391
6	H	Y	T	A	0,0358	0,9750
7	D	Y	K	V	0,0117	0,9867
8	H	Y	K	A	0,0099	0,9966
9	H	Y	T	V	0,0034	1,0000

Az SNPStats program által becsült ABCG8 haplotípus gyakoriságok a kontroll és a betegcsoportok összevonásával készült összesített (n=580) csoportban. Összesen 9 különböző haplotípust azonosítottunk, melyeket a gyakoriságuk alapján csökkenő sorrendben felsorolva adtunk meg, illetve sorszámmal látunk el (N_o). A haplotípusokat a megfelelő egybetűs aminosav kóddal adtuk meg, a félkövér betűtípussal mindig a ritkább allélt jelölve. Az összesített gyakoriság oszlopban az összes, a listában a rangsorban feljebb szereplő haplotípus gyakoriságainak összege látható.

4.2.6 Szérum koleszterin szint vizsgálatok

A genotípus és fenotípus (szérum lipid szint) közötti összefüggések vizsgálatát mind a 7 SNP esetén a három csoporton (stroke, ISZB és kontroll) külön-külön végeztük el, azokat a személyeket bevonva, akiknél a lipid paraméterek rendelkezésre álltak (stroke: 111 fő, ISZB: 93 fő, kontroll: 191 fő). Kolmogorov-Smirnov tesztel

megállapítottuk, hogy a lipid értékek eloszlása eltér a normál eloszlástól, ezért a statisztikai összehasonlításokhoz nem-parametrikus tesztek alkalmaztunk. Kruskal-Wallis teszttel a három, genotípus szerinti alcsoport lipid értékeit, Mann-Whitney teszttel a gyakori allélt homozigóta formában hordozókat a ritka allélt hordozókkal hasonlítottuk össze.

A kontroll csoportban az Y54C genotípusai között szignifikáns eltérést tapasztaltunk (Kruskal-Wallis teszt: $p=0,018$). A legalacsonyabb koleszterin szint az YY genotípusra volt jellemző, a legmagasabb pedig a CC genotípusra (lásd 11. táblázat). Az YY genotípust az 54C hordozókhoz (YC+CC) viszonyítva szintén szignifikáns eltérést észleltünk (Mann-Whitney próba: $p=0,009$), ugyanakkor az 54Y hordozókat (YY+YC) viszonyítva a CC genotípushoz ez nem volt jellemző, ami feltehetően arra utal, hogy az 54Y allélnek homozigóta formában kell jelen lennie ahhoz, hogy kifejezettebb mértékű koleszterin szint csökkenés alakulhasson ki.

A többi SNP vonatkozásában és az Y54C variáns és az egyéb vizsgált lipid paraméter tekintetében nem találtunk szignifikáns eltérést a különböző genotípusok között egyik betegcsoportban és a kontrollban sem.

11. táblázat: A kontroll csoport koleszterin szint értékei (a teljes csoportban, illetve az Y54C genotípus szerint képzett alcsoportokban)

Y54C genotípus	Esetszám (n)	Koleszterin szint (mM)		
		25 th percentilis	Medián	75 th percentilis
YY	71	4,19	4,51	5,43
YC	84	4,32	4,95	5,82
CC	36	4,53	4,98	6,31
YC+CC	120	4,42	4,95	5,88
YY+YC+CC	191	4,28	4,82	5,78

A táblázatban az Y54C genotípusok alapján képzett kontroll alcsoportok és a teljes kontroll csoport koleszterin szint értékeit tüntettük fel. Megadtuk a genotípusokhoz tartozó esetszámot, a mediánt, a 25 és a 75 percentilis értékeket. A legalacsonyabb értékeket az YY genotípussal rendelkező, a legmagasabb értéket pedig a CC csoportban kaptuk, míg a heterozigóta csoport köztes értéket mutatott. Kruskal-Wallis teszttel szignifikánsnak bizonyult az eltérés a három genotípus között ($p=0,018$). Mann-Whitney próbával szintén szignifikáns eltérést mutattunk ki az YY és az YC+CC kombinált csoportok között ($p=0,009$).

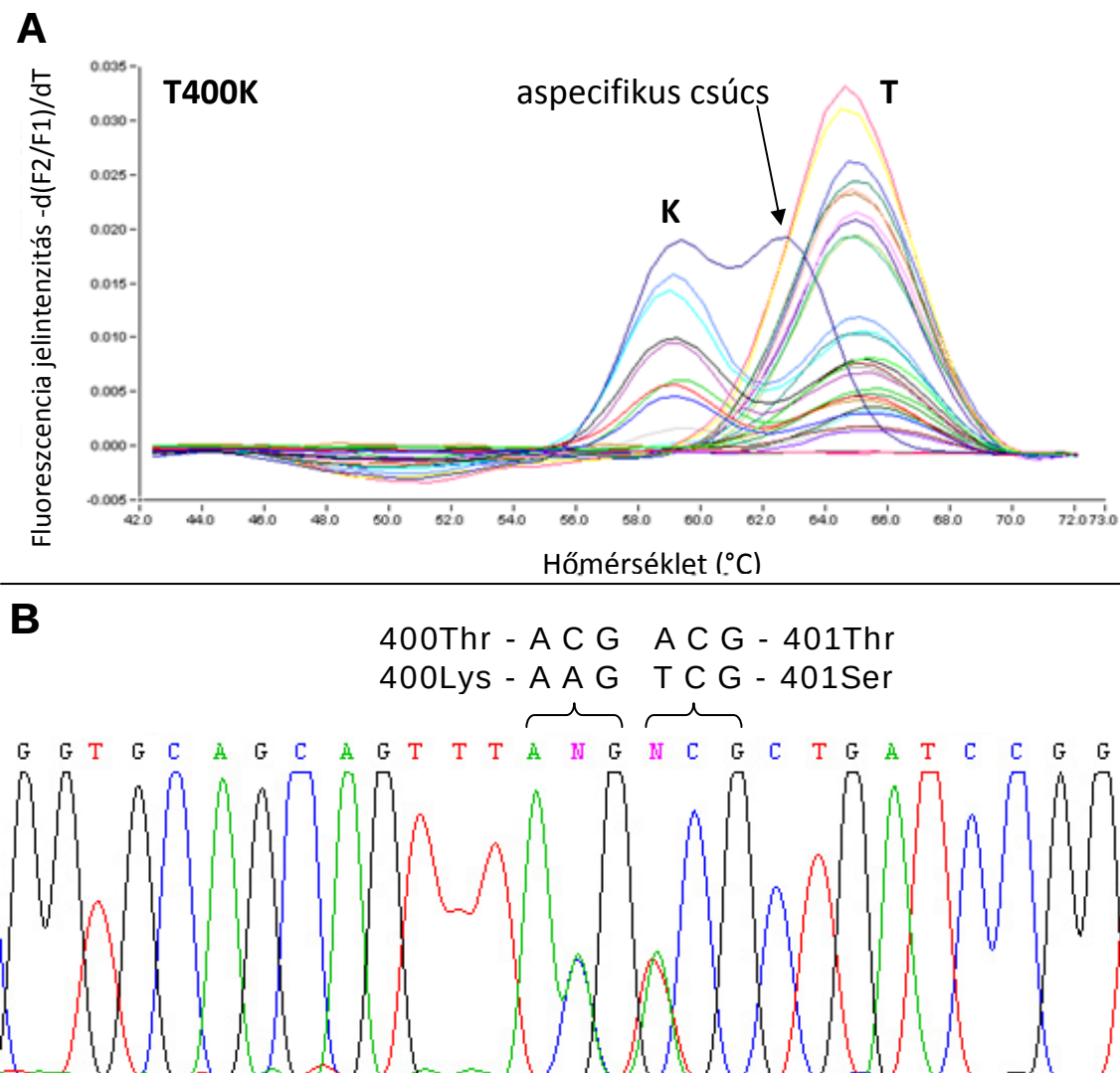
4.2.7 Új ABCG8 variáns azonosítása

A T400K variáns vizsgálata során egy kontroll minta tipizálása közben mindhárom genotípustól lényegesen eltérő, reprodukálható olvadáspont görbét

regisztráltunk. A minta genotípusának tisztázására közvetlen szekvencia-analízissel meghatároztuk a PCR-termék nukleotid-sorrendjét. Az olvadási görbét és a szekvencia meghatározás elektroferogram képét a 17. ábra mutatja.

A minta a T400K pozíciójában (c.1199C>A) a variánsnak megfelelő mindkét lehetséges nukleotidot tartalmazza, emellett a variánstól 2 bázispár távolságra található pozícióban (c.1201) szintén azonosítható egy heterozigóta bázis (c.1201A>T), amely egy T401S, treonin-szerin aminosav cserével járó (missense) transzverziós báziscserének felel meg. Önmagában a szekvencia-analízis nem alkalmas annak eldöntésére, hogy az egymás melletti aminosavak cseréjéért felelős genetikai variánsok azonos kromoszómán helyezkednek-e el, ún. cisz helyzetben, vagy külön kromoszómán kódoltak (transz helyzetben). Az olvadáspont görbe segítségével viszont ez a kérdés is tisztázható. Két eset lehetséges: az első esetben, amennyiben a két polimorfizmus egy kromoszómán található, akkor egy, a szondához képest 2 mismatch-et tartalmazó PCR termék és egy, a szondával tökéletesen komplementer termék keletkezik. Az olvadáspont-analízis során a két eltérést tartalmazó DNS-szárlól (a gyengébb kötődés következtében) az egy eltérést tartalmazó DNS-szálnál (a 400K-nál) hamarabb (alacsonyabb hőmérsékleten) válna le a szonda, vagyis az egyik csúcsot 58°C alatti hőmérsékleten, a másikat az eltérés nélküli, gyakori típusnak (400T) megfelelő hőmérsékleten, kb. 65°C-nál észlelnénk. A második esetben, a polimorfizmusok transz elhelyezkedése esetén, mindkét keletkező PCR-termék tartalmaz egy-egy mismatch-et a szondához képest, ekkor az egyik csúcsot a 400K-nak megfelelő hőmérsékletnél, a másikat pedig 65°C alatti hőmérsékletnél várjuk. Az olvadási görbén a második esetnek megfelelő képet látjuk, így a mintánk transz helyzetben (külön kromoszómákon) tartalmazza a két polimorfizmust.

A fenti, kettős heterozigóta típust hordozó kontroll személy lipid paraméterei a normál tartományba estek (koleszterin: 4,23 mM, HDL: 1,1 mM). Érdekes, hogy összesen 581 minta (1162 kromoszóma) típusát határoztuk meg a T400K polimorfizmusra, és ebből csupán egyetlen kromoszóma tartalmazta az újonnan azonosított variánst. Ezt a kontroll személyt nem vettük figyelembe a statisztikai analízisek során.



17. ábra: Új ABCG8 variáns (T401S) azonosítása.

A T400K genotipizálás során mindhárom lehetséges genotípustól eltérő oladási görbét mutató minta oladási görbéje (A) és a variáns nukleotid környezetének szekvenálási elektroferogramja az érintett tripletek és megfelelő aminosavak jelölésével (B).

5 Megbeszélés

5.1 Aszimmetrikus PCR-t követő olvadáspont analízis

A LightCycler készüléket elsőnek 1997-ben mutatták be a BioTechniques folyóiratban, ahol egy kiadványon belül több közlemény is foglalkozott a készülékkel és az új metodikával (Wittwer és *mtsai* 1997; 2 közlemény). Még ugyanebben az évben megjelentek az első olyan klinikai témájú közlemények, melyekben a polimorfizmusok meghatározása LightCycler készüléken, hibridizációs szonda olvadáspont analízisével történt (Lay és *mtsai* 1997, Woo és *mtsai* 1997). Az említett közleményekben 3 oligonukleotidot alkalmaztak, ahol a forward amplifikációs primert Cy5 festékkel jelölték, amely a fluoreszcensen jelölt hibridizációs szondával együtt vett részt a FRET reakcióban. (A harmadik oligonukleotid egy nem-jelölt reverse primer volt.) Ebben a rendszerben magától értetődően többet alkalmaztak a szondaként is funkcionáló forward primerből, végső soron itt is aszimmetrikus PCR-t alkalmaztak. A LightCycler esetében a későbbiekben vezették be az ún. „dual-probe”, azaz „kétszondás” rendszert, amellyel az irodalomban 1998-tól találkozhatunk (Bernard és *mtsai* 1998). Megjelent néhány publikáció, melyekben a két rendszert egymás mellett alkalmazták (von Ahsen és *mtsai* 1999, von Ahsen és *mtsai* 2000, Moos és *mtsai* 2000), a variánsok egy részét még a 3 oligonukleotidos, más részét már a kétszondás rendszerrel vizsgálták, majd a 3 oligonukleotidos rendszer gyorsan feledésbe merült. Érdekes módon, a kétszondás rendszerre történő átállással egy időben, átváltottak a szimmetrikus PCR szinte kizárólagos alkalmazására. Az aszimmetrikus PCR használatát, a metodika alkalmazása során felmerült, különféle problémák lehetséges megoldásaként publikálták, ahogy saját esetünkben is egy problémás (extra olvadási csúcsot mutató) rendszer miatt próbálkoztunk többféle optimalizációs lehetőséggel, és jutottunk el az aszimmetrikus PCR-hez, mint lehetséges megoldáshoz.

Burgaff és *mtsai* (2002) a házilag kifejlesztett genotipizáló rendszerükkel helytelen tipizálási eredményeket kaptak a heterozigóta minták esetében. Ahogy fokozatosan emelték az alkalmazott primer arányt 1:5 arányig, úgy megjelent a heterozigóta minták esetében várt második csúcs, ezzel lehetővé téve a helyes tipizálást. Ellenben az általunk leírtakkal, az ő esetükben az aszimmetrikus PCR-t követően nem

tapasztaltak fluoreszcencia jelintenzitás növekedést a szimmetrikus rendszerhez viszonyítva. Igaz, esetükben az amplifikációs lépés 45 ciklust tartalmazott szemben az általunk alkalmazott 70 ciklussal. Saját tapasztalataink alapján az amplifikációs folyamat real-time követéséből feltételezhető, hogy nagyjából a 40. ciklusig az eltérő primer arány mellett is szimmetrikus PCR játszódik le. Az eleinte exponenciális görbe a 40. ciklusnál már telítési görbét mutat, majd a 40. ciklus után lineáris növekedésre vált át.

Barratt és *mtsai* (2002) a „hook-effektus”-t írták le saját genotipizáló rendszerükben. A jelenség lényege, hogy a PCR késői ciklusai során a fluoreszcencia intenzitás az előző ciklusok során mért érték alá esik, melynek okai többek között a magas kiindulási DNS vagy magas Mg^{2+} koncentráció lehet. Feltehetően a nagyobb mennyiségben keletkező PCR termék a hibridizációs szondák szempontjából fokozott mértékű kompetíciót jelent a hibridizáció során. A jelenség szintén negatív hatással van az olvadáspont analízis megbízhatóságára és értékelhetőségére. Kísérleteinkben az aszimmetrikus PCR használatát követően a „hook-effektus” és a jelenséggel összefüggésben álló értékelési problémák megszűntek.

Egy, az általunk publikált közlemény után megjelent publikációban az allél-diszkriminációs módszer érzékenységét a tízszeresére tudták növelni az aszimmetrikus PCR használatával, így a szimmetrikus PCR-rel detektálható 600 pg DNS templát helyett, 60 pg DNS-ből kiindulva is sikerrel amplifikálták és analizálták a mintákat (Kroupis és *mtsai* 2008).

Az aszimmetrikus PCR kedvező hatása feltehetően abban rejlik, hogy a szondapár a PCR terméknek egy bizonyos DNS szálához kötődik és versengés alakul ki a szondapár és a komplementer DNS szál között. Az aszimmetrikus PCR ezt a versengést csökkenti a cél DNS szál mennyiségének megnövelésével. A jelenséget igazolja Bernard és *mtsai* eredménye, amelyben szintetikus oligonukleotidok hozzáadásával modellezték a cél-DNS szálhoz történő hibridizáció során a hibridizációs szondák és a komplementer DNS szál között kialakuló kompetíciót. A szintetikus oligonukleotidok hozzáadásának eredményeként kb. 40%-al csökkent jelintenzitást mértek (Bernard és *mtsai* 1999).

Tudomásunk szerint, elsőként közöltük olyan kísérlet eredményét, amelyben azonos PCR körülményeket követően teszteltük két egymással komplementer

hibridizációs szondapár viselkedését. A komplementer hibridizációs szondapárral a várakozásunknak megfelelő eredményt kaptuk, az ellenkező primer arányának hasonló mértékű emelése vezetett az eredeti körülményekhez hasonló fluoreszcencia jelintenzitás növekedéshez. Aszimmetrikus PCR-t végeztünk különböző primer arányokkal négy különböző házilag beállított SNP detektáló rendszerükben (ABCG2 Q141K, FII g.20210G>A, FV Leiden és HFE H63D). Minden vizsgált rendszerben hasonló tendenciát észleltünk, ezzel alátámasztva, hogy a hibridizációs szondapárral komplementer DNS termék mennyiségi előnyéhez vezető arányban kivitelezett aszimmetrikus PCR, az olvadáspont analízis fluoreszcencia intenzitásra kifejtett pozitív hatása nem csupán egy génszakaszra korlátozódik, hanem – feltételezésünk szerint – általános érvényű.

5.2 ABC transzporterek polimorfizmusainak vizsgálata

5.2.1 Allél gyakoriságok

A kontroll csoportban mért AF értékek (R219K: $31,2 \pm 4,7\%$; V771M: $5,0 \pm 2,2\%$; I883M: $12,1 \pm 4,6\%$; D19H: $4,7 \pm 2,2\%$; Y54C: $40,8 \pm 5,0\%$; T400K: $18,8 \pm 4,0\%$; A632V: $21,2 \pm 4,2\%$) az irodalmi adatok alapján várható tartományba estek, lásd 12. táblázat, ahol a magyarországi adatokat hasonlítottuk össze más kutatócsoportok kontroll AF adataival. A táblázatban feltüntettük a közlemény első szerzőjének vezetéknevét, a megjelenés évszámát, illetve a vizsgált populáció etnikai besorolását. Az összehasonlításból jól látszik, hogy a vizsgált polimorfizmusok gyakoriságában jelentős etnikai különbségek vannak.

12. táblázat: Magyarországi ABCA1 és ABCG8 variánsok allélgyakoriság értékeinek (%) összehasonlítása külföldi adatokkal

ABCA1	Populáció	n	R219K	V771M	I883M	
Andrikovics (2006)	hazai	191	31,2	5,0	12,1	
Brousseau (2001)	kaukázusi	1013	26,6	2,6	12,2	
Frikke-Schmidt (2004)	kaukázusi	9123	26	3	12	
Tregouet (2004)	kaukázusi	1613	28,1	3,1	13,2	
Li (2009)	ázsiai	246	39,0	-	-	
Srinivasan (2003)	kaukázusi	887	26,2	-	-	
Srinivasan (2003)	afrikai	390	59,5	-	-	
Doosti (2010)	iráni	94	61,7	-	-	
Guevara-Cruz (2010)	mexikói	43	31,4	-	-	
ABCG8	Populáció	n	D19H	Y54C	T400K	A632V
Szilvási (2010)	hazai	191	4,7	40,8	18,8	21,2
Plat (2005)	kaukázusi	112	-	-	17,4	21
Berge (2002)	kaukázusi	148	5,2	38,2	18,4	17,0
Hubacek (2004)	kaukázusi	285	6,7	43,2	18,9	25,3
Caamano (2008)	chile-i	102	-	27,0	-	-
Hubacek (2001)	kaukázusi	50	6	39	20	17
Chen (2008)	ázsiai	1046	1,4	90,3	8,0	-

A táblázat kontroll populációk allélgyakoriság (AF) értékeit tartalmazza az általunk vizsgált ABCA1 (R219K, V771M, I883M) és ABCG8 (D19H, Y54C, T400K, A632V) variánsok esetében, százalékban kifejezve. Feltüntettük a közlemény első szerzőjének vezetéknévét, a megjelenés évszámát, az esetszámot (n) és a populáció etnikai besorolását. Saját eredményeinket (Andrikovics 2006, Szilvási 2010) dőlt betűtípussal emeltük ki.

5.2.2 Az ABCA1 és ABCG8 genotípusainak kapcsolata a stroke-kal és

ISZB-vel

Számos közlemény jelent meg az ABCA1 és ABCG8 polimorfizmusainak és a lipid anyagcsere kapcsolatának, valamint az azzal összefüggésbe hozható betegségek vizsgálatáról. Ezek a tanulmányok jelentős eltérést mutattak a vizsgált populációk etnikai, nembeli összetételében, egészségügyi (beteg, illetve egészséges) státuszában. Az ABCG5/G8 polimorfizmusokkal kapcsolatban Rudkowska és *mtsának* (2008) jelent meg egy összefoglaló közleménye. Az egyedi SNP-ket vizsgáló publikációkon túl, két teljes-genom összehasonlító vizsgálat igazolta az ABCA1, ABCG5 és ABCG8 SNP-k kapcsolatát a lipid paraméterekkel (Aulchenko és *mtsai* 2009, Kathiresan és *mtsai* 2009).

Célul tűztük ki, hogy két külön kísérletsorozatban megvizsgáljuk először a három leggyakrabban kutatott ABCA1 variáns (R219K, V771M, I883M) majd a négy leggyakoribb ABCG8 variáns (D19H, Y54C, T400K, A632V) szerepét a stroke és ischaemiás szívbetegséggel diagnosztizáltak csoportjaiban (a polimorfizmus-betegség, illetve a polimorfizmus-lipid értékek kapcsolatát).

Az összesen 7 vizsgált variáns közül 3 mutatott összefüggést a stroke betegséggel (ABCA1 R219K és V771M, ABCG8 Y54C), az ischaemiás szívbetegséggel (ABCA1 V771M), vagy a szérum lipid értékekkel (ABCG8 Y54C).

5.2.2.1 Az ABCA1 V771M variáns összefüggése a vizsgált betegségekkel és a lipid értékekkel

Vizsgálatunkban a legmarkánsabb összefüggést a V771M variáns és az ISZB között mutattuk ki. A 771M allél védőfaktornak bizonyult a teljes ISZB csoportban az allélgyakoriságok összehasonlítása és a domináns genetikai modell szerint elvégzett analízis során is. Emellett homozigóta formában 50 éves kor alatt a stroke-kal szemben is védőfaktornak bizonyult.

Frikke-Schmidt és *mtsai* (2004) több mint 9000 személyt vontak be tanulmányukba. Közülük a 95 legmagasabb HDL szinttel rendelkező személy (HDL szint felső 1%-a) V771M allélgyakoriságának meghatározása során emelkedett AF értéket mértek ($p=0,04$). A teljes esetszámon ($n>9000$) a V771M hordozók alcsoportjában emelkedett HDL értéket mutattak ki. Utóbbi összefüggést csak a nők csoportjában észlelték ($p=0,02$), a férfiaknál nem. Figyelembe véve, hogy az emelkedett HDL szint feltehetően védőfaktor az ISZB kialakulásával szemben (Emerging Risk Factors Collaboration és *mtsai* 2009), eredményeink összhangban vannak Frikke-Schmidt és *mtsai* eredményeivel. Emelkedett HDL szintet egyik vizsgált csoportunk esetében sem tudtuk kimutatni, de ugyanazt a variáns azonosítottuk potenciális védőfaktorként, mint ami Frikke-Schmidt és *mtsai* közleményében emelkedett HDL szinttel társult.

A V771M variáns 771M allélja és az R219K variáns 219K allélja között kapcsoltságot azonosítottunk, ezzel részletesebben az R219K variáns összefüggéseinek tárgyalásánál foglalkozunk.

5.2.2.2 Az ABCA1 R219K variáns összefüggése a vizsgált betegségekkel és a lipid értékekkel

Az R219K az ABCG8 variánsok közül a leggyakoribb és a legkutatottabb is egyben. Vasculáris betegségekben betöltött szerepe, publikációnk megjelenésének időpontjában (2006) vitatott volt, ezzel kapcsolatban ellentmondásos tanulmányok láttak napvilágot. A polimorfizmust elsőként Clee és *mtsai* (2001) azonosították, további 9, aminosav cserével járó polimorfizmussal (köztük a V771M és I883M variánsokkal) együtt. Tanulmányukban az R219K hordozók esetében az ISZB kevésbé súlyos formában jelentkezett, csökkent mértékű fokális és diffúz atherosclerosisissal és kevesebb koronária eseménnyel. A hordozók alacsonyabb TG szinttel és magasabb HDL szinttel rendelkeztek, bár ez utóbbiakat, a lipid értékekkel kapcsolatos összefüggéseket, csak az 57 év alatti alcsoportban mutatták ki, az idősebbekben nem. Összességében arra a következtetésre jutottak, hogy az R219K feltehetően egy független védőfaktor az ISZB kialakulásával szemben.

Egy másik, nagy esetszámot feldolgozó tanulmányban (n=2028), Brousseau és *mtsai* (2001), az ISZB csoportot a kontrollhoz viszonyítva magasabb R219K allélgyakoriságról és csökkent HDL szintről számoltak be, amiből azt a következtetést vonták le, hogy a R219K allél a HDL szint csökkenéséhez és ezáltal az atherosclerosis kialakulásához, végső soron ISZB-hez vezethet. A saját beteganyagunkon tapasztaltak a Clee és *mtsai* által leírt eredményekhez hasonlóak. Esetünkben az R219K variáns multivariancia analízissel a nemtől és életkortól független védőfaktornak bizonyult a stroke-kal szemben, még annak ellenére is, hogy a teljes stroke betegcsoporton ezt az összefüggést az AF értékek vagy genotípus megoszlások nem támasztották alá. A genotípus megoszlás szignifikáns eltérést csak az 50 év alatt diagnosztizált betegenél (illetve a nők kizárása után a 60 év alatt diagnosztizált férfiaknál) mutatott. Clee és *mtsai* megvizsgálták az erek minimális obstrukciós átmérőjét és az átlagos szegmens átmérőt, amely mérőszámok csökkenése az atherosclerotikus folyamat előrehaladtának indikátorai. Az idősebb és fiatalabb esetek adatait összehasonlították a R219K hordozók és nem-hordozók között. Eredményeik azt mutatták, hogy a fenti mérőszámok az életkor előrehaladtával csak a nem-hordozók esetében csökkentek szignifikáns mértékben, míg a R219K hordozók esetében a csökkenés nem volt szignifikáns. Arra következtettek, hogy a variánst hordozók esetében a vasculáris betegség lassabban

progrediált. Saját vizsgálatunk során több variáns esetében is (R219K, V771M, Y54C) tapasztaltunk hasonló jelenséget, azaz a genotípus-fenotípus (betegség) összefüggés kifejezetté válását az alacsonyabb életkorú csoportokban. Feltételezhető, hogy az említett variánsok fiatal korban betöltött védő szerepe mögött is hasonló mechanizmus, vagyis az atherosclerotikus folyamat lassabb előrehaladása játszhat szerepet. Eredményeinkkel összhangban Bertolini és *mtsai* (2004), Benton és *mtsai* (2007), illetve Woll és *mtsai* (2005) szintén alacsonyabb R219K hordozó gyakoriságot mértek az ISZB csoportban, mint a kontrollban. Emellett több publikáció jelent meg a hordozó gyakoriság és ISZB közötti semleges kapcsolattal (Morgan és *mtsai* 2007, Pasdar és *mtsai* 2007, Frikke-Schmidt és *mtsai* 2008), míg a hordozó státusz rizikófaktor szerepét feltételező „tábor”, úgy tűnik egyszemélyes maradt (Brousseau és *mtsai* 2001).

2010-re elegendő közlemény jelent meg ahhoz, hogy a kis esetszámokat feldolgozó publikációk adatait összevonva értékeljék. 2011-ben három egymástól független kínai kutatócsoport is elvégezte 18-27 angol vagy kínai nyelven megjelent közlemény meta-analízisét az ABCA1 R219K variánsának és az ISZB összefüggéseinek tisztázására (Ma és *mtsai* 2011, Jiang és *mtsai* 2011, Li és *mtsai* 2011). A legnagyobb esetszámú vizsgálat 12960 ISZB és 26834 kontroll személy eredményein alapult (Jiang és *mtsai* 2011). Mindhárom kutatócsoport eredményei egybehangzóan azt tükrözték, hogy a 219K variánst hordozók védettebbek az ISZB kialakulásával szemben. Az ázsiai és kaukázusi populációk adatait külön értékelve a fenti szignifikáns összefüggés csak az ázsiai populációban maradt meg, a kaukázusi csoportban nem. Érdekes, hogy a vizsgálatba bevont esetek 28%-a az ázsiai, 69%-a a kaukázusi populációhoz tartozott (Jiang és *mtsai* 2011), az alcsoport vizsgálat során mégis a kisebb létszámú csoportban marad meg az összefüggés. A két populáció között jelentős mértékben eltérő a ritka allél gyakorisága: 43,4% az ázsiai és 27,5% a kaukázusi populációban (Li és *mtsai* 2011). A 12. táblázatban szereplő AF adatok alapján látható, hogy a hazai kontroll populáció AF értéke (32,1%) valamivel magasabb a kaukázusi átlagnál, talán ez is hozzájárult ahhoz, hogy esetünkben szignifikáns eltérést sikerült kimutatnunk az ISZB és kontroll csoport között a 219K allélt hordozók gyakoriságát illetően.

Clee és *mtsai* (2001) – saját eredményeinkkel összhangban – igen erős kapcsoltságról számoltak be az R219K és V771M variánsok között. Közleményükben 37 fő 771M hordozóból 35 hordozta a 219K allélt is. Az eredmény igen közel áll az

általunk tapasztalt arányhoz (37 fő 771M hordozóból 36 fő volt 219K hordozó is egyben). Esetükben a 771M hordozók kizárása az analízisből nem változtatott az R219K és a ISZB súlyossága között kimutatott összefüggésen, igazolva azt, hogy az R219K allél esetében tapasztalt összefüggések nem a V771M variánssal kimutatott kapcsoltságnak köszönhetőek. Saját beteganyagunkon a V771M hordozók kizárását követően elvégzett multivariancia analízissel már nem lehetett az eredeti csoporton igazolt összefüggést kimutatni, miszerint a R219K a nemtől és életkortól független védőfaktor a stroke-kal szemben. Amennyiben a multivariancia analízis a V771M hordozó-mentes csoporton is szignifikáns eltérést mutatott volna, az igazolta volna az R219K lókusz függetlenségét a V771M lókusztól. A nem szignifikáns eredmény viszont nem bizonyítja az ellenkezőjét (hiszen az R219K hordozók nagy részét ezzel kizártuk), így továbbra sem tekintjük eldöntöttnek, hogy az R219K variáns vizsgálatánál tapasztalt összefüggések valóban az R219K variáns funkcionális eltéréseinek vagy a V771M variánssal kimutatott kapcsoltságán keresztül ez utóbbi funkcióváltozásának tulajdonítható-e. A kérdést egyértelműen a variánsok funkcionális vizsgálata, aktivitásuk összehasonlítása dönthetné el.

5.2.2.3 Az ABCA1 I883M variáns összefüggése a vizsgált betegségekkel és a lipid értékekkel

Nem találtunk összefüggést az ABCA1 I883M variánsa és a stroke, illetve az ISZB kialakulása között. Az irodalomban az I883M szerepével kapcsolatban sincs egységes vélemény. Clee és *mtsai* (2001) az I883M hordozók körében súlyosabb ISZB manifesztációról számoltak be, Wang és *mtsai* (2000) szignifikáns mértékben emelkedett HDL szintet mértek az I883M homozigóták esetében a többi genotípushoz viszonyítva. Feltehetően az alacsony hordozó gyakoriságnak, alacsony esetszámnak, vagy a kevésbé kifejezett összefüggésnek tulajdoníthatóan, a magyarországi populációban az I883M genotípusok közötti eltérések, amennyiben voltak, rejtve maradhattak.

5.2.2.4 Az ABCG8 Y54C variáns összefüggése a vizsgált betegségekkel és a lipid értékekkel

Az allélgyakoriság és genotípus eloszlás összehasonlításánál nem mutattunk ki összefüggést az Y54C variáns és egyik vizsgált betegcsoport között sem. Ugyanakkor az alacsonyabb életkorban stroke-kal diagnosztizált esetek felé haladva, az 54YY genotípus gyakorisága csökkenő tendenciát mutatott a férfiak esetében. Az 50 év alatt stroke-kal diagnosztizált férfi betegek alcsoportjában szignifikáns mértékben csökkent 54YY gyakoriságot mértünk a kontrollhoz viszonyítva, ami az allél védő szerepére utal. Az allélgyakoriságok összehasonlításával recesszív genetikai modellt alkalmazva (54CC vö. 54YY és 54YC) ezt az összefüggést nem tudtuk kimutatni, ami arra utal, hogy az 54Y allélnek homozigóta formában kell jelen lennie a védő funkció kifejezésre jutásához.

A kontroll csoportban (férfiakat és nőket együtt vizsgálva) a szérum koleszterin szint az Y54C genotípus függvényében szignifikáns eltérést mutatott. A koleszterin szint az 54YY, 54YC, 54CC genotípusok sorrendjében nőtt ($p=0,018$). Az összefüggést a betegcsoportok egyikében sem észleltük, amire magyarázat lehet, hogy a betegek terápiás kezeléséről nem rendelkezünk információval, így nem tudjuk, hogy részesültek-e a lipid paramétereket befolyásoló gyógyszeres kezelésben. Az 54YY esetében tapasztalt alacsonyabb koleszterin szint összhangban van a fiatal férfiakban tapasztalt vélhető védő szerepével.

Az első tanulmány, amely az Y54C szerepét kimutatta a lipid anyagcserében azt vizsgálta, hogy a megváltozott táplálkozási szokásoknak köszönhetően 8 év elteltével hogyan változott a szérum lipid szint a különböző genotípusokkal rendelkező csoportok esetében (Hubacek és *mtsai* 2001). Az 54YY genotípussal rendelkező nők esetében a koleszterin és LDL szintek jelentős mértékű, míg a heterozigóták esetében köztes mértékű csökkenését tapasztalták. A tanulmány szerzői az 54YY hordozókat tekintették „jól reagáló” csoportnak. Egy másik közlemény a súlycsökkenést követő koleszterin szint változások és az Y54C genotípus között mutattak ki összefüggést nők esetében (férfiakat nem vizsgáltak, Santosa és *mtsai* 2007). Egy újabb közlemény szerzői az 54YY esetekhez viszonyítva csökkent HDL szintről számolt be az 54YC és 54CC esetekben (Junyent és *mtsai* 2009). Saját tanulmányainkban nem tudtuk az 54YY és HDL szint közötti direkt összefüggést kimutatni, de a genotípus esetleges védő

funkcióját a betegséggel szemben – amelynek hátterében az emelkedett HDL szint állhat – igen. Eredményeink összhangban vannak Abellán és *mtsai* (2010) eredményeivel is, tanulmányukban az egészséges 54CC hordozók körében a koleszterin és HDL szintek emelkedtek a többi genotípushoz viszonyítva.

Érdekes módon a variáns feltételezhető védő szerepét csak férfiakban tudtuk kimutatni, nőkben nem. Ennek magyarázata lehet, hogy a nők esetszáma kb. 40%-a a férfiak esetszámának, de előfordulhat, hogy a védő szerep nem-specifikus, amire szintén van példa az ABCG8 irodalmában. Hubacek és *mtsai* (2001) fentebb már említett tanulmányában az Y54C összefüggését a lipid szinttel csak a nőkben, míg hasonló lipid szint csökkenést a T400K variáns esetében csak a férfiakban tudtak kimutatni. Egy 2011-ben megjelent tanulmányban 1249 olyan gént azonosítottak, melyek májban mért expressziós szintje eltérést mutatott a két nem között (Zhang és *mtsai* 2011). A nem-függő expressziót mutató gének által befolyásolt molekuláris és celluláris funkciók között a rangsorban a lipid metabolizmus állt az első helyen. Emellett az eltérő expressziós aktivitást mutató gének által befolyásolt betegségek közül a legmagasabb szignifikancia értékkel a cardiovasculáris betegség rendelkezett.

5.2.2.5 Az ABCG8 D19H, T400K, A632V variánsok összefüggései a vizsgált betegségekkel és a lipid értékekkel

A D19H, T400K és A632V ABCG8 variánsok esetében se a két vizsgált betegséggel, se a szérum lipidszintekkel kapcsolatban nem találtunk összefüggést. Koeijvoets és *mtsai* (2009) a mienkhez hasonló SNP-betegség tanulmányt végeztek. Nagy számú beteganyagon dolgoztak, összesen 2012 örökletes hypercholesterinaemiában szenvedő esetet vizsgáltak, akik közül 648 főnél regisztráltak cardiovasculáris eseményt, ebből 553 esetben ISZB-t. Az általunk vizsgált négy ABCG8 SNP közül ők kettőt vizsgáltak, a D19H és a T400K variánsokat. A D19H variáns ISZB rizikófaktornak bizonyult, de csak az életkorra, nemre, dohányzásra, diabetesre, HDL-re és TG-re illesztett többváltozós Cox regressziós analízissel. Saját tanulmányunkban a D19H variánssal kapcsolatban nem tudtunk hasonló összefüggést kimutatni, ami akár az általunk vizsgált jóval alacsonyabb mintaszám következménye is lehet (148 vö. 553 eset). Az Y54C variánst a Koeijvoets és munkacsoportja nem vizsgálta.

Több tanulmányban sikerült összefüggést kimutatni az ABCG5/G8 variánsok és a szérumban lipid szintek között (Berge és *mtsai* 2002, Weggemans és *mtsai* 2002, Chen és *mtsai* 2008), amiket ugyanakkor mások nem tudtak megerősíteni. Az öt leggyakrabban vizsgált ABCG5/G8 polimorfizmus (ABCG5 Q604E és az általunk is vizsgált 4 ABCG8 variáns) összefüggését a lipid paraméterekkel egy 16 tanulmány 3364 esetét magába foglaló meta-analízisben is megvizsgálták (Jakulj és *mtsai* 2010). Nehezen magyarázható módon, egy olyan SNP-lipid összefüggést találtak, amelyet az egyedi cikkek egyikében sem azonosítottak (az ABCG8 632V allélje csökkent LDL szinttel mutatott kapcsolatot). A teljes-genom vizsgálatok ezzel szemben egyértelmű összefüggést mutattak ki a szérumban lipid szintek és az ABCG5/G8 kapcsolatáról. Aulchenko és *mtsai* (2009) az ABCG5 gén az LDL és a TG szintekkel, illetve az ABCA1 gén a HDL szinttel mutatott összefüggését, míg Kathiresan és *mtsai* (2009) az ABCG8 gén az LDL szinttel, illetve az ABCA1 a HDL szinttel mutatott összefüggéseit azonosították. Nem kizárható, hogy az általunk és/vagy más kutatócsoportok által azonosított összefüggések hátterében nem a vizsgált polimorfizmusok transzporter aktivitást módosító hatása áll, hanem valamely azokkal genetikai kapcsoltságban álló egyéb polimorfizmus, amely vagy a transzporter aktivitására vagy expressziójára van hatással.

A D19H az egyetlen variáns, amelynek klinikai relevanciáját egybehangzóan igazolni tudták. A 19H allél és az epekő kialakulása közötti pozitív korrelációt először Acalovschi és *mtsai* azonosították (Acalovschi és *mtsai* 2006, Grünhage és *mtsai* 2007), amit később teljes-genom vizsgálatokkal (Buch és *mtsai* 2007) illetve nagy esetszámon ($n > 62000$) elvégzett kísérlettel is igazoltak (Stender és *mtsai* 2011).

5.2.2.6 Alcsoportok összehasonlító vizsgálata

Elemzéseink során a két vizsgált betegség különböző súlyossági vagy megjelenési formái és a variánsok között nem sikerült összefüggést kimutatni. Feltételezzük, hogy a vizsgált variánsok számottevő mértékben nem befolyásolják a betegségek megjelenési formáit.

5.2.3 Kapcsoltsági eredmények

Mindkét vizsgált génen belül több allél között mutattunk ki kapcsoltságok, ezek mindegyike szerepel más közleményekben is. Az ABCG8 esetében egyezünk a Kajinami és *mtsai* (2001) által publikált eredményekkel, de voltak, akik az általunk azonosított kapcsoltságokon túl továbbiakat is azonosítottak (Gylling és *mtsai* 2004), és voltak, akik ennél kevesebbet (Berge és *mtsai* 2002). Az ABCA1 gén R219K és V771M variánsai közötti kapcsoltság a legnyilvánvalóbb, ezt velünk egyetemben minden kapcsoltságot vizsgáló kutatócsoport igazolni tudta (Clee és *mtsai* 2001, Kakko és *mtsai* 2003, Tregouet és *mtsai* 2004, Frikke-Schmidt 2004).

5.3 Új ABCG8 variáns (T401S) azonosítása

A hibridizációs szondák olvadásgörbe analízisén alapuló genotipizáló módszernél nem egyedi eset, hogy új, a szondával komplementer DNS szakaszon lokalizálódó variánst azonosítsanak. A II. faktor (prothrombin) génben a diagnosztikai jelentőségű g.20210G>A variáns vizsgálatakor több új variánst is azonosítottak (Warshawsky és *mtsai* 2002, Tag és *mtsai* 2005). A szintén nagy esetszámban vizsgált metiléntetrahidrofolát-reduktáz (MTHFR; Gilfix és *mtsai* 2009), FV Leiden (Mahadevan és *mtsai* 2005) és HFE (Bach és *mtsai* 2006) esetében is közöltek új variánsokat. Érdekesség, hogy a fentiekkel ellentétben, ahol diagnosztikai céllal több ezer mintát vizsgáltak, a mi esetünkben az ABCG8 T400K vizsgálatát „csak” 581 mintán végeztük el, mégis sikerült egy variánst (T401S) azonosítanunk. Ismereteink szerint, rajtunk kívül más kutatócsoport nem azonosította a variánst. Az újonnan felfedezett variáns jelentősége nem tisztázott, esetünkben egy normál lipid paraméterekkel rendelkező kontroll személy hordozta.

6 Következtetések

A LightCycler készüléken végzett hibridizációs szondák olvadási görbéjén alapuló metodika, az aszimmetrikus PCR-rel történő optimalizálása területén az alábbi következtetésekre jutottunk.

- Az aszimmetrikus PCR használatakor megszűnt a saját tervezésű FV Leiden genotipizáló rendszerünk esetében a normál genotípussal rendelkező minták egy részénél tapasztalható, az olvadási görbén regisztrált aspecifikus csúcs.
- *A szimmetrikus PCR-t követő olvadási görbén látható aspecifikus csúcs hőmérsékleti értékénél az aszimmetrikus PCR görbéjén egy „váll” látható, amely feltételezésünk szerint arra utal, hogy a szimmetrikus körülmény esetén alacsony volt a jel/zaj arány, amely az aszimmetrikus PCR hatására jelentősen emelkedett.*
- A reciprok primer arány a komplementer hibridizációs szondapár esetén az eredeti primer arány és az eredeti hibridizációs szondapárhoz hasonlóan hatékornak, míg a szondapár szempontjából kedvezőtlen arányban alkalmazott primer arányt melletti olvadási görbe értékelhetetlennek bizonyult.
- *Szimmetrikus primer arány mellett, ha az amplifikációs primerek hatékonysága eltér (az egyik primer számára kedvezőtlen anellációs hőmérséklet, reagensben bekövetkezett minőségromlás), akkor feltételezésünk szerint előfordulhat, hogy a kísérletünkben modellezett kedvezőtlen aránynak megfelelő amplifikációs körülmény jön létre, ami negatív hatással lehet az olvadási görbe értékelhetőségére. Ez a probléma bizonyos határokon belül aszimmetrikus PCR alkalmazásával kivédhető.*
- Az általunk vizsgált négy genotipizáló metodika mindegyikénél az 1:6,7 primer arányú aszimmetrikus PCR bizonyult optimálisnak.

Összegezve, arra a következtetésre jutottunk, hogy a LightCycler készüléken végzett hibridizációs szondák olvadáspont analízisén alapuló allél meghatározó metodikáknál, a kedvező primer arányú aszimmetrikus PCR a jelintenzitást és ezáltal a módszer érzékenységét és megbízhatóságát is jelentős mértékben növeli, ezért célszerű, hogy az optimális primer arány megállapítása minden genotipizáló rendszer esetében az optimalizálási folyamat integráns részét képezze.

Az ABC transzporterek variánsai (ABCA1: R219K, V771M, I883M; ABCG8: D19H, Y54C, T400K, A632V), illetve a cerebro- és cardiovasculáris betegségek kapcsolatának vizsgálata során az alábbi következtetésekre jutottunk.

- Magyarországon elsőként határoztuk meg három ABCA1 és négy ABCG8 polimorfizmus allélgyakoriságát. (ABCA1: R219K: 31,2%; V771M: 5,0%; I883:12,1%; ABCG8: D19H: 4,7%; Y54C: 40,8%; T400K: 18,8%; A632V:21,2%).
 - *A hazai ABCA1 R219K AF (31,2%) érték valamivel magasabb más szerzők kaukázusi populációkon mért adatainál (átlagosan 27,5%), de jóval alacsonyabb az ázsiai populációk értékeinél (átlagosan 43,4%). A többi polimorfizmus esetében AF adataink hasonlóak más kaukázusi tanulmányok adataihoz.*
- Az ABCA1 gén V771M polimorfizmusa a kontrollhoz képest alacsonyabb AF és hordozó gyakoriság értéket mutatott az ISZB csoportban.
 - *Ebből arra következtettünk, hogy a V771M ritka allélje feltehetően védő szerepet tölt be az ISZB kialakulásával szemben.*
- Az ABCA1 gén R219K és V771M variánsa kisebb hordozó gyakoriságot mutatott az 50 év alatt stroke-kal diagnosztizált betegek csoportjában, mint a kontrollban. Az ABCG8 Y54C gyakori allélje homozigóta formában kisebb gyakorisággal fordul elő az 50 év alatti férfi stroke betegek csoportjában, mint a kontrollban.
 - *A fentiekből arra következtettünk, hogy a stroke kialakulásával szemben védő szerepe lehet az R219K és V771M variánsok ritka alléljeinek, illetve az Y54C variáns gyakori alléljének az 50 év alatti korosztály esetében.*
- A stroke csoport esetében lehetőségünk volt a betegség különböző klinikai paraméterekkel rendelkező csoportjainak (TIA vagy egyéb stroke, koegzisztáló ISZB vagy ISZB-mentes stroke, carotis duplex scan vizsgálattal stenózis pozitív vagy negatív stroke), továbbá négy egyéb rizikófaktor megléte vagy hiánya alapján felállított „magas” és „alacsony” kockázatú csoportok összehasonlítására. A felsorolt csoportosítások között nem mutattunk ki összefüggést a polimorfizmusok gyakoriságát illetően.
 - *Arra a következtetésre jutottunk, hogy a vizsgált polimorfizmusok számottevően nincsenek hatással a stroke klinikai megjelenési formáira.*
- A vizsgált polimorfizmusok közül több genetikai kapcsoltságban állt egymással. A számított haplotípus eloszlások nem mutattak szignifikáns különbséget a kontroll és

betegcsoportok között. Az ABCA1 R219K és V771M ritka variánsai között kapcsoltág mutatható ki (37 fő 771M hordozóból 36 fő volt 219K hordozó is egyben).

- *Arra a következtetésre jutottunk, hogy az ABCA1, illetve ABCG8 gének esetében nem a haplotípusok, hanem az egyedi SNP-k mutathatnak összefüggést a stroke-kal vagy ISZB-vel.*
- A kontroll csoportban az ABCG8 Y54C különböző genotípusait hordozók eltérő koleszterin értékkel rendelkeztek, ahol a legalacsonyabb koleszterin szint az 54YY genotípusúakra volt jellemző. Hasonló összefüggést a betegcsoportokban nem tudtuk kimutatni.
- *Feltételezzük, hogy az Y54C variáns a koleszterin szint csökkenésén keresztül (mely önmagában klasszikus védőfaktor) fejt ki protektív hatását a stroke-kal szemben fiatal férfiak esetében.*

Összességében arra a következtetésre jutottunk, hogy mindkét általunk vizsgált gén polimorfizmusai direkt (funkcióváltozással) vagy indirekt módon (funkcióváltozást okozó polimorfizmussal kapcsoltágban) szerepet játszhatnak a lipid metabolizmusban, ezáltal a vasculáris betegségek, mint az atherosclerosis, a stroke vagy az ISZB manifestációjában. A polimorfizmusok kis mértékben járulnak hozzá a fenti folyamatokhoz, így hatásukat a környezeti tényezők, vagy a nemi különbségek jelentős mértékben befolyásolhatják.

7 Összefoglalás

A multifaktoriális betegségek genetikai hátterének felderítése segítséget nyújthat a betegség patomechanizmusának, a folyamatban részt vevő fehérjék funkciójának megértésében, hosszú távon hozzájárulhat az egyénre szabott orvoslás lehetőségének megteremtéséhez, esetleg új gyógyszeres kezelési célpontok azonosítását segítheti elő. Munkánk célja két, a lipid metabolizmusban fontos szerepet betöltő ABC transzporter polimorfizmusai (ABCA1: R219K, V771M, I883M; ABCG8: D19H, Y54C, T400K, A632V) és két multifaktoriális betegség, a stroke, illetve az ISZB lehetséges összefüggéseinek elemzése volt. Összesen 580 személy (241 stroke, 148 ISZB, 191 kontroll) genotípus meghatározását végeztük el, és elsőként állapítottuk meg a polimorfizmusok hazai allélfrekvenciáit (R219K: 31,2%; V771M: 5,0%; I883: 12,1%; D19H: 4,7%; Y54C: 40,8%; T400K: 18,8%; A632V: 21,2%). Az ABCA1 gén V771M variánsa esetében az ISZB csoportban kisebb AF értéket mértünk, mint a kontroll csoportban ($1,4 \pm 1,3\%$ vö. $5,0 \pm 2,2\%$; $p=0,010$), ami a ritka allél védő szerepére utal, és amit az esélyhányados értéke is tükröz (OR [95% CI]: 0,3 [0,1-0,8]). A többi variáns esetében hasonló összefüggést nem észleltünk, se a teljes betegcsoportokon, se a nemek szerinti alcsoportokat külön analizálva. A fiatalabb életkorban (50 év alatt) diagnosztizált stroke betegeknel ($n=106$) az R219K és a V771M variánsok ritka alléljeit hordozók gyakorisága alacsonyabb volt, mint a kontroll csoportban (R219K: $35,8 \pm 4,7\%$ vö. $50,3 \pm 3,6\%$; $p=0,022$; OR [95% CI]: 0,6 [0,3-0,9] V771M: $2,8 \pm 1,6\%$ vö. $9,9 \pm 2,2\%$; $p=0,035$; OR [95% CI]: 0,3 [0,1-0,9]), ami a ritka allélek hangsúlyosabb védő szerepére utalhat fiatalabb életkorban a stroke kialakulásával szemben. Az 50 év alatt stroke-kal diagnosztizált férfi betegcsoportban ($n=62$) csökkent ABCG8 54YY gyakoriságot tapasztaltunk a férfi kontrollhoz képest ($24,2 \pm 5,4\%$ vö. $41,3 \pm 5,1\%$; $p=0,038$; OR [95% CI]: 0,5 [0,2-0,9]). A kontroll csoportban az 54YY genotípust hordozóknál csökkent koleszterin szinteket mértünk a többi genotípushoz képest ($p=0,009$). A fentiek alapján az 54Y allél homozigóta formában, feltehetően a szérumban koleszterin szint csökkentése révén nyújthat védelmet a stroke kialakulásával szemben fiatal férfiaknál.

8 Summary

Studies of the genetic background of multifactorial disorders contributes to the understanding of disease pathomechanism and function of proteins involved in disease developing processes. In the future, these results can be applied in personalized treatment or they can point to new medical targets. The aims of our study were (1) to investigate associations between polymorphisms of two ABC transporters involved in lipid metabolism (ABCA1: R219K, V771M, I883M; ABCG8: D19H, Y54C, T400K, A632V) and two multifactorial disorders, namely stroke and coronary heart disease (CHD), and (2) to investigate the association of the above polymorphism and serum lipid profile. For this purpose, genotyping of 580 cases and controls (241 stroke, 148 CHD, 191 control) was performed. We first determined allele frequencies (AFs) of polymorphisms in the healthy Hungarian population (R219K: 31.2%; V771M: 5.0%; I883: 12.1%; D19H: 4.7%; Y54C: 40.8%; T400K: 18.8%; A632V: 21.2%). Regarding the patient groups, AF of ABCA1 V771M was lower in the CHD group compared to control ($1.4 \pm 1.3\%$ vs. $5.0 \pm 2.2\%$; $p=0.010$), indicating a protecting effect of the polymorphism, which was also confirmed by the odds ratio (OR [95% CI]: 0.3 [0.1-0.8]) value. In cases of other polymorphisms, no such associations were detected, neither in the whole patient groups, nor in subgroups based on stratification by gender. In stroke patients diagnosed in younger ages (under 50 years, $n=106$), frequencies of carriers of minor alleles of ABCA1 R219K or V771M were lower compared to control (R219K: $35.8 \pm 4.7\%$ vs. $50.3 \pm 3.6\%$; $p=0.022$; OR [95% CI]: 0.6 [0.3-0.9]; V771M: $2.8 \pm 1.6\%$ vs. $9.9 \pm 2.2\%$; $p=0.035$; OR [95% CI]: 0.3 [0.1-0.9]) suggesting that, carriers of minor alleles of R219K or V771M may be protected against stroke under the age of 50. In male subgroup of stroke patients diagnosed under the age of 50 ($n=62$), lower frequency of ABCG8 54YY genotype was found compared to the male subgroup of controls ($24.2 \pm 5.4\%$ vs. $41.3 \pm 5.1\%$; $p=0.038$; OR [95% CI]: 0.5 [0.2-0.9]). In the whole control group, individuals with the 54YY genotype had lower level of cholesterol compared to other genotypes ($p=0.009$). Based on the results above, the homozygous form of 54Y allele may have a protection effect against stroke in young males through its possible cholesterol lowering effect.

9 Irodalomjegyzék

1. Abellán R, Mansego ML, Martínez-Hervás S, Martín-Escudero JC, Carmena R, Real JT, Redon J, Castrodeza-Sanz JJ, Chaves FJ. (2010) Association of selected ABC gene family single nucleotide polymorphisms with postprandial lipoproteins: Results from the population-based Horteiga study. *Atherosclerosis*. 211:203-9.
2. Acalovschi M, Ciocan A, Mostean O, Tirziu S, Chiorean E, Keppeler H, Schirin-Sokhan R, Lammert F. (2006) Are plasma lipid levels related to ABCG5/ABCG8 polymorphisms? A preliminary study in siblings with gallstones. *Eur J Intern Med*. 17:490-4.
3. Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE 3rd. (1993) Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 24:35-41.
4. von Ahsen N, Oellerich M, Schütz E. (2000) Use of two reporter dyes without interference in a single-tube rapid-cycle PCR: alpha(1)-antitrypsin genotyping by multiplex real-time fluorescence PCR with the LightCycler. *Clin Chem*. 46:156-61.
5. von Ahsen N, Schütz E, Armstrong VW, Oellerich M. (1999) Rapid detection of prothrombotic mutations of prothrombin (G20210A), factor V (G1691A), and methylenetetrahydrofolate reductase (C677T) by real-time fluorescence PCR with the LightCycler. *Clin Chem*. 45:694-6.
6. Arnett DK, Baird AE, Barkley RA, Basson CT, Boerwinkle E, Ganesh SK, Herrington DM, Hong Y, Jaquish C, McDermott DA, O'Donnell CJ; American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention; American Heart Association Stroke Council; Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Group. (2007) Relevance of genetics and genomics for prevention and treatment of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention, the Stroke Council, and the Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Group. *Circulation*. 115:2878-901.

7. Aulchenko YS, Ripatti S, Lindqvist I, Boomsma D, Heid IM, Pramstaller PP, Penninx BW, Janssens AC, Wilson JF, Spector T, Martin NG, Pedersen NL, Kyvik KO, Kaprio J, Hofman A, Freimer NB, Jarvelin MR, Gyllenstein U, Campbell H, Rudan I, Johansson A, Marroni F, Hayward C, Vitart V, Jonasson I, Pattaro C, Wright A, Hastie N, Pichler I, Hicks AA, Falchi M, Willemsen G, Hottenga JJ, de Geus EJ, Montgomery GW, Whitfield J, Magnusson P, Saharinen J, Perola M, Silander K, Isaacs A, Sijbrands EJ, Uitterlinden AG, Witteman JC, Oostra BA, Elliott P, Ruukonen A, Sabatti C, Gieger C, Meitinger T, Kronenberg F, Döring A, Wichmann HE, Smit JH, McCarthy MI, van Duijn CM, Peltonen L; ENGAGE Consortium. (2009) Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts. *Nat Genet.* 41:47-55.
8. Bach V, Barceló MJ, Altés A, Remacha A, Félez J, Baiget M. (2006) Genotyping the HFE gene by melting point analysis with the LightCycler system: Pros and cons. *Blood Cells Mol Dis.* 36:288-91.
9. Bakos E, Homolya L. (2007) Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1). *Pflugers Arch.* 453:621-41.
10. Bardocz Z, Gyorffy B, Kocsis I, Vasarhelyi B. (2004) Re-calculated Hardy-Weinberg values in papers published in Atherosclerosis between 1995 and 2003. *Atherosclerosis.* 173:141-143.
11. Barratt K, Mackay JF. (2002) Improving real-time PCR genotyping assays by asymmetric amplification. *J Clin Microbiol.* 40:1571-2.
12. Benton JL, Ding J, Tsai MY, Shea S, Rotter JJ, Burke GL, Post W. (2007) Associations between two common polymorphisms in the ABCA1 gene and subclinical atherosclerosis: Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis.* 193:352-60.
13. Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R, Hobbs HH. (2000) Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science.* 2000 290:1771-5.
14. Berge KE, von Bergmann K, Lutjohann D, Guerra R, Grundy SM, Hobbs HH, Cohen JC. (2002) Heritability of plasma noncholesterol sterols and relationship to DNA sequence polymorphism in ABCG5 and ABCG8. *J Lipid Res* 43:486-494.

15. Bernard PS, Ajioka RS, Kushner JP, Wittwer CT. (1998) Homogeneous multiplex genotyping of hemochromatosis mutations with fluorescent hybridization probes. *Am J Pathol.* 153:1055-61.
16. Bernard PS, Pritham GH, Wittwer CT. (1999) Color multiplexing hybridization probes using the apolipoprotein E locus as a model system for genotyping. *Anal Biochem.* 273:221-8.
17. Bertolini S, Pisciotta L, Di Scala L, Langheim S, Bellocchio A, Masturzo P, Cantafora A, Martini S, Averna M, Pes G, Stefanutti C, Calandra S. (2004) Genetic polymorphisms affecting the phenotypic expression of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 174:57-65.
18. Bevan S, Markus HS. (2011) Genetics of common polygenic ischaemic stroke: current understanding and future challenges. *Stroke Res Treat.* 2011:179061.
19. Bhattacharyya AK, Connor WE (1974) Beta-sitosterolemia and xanthomatosis. A newly described lipid storage disease in two sisters. *J Clin Invest.* 53:1033-1043.
20. Bodzioch M, Orsó E, Klucken J, Langmann T, Böttcher A, Diederich W, Drobnik W, Barlage S, Büchler C, Porsch-Ozçürümez M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe G, Aslanidis C, Lackner KJ, Schmitz G. (1999) The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet.* 22:347-51.
21. Bosner MS, Lange LG, Stenson WF, Ostlund RE Jr. (1999) Percent cholesterol absorption in normal women and men quantified with dual stable isotopic tracers and negative ion mass spectrometry. *J Lipid Res.* 40:302-8.
22. Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, Yu L, Brewer C, Collins JA, Molhuizen HO, Loubser O, Ouelette BF, Fichter K, Ashbourne-Excoffon KJ, Sensen CW, Scherer S, Mott S, Denis M, Martindale D, Frohlich J, Morgan K, Koop B, Pimstone S, Kastelein JJ, Genest J Jr, Hayden MR. (1999) Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet.* 22:336-45.
23. Brousseau ME, Bodzioch M, Schaefer EJ, Goldkamp AL, Kielar D, Probst M, Ordovas JM, Aslanidis C, Lackner KJ, Bloomfield Rubins H, Collins D, Robins SJ, Wilson PW, Schmitz G. (2001) Common variants in the gene encoding ATP-

- binding cassette transporter 1 in men with low HDL cholesterol levels and coronary heart disease. *Atherosclerosis*. 154:607-11.
24. Buch S, Schafmayer C, Völzke H, Becker C, Franke A, von Eller-Eberstein H, Kluck C, Bässmann I, Brosch M, Lammert F, Miquel JF, Nervi F, Wittig M, Roskopf D, Timm B, Höll C, Seeger M, ElSharawy A, Lu T, Egberts J, Fändrich F, Fölsch UR, Krawczak M, Schreiber S, Nürnberg P, Tepel J, Hampe J. (2007) A genome-wide association scan identifies the hepatic cholesterol transporter ABCG8 as a susceptibility factor for human gallstone disease. *Nat Genet*. 39:995-9.
 25. Burggraf S, Kösel S, Lohmann S, Beck R, Olgemöller B. (2002) Unexplained DNA melting behavior in a genotyping assay. *Clin Chem*, 48:199-201.
 26. Caamaño JM, Pacheco A, Lanás F, Salazar LA. (2008) Single nucleotide polymorphisms in ABCG5 and ABCG8 genes in Chilean subjects with polygenic hypercholesterolemia and controls. *Clin Chem Lab Med*. 46:1581-5.
 27. Chen ZC, Shin SJ, Kuo KK, Lin KD, Yu ML, Hsiao PJ. (2008) Significant association of ABCG8:D19H gene polymorphism with hypercholesterolemia and insulin resistance. *J Hum Genet*. 53:757-63.
 28. Clee SM, Zwinderman AH, Engert JC, Zwartz KY, Molhuizen HO, Roomp K, Jukema JW, van Wijland M, van Dam M, Hudson TJ, Brooks-Wilson A, Genest J Jr, Kastelein JJ, Hayden MR. (2001) Common genetic variation in ABCA1 is associated with lipoprotein levels and a modified risk for coronary artery disease. *Circulation*. 103:1198-1205.
 29. Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG. (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*. 258:1650-4.
 30. Dean M, Hamon Y, Chimini G. (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res*. 42:1007-17.
 31. Doosti M, Najafi M, Reza JZ, Nikzamir A. (2010) The role of ATP-binding-cassette-transporter-A1 (ABCA1) gene polymorphism on coronary artery disease risk. *Transl Res*. 155:185-90.
 32. Emerging Risk Factors Collaboration, Di Angelantonio E, Sarwar N, Perry P, Kaptoge S, Ray KK, Thompson A, Wood AM, Lewington S, Sattar N, Packard

- CJ, Collins R, Thompson SG, Danesh J. (2009) Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA*. 302:1993-2000.
33. Fitzgerald ML, Mujawar Z, Tamehiro N. (2010) ABC transporters, atherosclerosis and inflammation. *Atherosclerosis*. 211:361-70.
34. Flossmann E, Schulz UG, Rothwell PM. (2004) Systematic review of methods and results of studies of the genetic epidemiology of ischemic stroke. *Stroke*. 35:212-27.
35. Fredrickson DS, Altrocchi PH, Avioli LV, Goodman DWS, Goodman HC (1961) Tangier Disease: Combined Clinical Staff Conference at the National Institutes of Health. *Ann Intern Med*. 1961 55:1016-1031.
36. Fredrickson DS. (1964) The inheritance of high density lipoprotein deficiency (Tangier disease). *J Clin Invest*. 43:228-36.
37. Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Jensen GB, Steffensen R, Tybjaerg-Hansen A. (2008) Genetic variation in ABCA1 predicts ischemic heart disease in the general population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 28:180-6.
38. Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Jensen GB, Tybjaerg-Hansen A. (2004) Genetic variation in ABC transporter A1 contributes to HDL cholesterol in the general population. *J Clin Invest*. 114:1343-53.
39. Gilfix BM. (2009) An unusual melting curve on a LightCycler due to a new mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Genet Test Mol Biomarkers*. 13:769-71.
40. Graf GA, Li WP, Gerard RD, Gelissen I, White A, Cohen JC, Hobbs HH. (2002) Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface. *J Clin Invest*. 110:659-669.
41. Graf GA, Yu L, Li WP, Gerard R, Tuma PL, Cohen JC, Hobbs HH. (2003) ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. *J Biol Chem*. 278:48275-48282.
42. Grünhage F, Acalovschi M, Tirziu S, Walier M, Wienker TF, Ciocan A, Mosteanu O, Sauerbruch T, Lammert F. (2007) Increased gallstone risk in humans conferred by common variant of hepatic ATP-binding cassette transporter for cholesterol. *Hepatology*. 46:793-801.

43. Guevara-Cruz M, Tovar AR, Larrieta E, Canizales-Quinteros S, Torres N. (2010) Increase in HDL-C concentration by a dietary portfolio with soy protein and soluble fiber is associated with the presence of the ABCA1R230C variant in hyperlipidemic Mexican subjects. *Mol Genet Metab.* 101:268-72.
44. Gylling H, Hallikainen M, Pihlajamäki J, Agren J, Laakso M, Rajaratnam RA, Rauramaa R, Miettinen TA. (2004) Polymorphisms in the ABCG5 and ABCG8 genes associate with cholesterol absorption and insulin sensitivity. *J Lipid Res.* 45:1660-1665.
45. Hazard SE, Patel SB. (2007) Sterolins ABCG5 and ABCG8: regulators of whole body dietary sterols. *Pflugers Arch.* 453:745-52.
46. Helgadóttir A, Manolescu A, Thorleifsson G, Gretarsdóttir S, Jonsdóttir H, Thorsteinsdóttir U, Samani NJ, Gudmundsson G, Grant SF, Thorgeirsson G, Sveinbjornsdóttir S, Valdimarsson EM, Matthiasson SE, Johannsson H, Gudmundsdóttir O, Gurney ME, Sainz J, Thorhallsdóttir M, Andresdóttir M, Frigge ML, Topol EJ, Kong A, Gudnason V, Hakonarson H, Gulcher JR, Stefansson K. (2004) The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. *Nat Genet.* 36:233-9.
47. Higgins CF. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol.* 8:67-113.
48. Hopkins PN, Williams RR. (1981) A survey of 246 suggested coronary risk factors. *Atherosclerosis.* 40:1-52.
49. Hubacek JA, Berge KE, Cohen JC, Hobbs HH. (2001) Mutations in ATP-cassette binding proteins G5 (ABCG5) and G8 (ABCG8) causing sitosterolemia. *Hum Mutat.* 18:359-360.
50. Hubáček JA, Berge KE, Stefková J, Pitha J, Skodová Z, Lánská V, Poledne R. (2004) Polymorphisms in ABCG5 and ABCG8 transporters and plasma cholesterol levels. *Physiol Res.* 53:395-401.
51. Iida A, Saito S, Sekine A, Mishima C, Kitamura Y, Kondo K, Harigae S, Osawa S, Nakamura Y. (2002) Catalog of 605 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) among 13 genes encoding human ATP-binding cassette transporters: ABCA4, ABCA7, ABCA8, ABCD1, ABCD3, ABCD4, ABCE1, ABCF1, ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5, and ABCG8. *J Hum Genet.* 47:285-310.

52. Jakulj L, Vissers MN, Tanck MW, Hutten BA, Stellaard F, Kastelein JJ, Dallinga-Thie GM. (2010) ABCG5/G8 polymorphisms and markers of cholesterol metabolism: systematic review and meta-analysis. *J Lipid Res.* 51:3016-23.
53. Jiang Z, Zhou R, Xu C, Feng G, Zhou Y. (2011) Genetic variation of the ATP-binding cassette transporter A1 and susceptibility to coronary heart disease. *Mol Genet Metab.* 103:81-8.
54. Jones ES, Tobertson PW (1948) Coronary artery disease, hypertension, and hypercholesteraemic xanthomatosis. *Br Med J.* 1:1137.
55. Junyent M, Tucker KL, Smith CE, Garcia-Rios A, Mattei J, Lai CQ, Parnell LD, Ordovas JM. (2009) The effects of ABCG5/G8 polymorphisms on plasma HDL cholesterol concentrations depend on smoking habit in the Boston Puerto Rican Health Study. *J Lipid Res.* 50:565-573.
56. Kaikkonen KS, Kortelainen ML, Linna E, Huikuri HV. (2006) Family history and the risk of sudden cardiac death as a manifestation of an acute coronary event. *Circulation.* 114:1462-7.
57. Kajinami K, Brousseau ME, Nartsupha C, Ordovas JM, Schaefer EJ. (2004) ATP binding cassette transporter G5 and G8 genotypes and plasma lipoprotein levels before and after treatment with atorvastatin. *J Lipid Res.* 45:653-656.
58. Kakko S, Kelloniemi J, von Rohr P, Hoeschele I, Tamminen M, Brousseau ME, Kesaniemi YA, Savolainen MJ. (2003) ATP-binding cassette transporter A1 locus is not a major determinant of HDL-C levels in a population at high risk for coronary heart disease. *Atherosclerosis.* 166:285-290.
59. Kathiresan S, Willer CJ, Peloso GM, Demissie S, Musunuru K, Schadt EE, Kaplan L, Bennett D, Li Y, Tanaka T, Voight BF, Bonnycastle LL, Jackson AU, Crawford G, Surti A, Guiducci C, Burt NP, Parish S, Clarke R, Zelenika D, Kubalanza KA, Morken MA, Scott LJ, Stringham HM, Galan P, Swift AJ, Kuusisto J, Bergman RN, Sundvall J, Laakso M, Ferrucci L, Scheet P, Sanna S, Uda M, Yang Q, Lunetta KL, Dupuis J, de Bakker PI, O'Donnell CJ, Chambers JC, Kooner JS, Hercberg S, Meneton P, Lakatta EG, Scuteri A, Schlessinger D, Tuomilehto J, Collins FS, Groop L, Altshuler D, Collins R, Lathrop GM, Melander O, Salomaa V, Peltonen L, Orho-Melander M, Ordovas JM, Boehnke

- M, Abecasis GR, Mohlke KL, Cupples LA. (2009) Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat Genet.* 41:56-65.
60. Klett EL, Lee MH, Adams DB, Chavin KD, B Patel SB. (2004) Localization of ABCG5 and ABCG8 proteins in human liver, gall bladder and intestine. *BMC Gastroenterol.* 4:21.
61. Koch WH. (2004) Technology platforms for pharmacogenomic diagnostic assays. *Nat Rev Drug Discov.* 3:749-61.
62. Koeijvoets KC, van der Net JB, Dallinga-Thie GM, Steyerberg EW, Mensink RP, Kastelein JJ, Sijbrands EJ, Plat J. (2009) ABCG8 gene polymorphisms, plasma cholesterol concentrations, and risk of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 204:453-458.
63. Kroupis C, Christopoulos K, Devetzoglou M, Tsiagas I, Lianidou ES. (2008) Asymmetric real-time PCR detection of BRCA1 5382insC mutation by melting curve analysis in the LightCycler. *Clin Chim Acta.* 390:141-4.
64. Lawn RM, Wade DP, Garvin MR, Wang X, Schwartz K, Porter JG, Seilhamer JJ, Vaughan AM, Oram JF. (1999) The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J Clin Invest.* 104:R25-31.
65. Lay MJ, Wittwer CT. (1997) Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR. *Clin Chem.* 43:2262-7.
66. Lee MH, Gordon D, Ott J, Lu K, Ose L, Miettinen T, Gylling H, Stalenhoef AF, Pandya A, Hidaka H, Brewer B Jr, Kojima H, Sakuma N, Pegoraro R, Salen G, Patel SB. (2001) Fine mapping of a gene responsible for regulating dietary cholesterol absorption; founder effects underlie cases of phytosterolaemia in multiple communities. *Eur J Hum Genet.* 9:375-84.
67. Li J, Wang LF, Li ZQ, Pan W. (2009) Effect of R219K polymorphism of the ABCA1 gene on the lipid-lowering effect of pravastatin in Chinese patients with coronary heart disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 36:567-70.
68. Li Y, Tang K, Zhou K, Wei Z, Zeng Z, He L, Wan C. (2011) Quantitative assessment of the effect of ABCA1 R219K polymorphism on the risk of coronary heart disease. *Mol Biol Rep.* 2011 Jun 4. [kiadást megelőző elektronikus változat]

69. Ling WH, Jones PJ. (1995) Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sci.* 57:195-206.
70. Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, De Simone G, Ferguson TB, Ford E, Furie K, Gillespie C, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho PM, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott MM, Meigs J, Mozaffarian D, Mussolino M, Nichol G, Roger VL, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Roger VL, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong ND, Wylie-Rosett J; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. (2010) Heart disease and stroke statistics - 2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 121:e46-e215.
71. Lloyd-Jones DM, Nam BH, D'Agostino RB Sr, Levy D, Murabito JM, Wang TJ, Wilson PW, O'Donnell CJ. (2004) Parental cardiovascular disease as a risk factor for cardiovascular disease in middle-aged adults: a prospective study of parents and offspring. *JAMA.* 291:2204-11.
72. Lu K, Lee MH, Hazard S, Brooks-Wilson A, Hidaka H, Kojima H, Ose L, Stalenhoef AF, Mietinnen T, Bjorkhem I, Bruckert E, Pandya A, Brewer HB Jr, Salen G, Dean M, Srivastava A, Patel SB. (2001) Two genes that map to the STSL locus cause sitosterolemia: genomic structure and spectrum of mutations involving sterolin-1 and sterolin-2, encoded by ABCG5 and ABCG8, respectively. *Am J Hum Genet.* 69:278-90.
73. Lusis AJ, Mar R, Pajukanta P. (2004) Genetics of atherosclerosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 5:189-218.
74. Ma XY, Liu JP, Song ZY. (2011) Associations of the ATP-binding cassette transporter A1 R219K polymorphism with HDL-C level and coronary artery disease risk: a meta-analysis. *Atherosclerosis.* 215:428-34.
75. Maász A, Szolnoki Z, Balikó L, Melegh B. (2011) Ischaemiás stroke genetikai háttere: Hol tartunk most? *Orv Hetil.* 152:455-63.
76. Mackay J, Mensah G. Atlas of Heart Disease and Stroke. *WHO*, Geneva, 2004.
77. Mahadevan MS, Benson PV. (2005) Factor V null mutation affecting the Roche LightCycler factor V Leiden assay. *Clin Chem.* 51:1533-5.

78. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16:1215.
79. Moos V, Rudwaleit M, Herzog V, Höhlig K, Sieper J, Müller B. (2000) Association of genotypes affecting the expression of interleukin-1 β or interleukin-1 receptor antagonist with osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 43:2417-22.
80. Morgan TM, Krumholz HM, Lifton RP, Spertus JA. (2007) Nonvalidation of reported genetic risk factors for acute coronary syndrome in a large-scale replication study. *JAMA.* 297:1551-61.
81. Nguyen LB, Shefer S, Salen G, Ness GC, Tint GS, Zaki FG, Rani I. (1990) A molecular defect in hepatic cholesterol biosynthesis in sitosterolemia with xanthomatosis. *J Clin Invest.* 86:923-31.
82. Oram JF, Vaughan AM. (2006) ATP-Binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circ Res.* 99:1031-43.
83. Pasdar A, Yadegarfar G, Cumming A, Whalley L, St Clair D, MacLeod MJ. (2007) The effect of ABCA1 gene polymorphisms on ischaemic stroke risk and relationship with lipid profile. *BMC Med Genet.* 8:30.
84. Patel SB, Salen G, Hidaka H, Kwiterovich PO, Stalenhoef AF, Miettinen TA, Grundy SM, Lee MH, Rubenstein JS, Polymeropoulos MH, Brownstein MJ. (1998) Mapping a gene involved in regulating dietary cholesterol absorption. The sitosterolemia locus is found at chromosome 2p21. *J Clin Invest.* 102:1041-4.
85. Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJ, Bakker CT, Otter M, Scheffer GL, Scheper RJ, Borst P, Oude Elferink RP. (1996) Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science.* 271:1126-8.
86. Peltonen L, McKusick VA. (2001) Genomics and medicine. Dissecting human disease in the postgenomic era. *Science.* 291:1224-9.
87. Peyret N, Seneviratne PA, Allawi HT, SantaLucia J Jr. (1999) Nearest-neighbor thermodynamics and NMR of DNA sequences with internal A.A, C.C, G.G, and T.T mismatches. *Biochemistry.* 38:3468-77.
88. Plat J, Bragt MC, Mensink RP. (2005) Common sequence variations in ABCG8 are related to plant sterol metabolism in healthy volunteers. *J Lipid Res.* 46:68-75.

89. Ringpfeil F, Lebowitz MG, Christiano AM, Uitto J. (2000) Pseudoxanthoma elasticum: mutations in the MRP6 gene encoding a transmembrane ATP-binding cassette (ABC) transporter. *Proc Natl Acad Sci.* 97:6001-6.
90. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science.* 245:1066-73.
91. Robey RW, Polgar O, Deeken J, To KW, Bates SE. (2007) ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance. *Cancer Metastasis Rev.* 26:39-57.
92. Rudkowska I, Jones PJ (2008) Polymorphisms in ABCG5/G8 transporters linked to hypercholesterolemia and gallstone disease. *Nutr Rev.* 66:343-348.
93. Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, Deleuze JF, Brewer HB, Duverger N, Denèfle P, Assmann G. (1999) Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet.* 22:352-5.
94. Rust S, Walter M, Funke H, von Eckardstein A, Cullen P, Kroes HY, Hordijk R, Geisel J, Kastelein J, Molhuizen HO, Schreiner M, Mischke A, Hahmann HW, Assmann G. (1998) Assignment of Tangier disease to chromosome 9q31 by a graphical linkage exclusion strategy. *Nat Genet.* 20:96-8.
95. Salen G, Horak I, Rothkopf M, Cohen JL, Speck J, Tint GS, Shore V, Dayal B, Chen T, Shefer S. (1985) Lethal atherosclerosis associated with abnormal plasma and tissue sterol composition in sitosterolemia with xanthomatosis. *J Lipid Res.* 26:1126-1133.
96. Salen G, Shefer S, Nguyen L, Ness GC, Tint GS, Shore V. (1992) Sitosterolemia. *J Lipid Res.* 33:945-55.
97. Santosa S, Demonty I, Lichtenstein AH, Ordovas JM, Jones PJ. (2007) Single nucleotide polymorphisms in ABCG5 and ABCG8 are associated with changes in cholesterol metabolism during weight loss. *J Lipid Res.* 48:2607-2613.
98. Schneider E, Hunke S. (1998) ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol Rev.* 22:1-20.

99. Singaraja RR, Brunham LR, Visscher H, Kastelein JJ, Hayden MR. (2003) Efflux and atherosclerosis: the clinical and biochemical impact of variations in the ABCA1 gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:1322-32.
100. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. (2006) SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics.* 22:1928-9.
101. Srinivasan SR, Li S, Chen W, Boerwinkle E, Berenson GS. (2003) R219K polymorphism of the ABCA1 gene and its modulation of the variations in serum high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides related to age and adiposity in white versus black young adults. The Bogalusa heart study. *Metabolism.* 52:930-934.
102. Stender S, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. (2011) Sterol transporter adenosine triphosphate-binding cassette transporter G8, gallstones, and biliary cancer in 62,000 individuals from the general population. *Hepatology.* 53:640-8.
103. Strautnieks SS, Bull LN, Knisely AS, Kocoshis SA, Dahl N, Arnell H, Sokal E, Dahan K, Childs S, Ling V, Tanner MS, Kagalwalla AF, Németh A, Pawlowska J, Baker A, Mieli-Vergani G, Freimer NB, Gardiner RM, Thompson RJ. (1998) A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Genet.* 20:233-8.
104. Sun H, Molday RS, Nathans J. (1999) Retinal stimulates ATP hydrolysis by purified and reconstituted ABCR, the photoreceptor-specific ATP-binding cassette transporter responsible for Stargardt disease. *J Biol Chem.* 274:8269-81.
105. Tag CG, Schifflers MC, Mohnen M, Gressner AM, Weiskirchen R. (2005) Atypical melting curve resulting from genetic variation in the 3' untranslated region at position 20218 in the prothrombin gene analyzed with the LightCycler factor II (prothrombin) G20210A assay. *Clin Chem.* 51:1560-1.
106. Tregouet DA, Ricard S, Nicaud V, Arnould I, Soubigou S, Rosier M, Duverger N, Poirier O, Mace S, Kee F, Morrison C, Deneffe P, Tiret L, Evans A, Deleuze JF, Cambien F. (2004) In-depth haplotype analysis of ABCA1 gene polymorphisms in relation to plasma ApoA1 levels and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:775-781.
107. Truscott BL. (1972) WHO on stroke. *Ann Intern Med.* 76:139-40.

108. Voloshyna I, Reiss AB. (2011) The ABC transporters in lipid flux and atherosclerosis. *Prog Lipid Res.* 50:213-24.
109. de Vree JM, Jacquemin E, Sturm E, Cresteil D, Bosma PJ, Aten J, Deleuze JF, Desrochers M, Burdelski M, Bernard O, Oude Elferink RP, Hadchouel M. (1998) Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proc Natl Acad Sci.* 95:282-7.
110. Wada M, Toh S, Taniguchi K, Nakamura T, Uchiumi T, Kohno K, Yoshida I, Kimura A, Sakisaka S, Adachi Y, Kuwano M. (1998) Mutations in the canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene, a novel ABC transporter, in patients with hyperbilirubinemia II/Dubin-Johnson syndrome. *Hum Mol Genet.* 7:203-7.
111. Wang J, Burnett JR, Near S, Young K, Zinman B, Hanley AJ, Connelly PW, Harris SB, Hegele RA. (2000) Common and rare ABCA1 variants affecting plasma HDL cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20:1983-1989.
112. Warshawsky I, Hren C, Sercia L, Shadrach B, Deitcher SR, Newton E, Kottke-Marchant K. (2002) Detection of a novel point mutation of the prothrombin gene at position 20209. *Diagn Mol Pathol.* 11:152-6.
113. Weggemans RM, Zock PL, Tai ES, Ordovas JM, Molhuizen HO, Katan MB. (2002) ATP binding cassette G5 C1950G polymorphism may affect blood cholesterol concentrations in humans. *Clin Genet.* 62:226-229.
114. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. (1997a) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques.* 22:130-138.
115. Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. (1997b) The LightCycler: A microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques.* 22:176–81.
116. Woll PS, Hanson NQ, Arends VL, Tsai MY. (2005) Effect of two common polymorphisms in the ATP binding cassette transporter A1 gene on HDL-cholesterol concentration. *Clin Chem.* 51:907-9.
117. Woo TH, Patel BK, Smythe LD, Symonds ML, Norris MA, Dohnt MF. (1997) Identification of pathogenic *Leptospira* genospecies by continuous monitoring of

- fluorogenic hybridization probes during rapid-cycle PCR. *J Clin Microbiol.* 35:3140-6.
118. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L; INTERHEART Study Investigators. (2004) Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet.* 364:937-52.
119. Zdravkovic S, Wienke A, Pedersen NL, Marenberg ME, Yashin AI, De Faire U. (2002) Heritability of death from coronary heart disease: a 36-year follow-up of 20 966 Swedish twins. *J Intern Med.* 252:247-54.
120. Zhang Y, Klein K, Sugathan A, Nassery N, Dombkowski A, Zanger UM, Waxman DJ. (2011) Transcriptional profiling of human liver identifies sex-biased genes associated with polygenic dyslipidemia and coronary artery disease. *PLoS One.* 6:e23506.

10 Saját közlemények jegyzéke

A dolgozat anyagát képező nemzetközi tudományos közlemények

1. **Szilvási A**, Andrikovics H, Pongrácz E, Kalina Á, Komlósi Z, Klein I, Tordai A. (2010) Frequencies of four ATP-binding cassette transporter G8 polymorphisms in patients with ischemic vascular diseases. *Genet Test Mol Biomarkers*. 14:667-72.
IF 2010: 0,879
2. Andrikovics H, Pongracz E, Kalina A, **Szilvasi A**, Aslanidis C, Schmitz G, Tordai A. (2006) Decreased frequencies of ABCA1 polymorphisms R219K and V771M in Hungarian patients with cerebrovascular and cardiovascular diseases. *Cerebrovasc Dis*. 21:254-9.
IF 2006: 2,003
3. **Szilvási A**, Andrikovics H, Kalmár L, Bors A, Tordai A. (2005) Asymmetric PCR increases efficiency of melting peak analysis on the LightCycler. *Clinical Biochemistry*. 38:727-30.
IF 2005: 2,359

A dolgozat anyagához az aszimmetrikus PCR-t követő olvadáspont analízis alkalmazása révén kapcsolható nemzetközi tudományos közlemények

4. Lakatos PL, Szamosi T, **Szilvasi A**, Molnar E, Lakatos L, Kovacs A, Molnar T, Altorjay I, Papp M, Tulassay Z, Miheller P, Papp J, Tordai A, Andrikovics H; Hungarian IBD Study Group. (2008) ATG16L1 and IL23 receptor (IL23R) genes are associated with disease susceptibility in Hungarian CD patients. *Dig Liver Dis*. 40:867-73.
IF 2008: 2,577
5. Fischer S, Lakatos PL, Group TH, Lakatos L, Kovacs A, Molnar T, Altorjay I, Papp M, **Szilvasi A**, Tulassay Z, Osztoivits J, Papp J, Demeter P, Schwab R, Tordai A, Andrikovics H. (2007) ATP-binding cassette transporter ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) variants are not associated with disease susceptibility, disease phenotype response to medical therapy or need for surgery in Hungarian patients with inflammatory bowel diseases. *Scand J Gastroenterol*. 42:726-33.
IF 2007: 1,758

6. Andrikovics H, Meggyesi N, **Szilvasi A**, Tamaska J, Halm G, Lueff S, Nahajevszky S, Egyed M, Varkonyi J, Mikala G, Sipos A, Kalasz L, Masszi T, Tordai A. (2009) HFE C282Y Mutation as a Genetic Modifier Influencing Disease Susceptibility for Chronic Myeloproliferative Disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 18:929-34.

IF 2009: 4,310

Egyéb témában megjelent nemzetközi tudományos közlemények

7. Andrikovics H, Nahajevszky S, **Szilvasi A**, Bors A, Adam E, Kozma A, Kajtar B, Barta A, Poros A, Tordai A. (2007) First and second line imatinib treatment in chronic myelogenous leukemia patients expressing rare e1a2 or e19a2 BCR-ABL transcripts. *Hematol Oncol.* 25:143-7.

IF 2007: 2,180

8. Patocs A, Klein I, **Szilvasi A**, Gergics P, Toth M, Valkusz Z, Forizs E, Igaz P, Al-Farhat Y, Tordai A, Varadi A, Racz K, Esik O. (2006) Genotype/phenotype correlations in Hungarian patients with hereditary medullary thyroid cancer. *Wien Klin Wochenschr.* 118:417-21.

IF 2006: 0,804

9. Szamosi T, Lakatos PL, The Hungarian IBD Study Group, **Szilvasi A**, Lakatos L, Kovacs A, Molnar T, Altorjay I, Papp M, Szabo O, Satori A, Tulassay Z, Miheller P, Horvath HC, Papp J, Tordai A, Andrikovics H. (2009) The 3'UTR NFKBIA Variant Is Associated with Extensive Colitis in Hungarian IBD Patients. *Dig Dis Sci.* 54:351-9.

IF 2009: 1,838

Hazai tudományos közlemények

10. Andrikovics H, **Szilvasi A**, Meggyesi N, Kiraly V, Halm G, Lueff S, Nahajevszky S, Mikala G, Sipos A, Lovas N, Csukly Z, Matrai Z, Tamaska J, Tordai A, Masszi T. (2007) A 2-es típusú Janus tirozin kináz Val617Phe aktiváló pontmutáció szerepe es kimutatásának jelentősége myeloproliferatív szindrómában. *Orv Hetil.* 148:203-210.
11. Andrikovics H, Bors A, Meggyesi N, **Szilvasi A**, Tordai A. (2007) Az akut myeloid leukémia molekuláris genetikai háttere. *Hemat Transzf.* S1:117-21.

11 Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni *Dr Sarkadi Balázs* és *Dr Tordai Attila* témavezetőimnek nélkülözhetetlen szakmai segítségüket és építő kritikájukat, amivel mindvégig segítették munkámat; *Dr Andrikovics Hajnalkának* a mérések kivitelezésében és a statisztikák elkészítésében nyújtott segítségét; *Dr Pongrácz Endre* és *Dr Kalina Ákos* klinikusoknak a betegcsoportok mintáinak és adatainak gyűjtését, illetve rendelkezésünkre bocsátását; *Dr Klein Izabellának* és *Dr Váradi Andrásnak* a témaválasztásban nyújtott segítségét; *Dr Liliom Károlynak* a dolgozat lelkiismeretes és kritikus átolvasását; *Dr Komlósi Zsoltnak* a kísérleti munka során nyújtott segítségét; *Dr Bors Andrásnak*, *Meggyesi Nórának* és *Dr Kalmár Lajosnak* a segítőkész szakmai támogatást. Továbbá köszönetet szeretnék mondani *Bakonyi Ildikónak*, *Csiki Szilviának*, *Horváth Csongornének* és *Szaver Gabriellának* a jó hangulatban eltöltött munkanapokért. Külön köszönet illeti *Pfundt Antalnét*, aki nélkül a metodikai cikk nem jött volna létre.

A munkát támogatta: Nemzeti Fejlesztési Ügynökség; KMOP-1.1.2-07/1-2008-0003.



Függelék

1. függelék: Az allél diszkriminációs módszerekhez alkalmazott amplifikációs primerek és hibridizációs szondák nukleotid szekvenciái

Gén: SNP	Elnevezés	Nukleotid szekvencia
ABCA1: R219K	A1-R219K-F	TTTTGCAAGGCTACCAGTTACA
	A1-R219K-R	CAGGATTGGCTTCAGGATGT
	A1-R219K-Sens	LC705-GCCTACCAAGGGAGAACTG-P
	A1-R219K-Anch	CTTGGTGACCAAGAAGTTTCTGAGCTTTG-FI
ABCA1: V771M	A1-V771M-F	CCTTCCAGTTAGGAACCCCT
	A1-V771M-R	GGAAGGTCAAATGCCTACAG
	A1-V771M-Sens	LC640-GCAGGACTACGTGGGCTTC-P
	A1-V771M-Anch	CTGTACCTGCCCTACGTCCTGTGTGTGGCA-FI
ABCA1: I883M	A1-I883M-F	AGGCCCTGGTATTTTCCTTG
	A1-I883M-R	CCCTGGAGTGGTTTCACAGT
	A1-I883M-Sens	LC640-CTTTCTGATATTCTCTTCTGG-P
	A1-I883M-Anch	TTAAAGAAAGAGCAGGAGGTCAACAGCACT-FI
ABCG2: Q141K	MXR-Q141K-LCF	TATGTATACTAAACAGTCATGGTCTTAGA
	MXR-Q141K-LCR	TGGAGTCTGCCACTTTATCCAGACCT
	MXR-Q141K-SENS	Bo650-AAACTTACAGTTCTCAGCAGCTCTTCGG-P
	MXR-Q141K-ANC	GATGATGTTGTGATGGGCACTCTGACGGTGAGA-FAM
ABCG8: D19H	G8-D19H-F	GGGTCTAAGAGAGCTGC
	G8-D19H-R	CCTCCGCCCTTTGACA
	G8-D19H-Sens	CTCCCCAGCATACCTCGG-FI
	G8-D19H-Anch	LC640-AGTGAGCAATGGGAAGTCGGC-P
ABCG8: Y54C	G8-Y54C-F-2	TCCTATGTTCTCAGCAGCTTCTAA
	G8-Y54C-R	CCCTTTTATTTCCACCCG
	G8-Y54C-Sens	CTGGCAGTTGAGGTCTCTGAC-FI
	G8-Y54C-Anch	LC640-CCAGGGTGTGTTGGGCTGGC-P
ABCG8: T400K	G8-T400K-F	ACATCTTCTGCCTCCC
	G8-T400K-R	GCTGGATGCTGTTTTTTTC
	G8-T400K-Sens	LC640-GCAGTTTACGACGCTGATCCG-P
	G8-T400K-Anch	AGATGCCTGGGGCGGTG-FI
ABCG8: A632V	G8-A632V-F	AATGCCTCTCGGGAAC
	G8-A632V-R	CGTCTGGCGTGAATCA
	G8-A632V-Sens	CTCCATGACACTGAGGATCTG-FI
	G8-A632V-Anch	LC640-GACACAGACATGCAGTGGGCT-P
FII: g.20210G>A	FII-LCF	GGAACCAATCCCGTGA
	FII-LCR	TGCTCGGACTACCAGC
	FII-SENS	Cy5-AGCATTGAGGCTCGCTGAG-P
	FII-ANC	CCAGAGAGCTGCCCATGAATAGCACTG-FAM
FV: Leiden	Leiden-LCF	GCCCCATTATTTAGCCAG
	Leiden-LCR	GATGCCCCAGTGCTTAAC
	Leiden-5LC	TGTATTCCTCGCCTGTCCAGG-FAM
	Leiden-3LC	Bo650-TCTGCTCTTACAGATTAGAAGTAGTCTATTAGCCC-P
	Leiden-5LC-comp	Bo650-CCTGGACAGGCAAGGAATACA-P
	Leiden-3LC-comp	GGGCTAATAGGACTACTTCTAATCTGTAAGAGCAGA-FAM
HFE: H63D	HFE-H63D-LCF	CTCTCCACATAACCCTTGC
	HFE-H63D-LCR	GAGCCTCAACATCCTGC
	HFE-H63D-SENS	CGACTCTCATCATCATAGAACACGAAC-FAM
	HFE-H63D-ANC	Bo650-CTGGTCATCCACGTAGCCCCAAAGC-P

Rövidítések: Bo650: 5'-Bodipy650; Cy5: 5'-Cy5.5 (indodicarbocyanine); LC640: 3'-LC RED 640; LC705: 3'-LC RED 705; FAM: 3'-6-FAM; FI: 3'-Fluoreszcein; P: 3'-foszforiláció; SNP: egy nukleotidot érintő polimorfizmus.



Asymmetric PCR increases efficiency of melting peak analysis on the LightCycler

Anikó Szilvási, Hajnalka Andrikovics, Lajos Kalmár, András Bors, Attila Tordai*

Laboratory of Molecular Genetics, Institute of Hematology and Immunology, National Medical Center, Diószegi út 64, Budapest H-1113, Hungary

Received 22 July 2004; received in revised form 1 April 2005; accepted 8 April 2005

Available online 27 June 2005

Abstract

Objectives: To systematically analyze the effects of asymmetric PCR on LightCycler melting analyses of four different allelic-discrimination systems and to reduce an inconsistent non-specific melting peak observed during factor V Leiden genotyping.

Design and methods: PCR amplifications and melting analyses were carried out with various oligonucleotide concentrations and ratios. To monitor the efficiency, calculated peak area values were compared after melting analyses.

Results: Peak area values increased by a mean of 11.2-fold (range: 6 to 17) in case of an amplification primer ratio of 1:6.7 asymmetric PCR compared to symmetric primer conditions in four different SNP-genotyping systems. Using a complementary hybridization probe set for factor V Leiden genotyping, a converse amplification primer ratio was necessary for similar results.

Conclusions: Asymmetric PCR resulting in the formation of higher amounts of target strands significantly increases the efficiency of LightCycler allelic-discrimination.

© 2005 The Canadian Society of Clinical Chemists. All rights reserved.

Keywords: Asymmetric PCR; LightCycler; Allelic-discrimination; Hybridization probes

Introduction

As the number of known causative single base mutations (single nucleotide polymorphism, SNP) increases, there is an increasing need for adequate, robust, and reliable techniques for SNP-genotyping [1]. Real time PCR amplification followed by fluorescence-labeled probe hybridization and melting curve analysis by the LightCycler is a frequently used single-tube technique [1]. Among other optimization parameters, the relative amounts of amplification primers are important, and a few reports mention the beneficial effects of asymmetric PCR (AS-PCR [2–4]).

Upon genotyping for the R506Q mutation of the factor V gene (FV Leiden) with in-house designed oligonucleotides,

an inconsistent third peak and various melting peak heights were observed. Systematic analyses of various oligonucleotide conditions of an AS-PCR were carried out by which signal intensity, specificity, and reproducibility improved significantly. The effects of using hybridization probes annealing to the complementary strand compared to the original setting were also examined. To extend our observations to additional gene- and SNP-environments, the characterization of the following SNP detection systems was also carried out: FII g.20210G>A (prothrombin); HFE (hereditary hemochromatosis) H63D and BCRP (breast cancer resistance protein or ABCG2) Q141K [5–8].

Methods

Primer design

Amplification primers and hybridization probes were designed by the LightCycler Probe Design software

Abbreviations: AS-PCR, asymmetric PCR; BP, basepairs; FRET, fluorescence resonance energy transfer; PA, peak area; PCR, polymerase chain reaction; SNP, single nucleotide polymorphism; TM, melting temperature.

* Corresponding author. Fax: +36 1 3852255.

(Roche Diagnostics), and all oligonucleotides were synthesized by Integrated DNA Technologies (Coralville, USA). Amplification primers Leiden-LCF and Leiden-LCR recognizing the factor V gene were used, yielding a PCR product of 210 bp encompassing the c.1691G>A (R506Q) FV Leiden mutation. Two probe sets hybridizing to the amplification product at the same internal sequence but to the different strands were also designed. The “sense” probe set consists of Leiden-3LC and Leiden-5LC, and the “antisense” probe set consists of Leiden-3LC-comp and Leiden-5LC-comp. Leiden-5LC is perfectly matching with the wild type allele (c.1691G) of the sense strand (formed by Leiden-LCR amplification primer), while Leiden-5LC-comp is perfectly matching with the mutant allele (c.1691T) of the antisense strand (formed by Leiden-LCF amplification primer). These probe sets are complementary to each other, with one mismatch at the position of the Leiden mutation. Oligonucleotide sequences (FV Leiden, FII g.20210G>A, HFE H63D, BCRP Q141K) are available upon request.

PCR amplification and melting curve analyses

All amplification reactions were performed in a LightCycler. PCR was carried out in a final volume of 20 μ L and contained 10 μ L 2 $\times$ PCR Master Mix (Promega). Reactions were supplemented with 0.7 U *Taq* DNA polymerase (Finnzyme, Espoo, Finland) and 0.75 mM $MgCl_2$. Different amounts of amplification primers, 0.25 μ mol/L of each hybridization probes, and 200 ng DNA template were added. DNA was denatured at 95°C for 30 s and amplified through 70 cycles of PCR (95°C 0 s, 50°C 10 s, and 72°C 10 s [15 s for BCRP Q141K]).

Melting curve analyses were carried out by lowering the temperature to 40°C for 60 s and gradually increasing it to 80°C, with a transition rate of 0.1°C/s, and fluorescent signal was measured continuously.

The LightCycler software automatically generated melting curve graphs and calculated the melting peak area (PA) values. PA calculations were used to compare efficiencies of different PCR conditions. Statistical analyses were carried out with the Student's *t* test, with a level of significance of $P < 0.05$.

Results

After optimizing our in-house allelic-discrimination based on the LightCycler system for FV Leiden genotyping, we were able to consistently distinguish wild type and mutant alleles, but we observed an additional internal peak (at lower temperature) for some of the wild/wild genotype samples. By using an altered amplification primer ratio of 0.15:0.50 μ mol/L (1:3.3) forward:reverse (Leiden-LCF:Leiden-LCR), signal intensities substantially increased, and the additional peak of the wild/wild genotype disappeared.

We used FV Leiden genotyping as a model to systematically analyze the effects of amplification primer ratio alterations. To this end, we carried out a series of LightCycler PCR reactions using altered amplification primer ratios with otherwise identical conditions. As an efficiency parameter, we compared the peak area (PA) values automatically generated by the LightCycler software. By using the reverse amplification primer in excess compared to the amount of the forward primer, gradual increases in PA values were observed (Fig. 1). In the case of the 1:3.3 ratio, a 4.7-fold PA value increase (0.13 ± 0.049 vs. 0.028 ± 0.017 , SD values are based on three parallel experiments) was observed compared to the 1:1 primer ratio ($P = 0.014$). At the ratio of 1:6.7, a further PA value increase of 2.4-fold (0.31 ± 0.12 vs. 0.13 ± 0.049) was measured compared to the 1:3.3 condition ($P = 0.035$). Further relative increases in the amount of the reverse primer (ratio of 1:13 and 1:16) caused some but non-significant PA value increases suggesting a plateau-effect (Fig. 1). Alteration of the primer ratio in excess of 1:16 did not result in further PA value increases (not shown). We also tested the effects of parallel increases of both primer concentrations (up to 0.5 μ mol/L) without altering the 1:1 ratio, as well as increasing the amounts of the hybridization probes (up to 0.5 μ mol/L), and in all conditions, the PA values showed non-significant, inconsistent fluctuations (not shown).

By designing an alternative probe set, we used a novel approach to confirm the previously suggested hypothesis

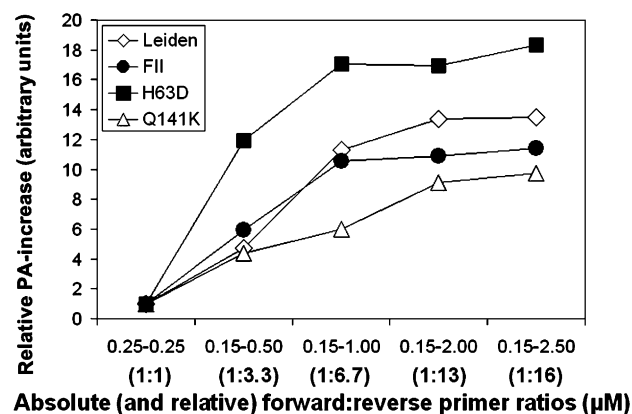


Fig. 1. Changes in peak area (PA) values as a function of different amplification primer ratios in four different SNP genotyping systems. PCR reactions for the detection of FV Leiden (Leiden), FII g.20210G>A (FII); HFE H63D (H63D) and BCRP Q141K (Q141K) sequence alterations were carried out with identical conditions including a homozygous wild/wild (except H63D) DNA template (see the Methods section), except for different forward:reverse amplification primer ratios. These ratios are indicated on the 'x' axis with absolute numbers in μ mol/L final concentrations with relative ratios in parentheses. These discrete separate conditions represent monotonous increases in the relative amount of one primer. Peak area (PA) values for each determination were automatically calculated by the LightCycler software. For better comparison, we calculated relative PA increases by dividing the appropriate PA values with that of 1:1 primer ratio amplification. These latter PA values were the following, as calculated by the LightCycler software for each SNP: Leiden: 0.028; FII: 0.015; H63D: 0.0042; Q141K: 0.011.

[2–4] that a preferential unbalanced formation of one strand of PCR product enhances the efficiency of allelic-discrimination. This alternative probe set (termed “antisense”) is strictly complementary to the “sense” probe set except for one base, namely a G>A change in position 1691 in the sensor probe. Thus, this probe shows a stronger hybridization to the FV Leiden allele compared to the wild type allele. As expected, to get an outstanding high signal, excess amount of the forward primer (Leiden-LCF) had to be used with the “antisense” probes (Fig. 2, trace 2). Since the sensor probe of the “antisense” probe set is complementary to the Leiden allele, in case of the wild type sample, we recorded a melting peak at a lower temperature compared to the similarly efficient “sense” probes and excess reverse primer combination (trace 1). The opposite combinations were totally uninformative as to genotyping (see the entirely overlapping traces 5 and 6). In cases of the usual conditions, i.e. symmetric amplification primer ratios, strongly decreased, but similar efficiencies were observed (traces 3 and 4). Omission of traces 1 and 2 allowing the magnification of these latter traces (by a different ‘y’ scale) indicated the correct genotypes (not shown).

We carried out AS-PCR with the excess amount of amplification primers giving rise to the strand complementary to the hybridization probes in three further genotyping systems (FII g.20210G>A, HFE H63D, BCRP Q141K). As shown in Fig. 1, similar trends were observed in each case. The relative PA values showed gradual increases as a consequence of increasing the amounts of the appropriate

primers. Peak area values increased by a mean of 11.2-fold (range: 6 to 17) in case of an amplification primer ratio of 1:6.7 AS-PCR compared to symmetric primer conditions in four different SNP-genotyping systems.

Discussion

Application of AS-PCR in the context of a hybridization system was first described by Lay et al. [9]. In this system, the forward amplification primer was labeled by Cy5 which participates in the FRET reaction with a single hybridization probe. In this setting, it was obvious that the labeled primer should be used in excess.

In dual probe systems, i.e. when unlabeled amplification primers and two hybridization probes are used, the significance of AS-PCR was first indicated by Bernard et al. [10], who modeled the competition between the complementary strand of the PCR with the labeled probes by adding synthetic competitor oligonucleotides. As a result, an approximately 40% decrease in fluorescence signal intensity was observed. Burggraf et al. [3] reported incorrect genotyping results, observed during an in-house developed assay. Gradually decreasing the amount of the reverse primer ratio to 5:1, a gradual appearance of the second peak was demonstrated allowing the correct genotyping of the heterozygous sample. In contrast to our observation, no significant increase in PA values occurred in this system as a consequence of AS-PCR.

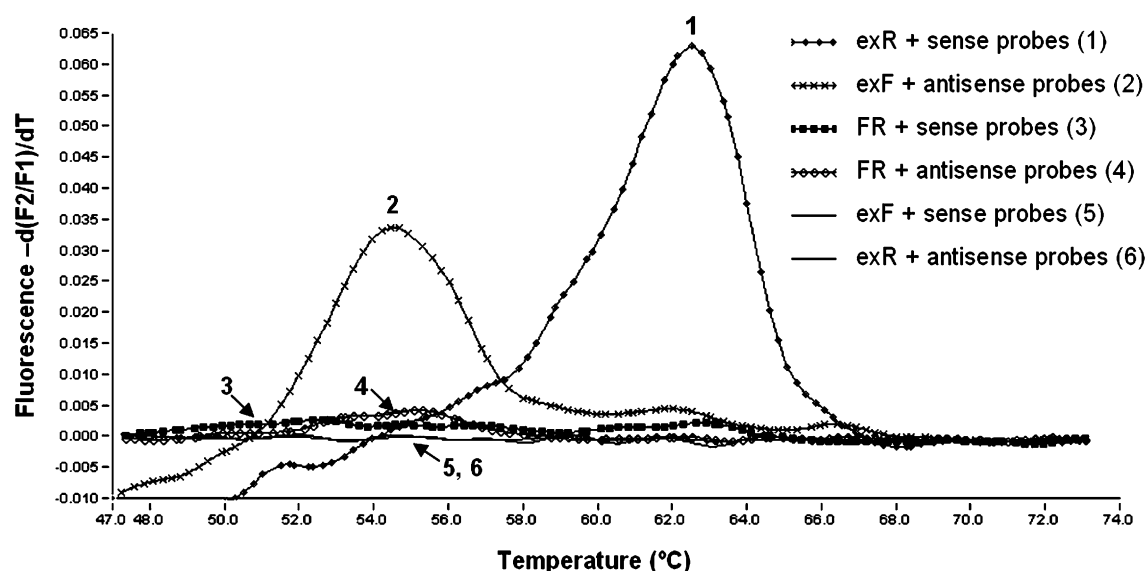


Fig. 2. Comparison of melting curve analyses using sense and antisense hybridization probe sets and different amplification primer ratios. PCR was carried out by ‘symmetric’ (0.25 $\mu\text{mol/L}$ of each primer; traces 3 and 4) and ‘asymmetric’ PCR (primer ratios of 0.15:0.5 $\mu\text{mol/L}$, i.e. 1:3.3; traces 1, 2, 5, and 6) as described in the Methods section, with the excess of both Leiden-LCR (reverse, exR) or Leiden-LCF (forward, exF) primers and with both probe sets (sense probes: Leiden-5LC and 3LC; antisense probes: Leiden-5LC-comp and 3LC-comp). Melting curve analyses were carried out, and negative derivatives of changes in fluorescence intensities are illustrated as a function of temperature as automatically calculated by the LightCycler software. The highest melting peak was observed if the sense probe set was used in the presence of an excess of the reverse primer (trace 1). A smaller melting peak was recorded if the antisense probe set was used with an excess of the forward primer (trace 2). However, the opposite “unfavorable” primer and probe set combinations (traces 5 and 6) resulted in significantly decreased peak heights (both of these traces are represented by continuous lines and are indistinguishable). In cases of equal primer quantities, similarly decreased peak heights were observed with both probe sets (traces 3 and 4).

Barratt et al. [4] observed a “hook effect” in a herpes simplex virus genotyping system. This phenomenon can decrease fluorescence signal in the latest cycles and can also compromise genotyping and affect consistency during melting analysis. All problems caused by the “hook effect” were eliminated by AS-PCR, however, no details on exact concentrations and consequences were described. We also observed low signal intensities but without a “hook effect” (not shown).

None of the above studies focused specifically on the role of AS-PCR and approached this issue by designing an alternative probe set complementary to the opposite strand. Applying the complementary hybridization probe set in our FV Leiden model system gave the predicted result, namely, the opposite amplification primer ratio was necessary to achieve a similar response compared to the original probe set and amplification primer ratio (Fig. 2). We carried out AS-PCR with different amplification primer ratios in four in-house designed SNP detection systems, namely, FV Leiden, FII g.20210G>A, HFE H63D and BCRP Q141K (Fig. 1), and we observed similar trends in each system, indicating that the advantages of altered amplification primer ratios favoring the strand complementary to the hybridization probes are likely to be valid in several gene-environments.

In summary, our studies have demonstrated that (i) AS-PCR using excess amounts of amplification primers allowing the preferential synthesis of the strand complementary to the hybridization probes results in significant increases in fluorescence signal intensity and improves specificity during melting analyses; (ii) similar trends can be observed in each investigated SNP genotyping systems; (iii) this phenomenon can also be reproduced with opposite altered ratios if identical amplification primers and PCR conditions are used with novel hybridization probes annealing to the complementary strand; (iv) testing the role of altered amplification primer ratios should be an integral part of the optimization procedure of a newly developed in-house dual probe allelic-discrimination sys-

tem, especially if signal intensities are low or non-specific peaks are observed.

Acknowledgments

The authors thank Pfundt Antalné, Bakonyi Ildikó, Horváth Csongorné, and Szaver Gabriella for technical support. This work was partly supported by a grant from OTKA T034830. A.T. is a recipient of the “Bolyai János” fellowship.

References

- [1] Lyon E. Mutation detection using fluorescent hybridization probes and melting curve analysis. *Expert Rev Mol Diagn* 2001;1:92–101.
- [2] Lyon E, Millson A, Phan T, Wittwer CT. Detection and identification of base alterations within the region of factor V Leiden by fluorescent melting curves. *Mol Diagn* 1998;3:203–9.
- [3] Burggraf S, Kösel S, Lohmann S, Beck R, Olgemöller B. Unexplained DNA melting behavior in a genotyping assay. *Clin Chem* 2002;48:199–201.
- [4] Barratt K, Mackay JF. Improving real-time PCR genotyping assays by asymmetric amplification. *J Clin Microbiol* 2002;40:1571–2.
- [5] von Ahnen N, Schutz E, Armstrong VW, Oellerich M. Rapid detection of prothrombotic mutations of prothrombin (G20210A), factor V (G1691A), and methylenetetrahydrofolate reductase (C677T) by real-time fluorescence PCR with the LightCycler. *Clin Chem* 1999;45:694–6.
- [6] Bernard PS, Ajioka RS, Kushner JP, Wittwer CT. Homogeneous multiplex genotyping of hemochromatosis mutations with fluorescent hybridization probes. *Am J Pathol* 1998;153:1055–61.
- [7] Tag CG, Gressner AM, Weiskirchen R. An unusual melting curve profile in LightCycler multiplex genotyping of the hemochromatosis H63D/C282Y gene mutations. *Clin Biochem* 2001;34:511–5.
- [8] Honjo Y, Morisaki K, Huff LM, et al. Single-nucleotide polymorphism (SNP) analysis in the ABC half-transporter ABCG2 (MXR/BCRP/ABCP1). *Cancer Biol Ther* 2002;1:696–702.
- [9] Lay ML, Wittwer CT. Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR. *Clin Chem* 1997;43:2262–7.
- [10] Bernard PS, Pritham GH, Wittwer CT. Color multiplexing hybridization probes using the apolipoprotein E locus as a model system for genotyping. *Anal Biochem* 1999;273:221–8.

Original Paper

Cerebrovascular
DiseasesCerebrovasc Dis 2006;21:254–259
DOI: [10.1159/000091223](https://doi.org/10.1159/000091223)Received: July 25, 2005
Accepted: October 12, 2005
Published online: January 27, 2006

Decreased Frequencies of ABCA1 Polymorphisms R219K and V771M in Hungarian Patients with Cerebrovascular and Cardiovascular Diseases

Hajnalka Andrikovics^a Endre Pongrácz^b Ákos Kalina^c Anikó Szilvási^a
Charalampos Aslanidis^d Gerd Schmitz^d Attila Tordai^a^aDepartment of Molecular Genetics, National Medical Center, ^bNeurology Department, Central Hospital, Ministry of Interior, and ^cHospital of the National Railways, Budapest, Hungary; ^dInstitute for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University of Regensburg, Germany

Key Words

ABCA1 · Cardiovascular disease · Genetics · Polymorphisms · Risk factors · Stroke

Abstract

Background and Purpose: Genetic polymorphisms in ABC transporter A1 (ABCA1) may alter the regulation of plasma high-density lipoprotein (HDL), promoting or protecting from vascular diseases. **Methods:** We investigated 244 unrelated, consecutively enrolled patients with ischemic stroke, 150 patients with coronary heart disease (CHD) and 193 blood donors for allele frequencies (AFs) of three common ABCA1 polymorphisms (R219K, V771M and I883M). **Results:** Compared to controls (30.8 ± 4.7 and $4.9 \pm 2.2\%$, respectively), decreased AFs were found in both patient groups for R219K and V771M (28.7 ± 4.1 and $3.1 \pm 1.6\%$ in stroke, and $25.7 \pm 5.0\%$; $1.3 \pm 1.3\%$ in CHD patients, respectively). In a subset of stroke patients younger than 50, both variants occurred in significantly lower frequencies (22.4 ± 5.5 and $1.8 \pm 1.7\%$, respectively). Similarly, among CHD patients younger than 60, AFs of R219K and V771M (22.6 ± 7.5

and $0 \pm 1.6\%$, respectively) were decreased. V771M was almost exclusively (35/36) found in individuals carrying the R219K allele. **Conclusions:** Our data confirm earlier observations that ABCA1 R219K and V771M polymorphisms may be associated with a protective role against CHD and extend those to another important pathologic condition, namely stroke.

Copyright © 2006 S. Karger AG, Basel

Mutations in the ATP-binding cassette A1 (ABCA1) transporter gene have been found to be responsible for two forms of heritable high-density lipoprotein (HDL) disorders, namely Tangier disease and familial hypo- α -lipoproteinemia [1, 2]. In experimental systems, overexpression of the ABCA1 transporter results in elevated levels of plasma HDL [3, 4]. The putative role of ABCA1 is to facilitate the formation of HDL cholesterol by enhancing both the translocation of cholesterol and phospholipids to the plasma membrane and the stimulation of cholesterol efflux onto lipid-poor apolipoprotein AI particles thereby stimulating cholesterol delivery back to the liver [5–7].

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com© 2006 S. Karger AG, Basel
1015–9770/06/0214–0254\$23.50/0Accessible online at:
www.karger.com/cedAttila Tordai
Department of Molecular Genetics
National Medical Center, Diószegi út 64
HU–1113 Budapest (Hungary)
Tel./Fax +36 1 385 2255, E-Mail tordai@biomembrane.hu

To date, the ABCA1 gene proved to be highly polymorphic with large numbers of sequence variations leading to amino acid changes or affecting the putative promoter region [8] (see also <http://www.abca1mutants.all.at>).

Consequently, several studies addressed the question of the potential roles of these polymorphisms primarily in coronary heart disease (CHD) patients and in cases of altered lipid metabolism. The results still seem to be controversial with the identification of protective variants against CHD and the demonstration of strong linkage between some variants [9, 10] as well as with anti-atherogenic effects [11]. However, some studies find minor or no association of the same variants with the diseased phenotype or even risk factor effects, and population differences are also significant [12–16].

The aim of the current study was to examine the potential association between three well-studied coding sequence variants of the ABCA1 gene and common diseases potentially related to altered lipid metabolism. Besides testing a cohort of patients with cardiovascular patients, we sought to extend our observations to a previously unstudied pathology, namely cerebrovascular stroke.

Patients and Methods

Subjects

The control group consisted of 193 repeated voluntary blood donors (2–5 previous blood donations, 93 males and 100 females) with a mean age of 35.3 ± 11.8 years (range: 19–63 years). Blood donors were interviewed by a physician employee of the blood bank on each occasion to exclude major diseases in their previous history such as malignant disorders, infections, coronary heart disease or stroke.

244 unrelated patients (167 males and 77 females) with ischemic stroke were consecutively enrolled in the study between January 1, 1998, and November 30, 1999. The mean age at disease onset was 53.4 ± 14.5 years (range: 18–86 years). Ischemic stroke was characterized by computer tomography (CT), and the etiology was examined by carotis duplex scan (CDS). The severity of stroke varied from transient ischemic attack (78 patients) and persistent reversible ischemic neurological deficit (123 patients) to irreversible neurological defect (43 patients). Concomitant risk factors (such as hypertension, diabetes, smoking and alcohol abuse) were recorded in the stroke group. The prevalences of risk factors were the following: hypertension, 49.6% (121/244); diabetes, 12.3% (30/244); smoking, 53.5% (122/228), and increased alcohol intake, 19.7% (45/228).

150 patients (109 males and 41 females) with documented CHD were consecutively enrolled in the study between September 1, 1998, and October 30, 1999. The mean age at onset was 61.4 ± 9.3 years (range: 32–86 years). CHD patients suffered from angina pectoris ($n = 99$) or acute myocardial infarction ($n = 51$). Coronary angiography was performed in all CHD cases.

DNA Isolation and Detection of ABCA1 R219K, V771M and I883M Alleles with LightCycler Hybridization Probe Technique

DNA isolation was performed from anticoagulated peripheral blood with the standard ‘salting-out’ procedure. The following ABCA1 sequence variants were studied: R219K (exon 7, c.969A→G, substitution of Arg219 by Lys); V771M (exon 16, c.2624G→A, substitution of Val771 by Met), and I883M (exon 18, c.2962A→G, substitution of Ile883 by Met). Genotype analyses of the three genetic variants were performed using the LightCycler technology (Roche Diagnostics). Briefly, PCR was performed by rapid cycling in glass capillaries in a reaction volume of 20 μ l with 0.5 μ M of each unlabeled amplification primer, 0.4 μ M of anchor and detection probes and 50 ng genomic DNA. The amplification primers, the fluorescently labelled detection and anchor probes were newly designed and the sequences are available upon request. The LightCycler DNA Master Hybridization Probes kit (Roche Diagnostics) was used as reaction buffer, which contains nucleotides, Taq polymerase and Mg^{2+} . The final Mg^{2+} concentration was adjusted to 5 mM. Cycling conditions were identical for each variant: initial denaturation at 94°C for 2 min, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 10 s, annealing at 60°C for 10 s, and extension at 72°C for 15 s, with a ramping rate of 20°C/s. After amplification, melting curve analysis was performed by cooling the samples to 40°C, then gradually heating them to 80°C with a ramping rate of 0.2°C/s. The decline in fluorescence was continuously monitored. Melting curves were converted to melting peaks with wild-type and variant alleles showing distinct melting points. Genotyping was repeatedly carried out in cases of all variant genotypes and results were evaluated by two independent investigators.

Determinations of Lipid Parameters

Serum total cholesterol, HDL cholesterol (HDL-C) and triglyceride levels were measured by standard colorimetric techniques. LDL cholesterol (LDL-C) was calculated using the Friedewald formula if total cholesterol, triglyceride and HDL-C values were all available. Serum samples of blood donors were separated by centrifugation and stored at –70°C before the determination of lipid parameters. Serum triglyceride levels and LDL-C were not determined or calculated in the blood donor group, since fasting serum samples were not available.

Statistical Analyses

Allele frequencies (AFs, %) are presented with 95% confidence intervals (95% CI). Fisher's exact or χ^2 tests (univariate analyses) were used to compare the frequencies of ABCA1 genotypes between the blood donor and patient groups as preliminary analyses. Crude odds ratio (OR) and 95% CI were estimated for each ABCA1 single nucleotide polymorphism (SNP). Logistic regression was performed to adjust for age and sex. Adjusted OR values (and 95% CIs) were also calculated. Lipid parameters are presented as medians (25th–75th percentiles). The Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests were used to compare lipid values observed in wild-type, heterozygous and homozygous individuals. Control, stroke and CHD groups were analyzed separately as lipid values were measured in different centers. Analyses were conducted with the SPSS (version 12.0.1) software package. Testing for the presence of Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and pairwise linkage disequilibrium studies were performed by the Arlequin version 2.000 (<http://anthro.unige.ch/arlequin>) software.

Table 1. Genotyping results and statistical analyses for three common ABCA1 polymorphisms (R219K, V771M and I883M) in the control and patient groups

Polymorphism	AF % ($\pm$ 95% CI)	Heterozygous individuals n (%)	Homozygous individuals n (%)	p value	Adjusted OR (95% CI)
R219K					
Controls (n = 193)	30.8 (4.7)	73 (37.8)	23 (11.9)		
Patients with stroke (n = 244)	28.9 (4.1)	84 (34.1)	29 (11.8)	0.032	0.68 (0.48–0.97)
Patients with CHD (n = 150)	25.7 (5.0)	55 (36.7)	11 (7.3)	NS	NS
V771M					
Controls (n = 193)	4.9 (2.2)	19 (9.8)	0		
Patients with stroke (n = 244)	3.3 (1.6)	14 (5.7)	1 (0.4)	0.017	0.34 (0.14–0.82)
Patients with CHD (n = 150)	1.3 (1.3)	4 (2.7)	0	0.027	0.08 (0.01–0.75)
I883M					
Controls (n = 105)	12.4 (4.5)	24 (22.9)	1 (1.0)		
Patients with stroke (n = 244)	15.2 (3.2)	61 (24.8)	7 (2.9)	NS	NS
Patients with CHD (n = 150)	12.3 (3.8)	29 (19.3)	4 (2.6)	NS	NS

AF = Allele frequency; CI = confidence interval; NS = nonsignificant. Logistic regression was performed to adjust for age and sex; OR = odds ratio.

Results

Genotyping for R219K, V771M and I883M ABCA1 Allelic Variants

Using genomic DNA samples, simultaneous genotyping was carried out in the control blood donor and the stroke- and CHD-affected patient groups by PCR and fluorescent allelic discrimination techniques. The results are shown in table 1. In the control group, AF figures (30.8 ± 4.7 , 4.9 ± 2.2 and $12.4 \pm 4.5\%$) were found in the expected range for R219K, V771M and I883M, respectively. Decreased AFs were found in both patient groups for R219K and V771M variants (28.9 ± 4.1 and $3.3 \pm 1.6\%$ in stroke, and $25.7 \pm 5.0\%$ and $1.3 \pm 1.3\%$ in CHD, respectively). In the CHD group, the decrease in V771M AF was significant ($p = 0.009$) by univariate analyses. Moreover, upon stratification of the patient groups by age at onset, more pronounced decreases were observed (fig. 1). In a subset of stroke patients with disease onset before 50 ($n = 114$), both variants occurred in significantly lower frequencies compared to the control group [R219K: $22.4 \pm 5.5\%$, $p = 0.013$, crude OR = 0.55 (0.34–0.88); V771M: $1.8 \pm 1.7\%$, $p = 0.045$, crude OR = 0.33 (0.11–1.00)]. A similar tendency was observed in the CHD group in a subset of patients younger than 60 ($n = 62$) for R219K and V771M, but only the V771M AF decrease was significant [$22.6 \pm 3.6\%$, $p > 0.05$; and $0 \pm 1.6\%$, $p = 0.005$, crude OR = 0.07 (0.004–1.2)]. The AF of the third allelic variant, I883M, did not show significant dif-

ferences in the patient groups ($12.3 \pm 3.8\%$ in CHD and $15.2 \pm 3.2\%$ in stroke patients) and the subgroups of different ages at onset studied. Figure 1 further illustrates the tendency of R219K and V771M AF decreases following stratification of the patient groups by age at onset.

Multivariate analyses (logistic regression) also showed that the R219K and V771M variants are protective factors against stroke, independently from age and sex [R219K: $p = 0.032$, adjusted OR: 0.68 (0.48–0.97); V771M: $p = 0.017$, adjusted OR: 0.34 (0.14–0.82)]. In the CHD group, only V771M proved to be a significant independent protective factor [$p = 0.027$, adjusted OR: 0.08 (0.01–0.75), table 1].

As part of further subgroup analyses, patients with transient ischemic attack were omitted from the stroke group. Similarly to results of the entire stroke group, R219K AF reduction was $27.4 \pm 4.9\%$, $p = 0.015$, adjusted OR: 0.59 (0.39–0.91), and V771M AF reduction was $3.3 \pm 2.0\%$, $p = 0.042$, adjusted OR: 0.36 (0.13–0.97) compared to control. We also observed significant R219K and V771M AF reduction in patients with CT-proven ischemic stroke [$n = 124$; R219K: $24.6 \pm 5.5\%$, $p = 0.049$, adjusted OR: 0.64 (0.41–0.99), and V771M: $1.2 \pm 1.4\%$, $p = 0.021$, adjusted OR: 0.19 (0.05–0.78)] compared to control.

In order to test the potential role of concomitant diseases, coexistence logistic regression analyses were carried out in a subgroup of stroke patients without coexisting ischemic heart disease ($n = 207$, 84.8%). This analysis

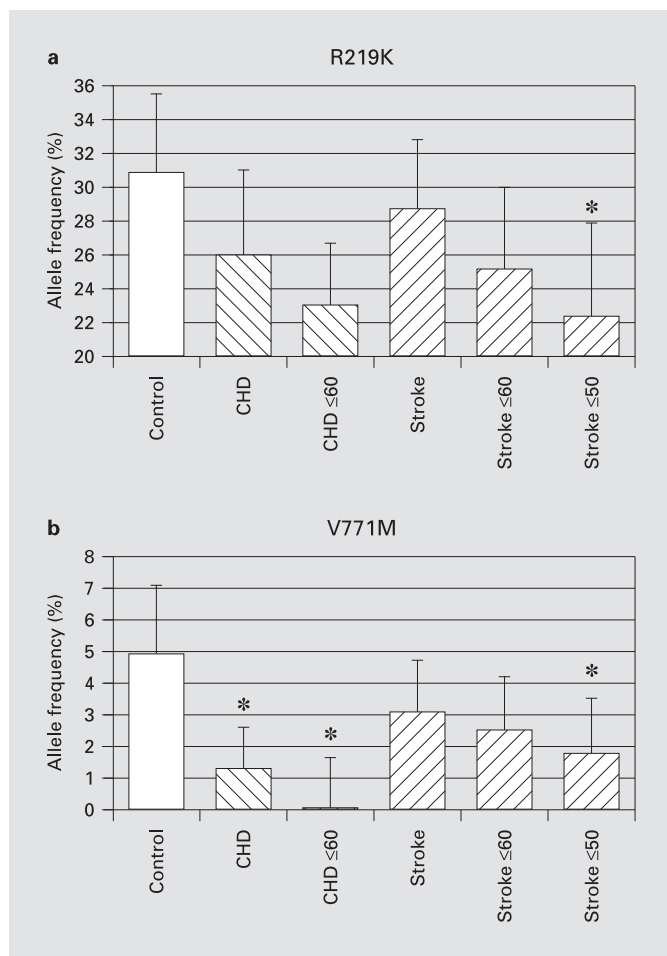


Fig. 1. Comparisons of AFs of the ABCA1 R219K and V771M variants in the control and patient groups. Genotyping was carried out as described in the Methods. AF values and 95% CIs (bars) are presented for the R219K (**a**) and V771M (**b**) variants. For both allelic variants, a tendency to AF decreases can be observed by comparing the control group (□) to patients with CHD (▨) and the subgroup of CHD patients with age at onset ≤60 years (CHD ≤60, n = 62). A similar tendency can be observed in the patient group with stroke (▩) as well as stroke subgroups [patients with age at onset ≤60 years (stroke ≤60, n = 161) and ≤50 years (stroke ≤50, n = 114)]. * p < 0.05 vs. controls.

showed that R219K and V771M variants also play a protective role against stroke independently from age and sex in the stroke patient subgroup without ischemic heart disease [R219K: p = 0.040, adjusted OR: 0.69 (0.48–0.98), and V771M: p = 0.034, adjusted OR: 0.39 (0.16–0.93)]. These results indicate that the protective role of R219K and V771M in the stroke group cannot be explained with the frequent coexistence of CHD.

According to CDS results, stroke patients were divided into three groups [negative CDS (n = 112), and positive CDS with less (n = 107) or more than 85% stenosis (n = 25)]. We did not find significant AF differences in ABCA1 SNPs in the above three groups. Patients were additionally stratified into two subgroups according to their risk status, e.g. hypertension, diabetes, smoking and alcohol intake. In the low-risk group, patients had zero to one risk factor (n = 146) and in the high-risk group more than one risk factors (n = 98). We observed lower R219K and V771M AFs in the low-risk group (R219K: 27.4 ± 5.2 vs. 30.6 ± 6.6%, and V771M: 2.1 ± 1.7 vs. 4.6 ± 3.0%, respectively), but the differences were not significant.

Analyses of HWE and Allelic Associations between Genetic Variants

Genotype distributions were examined for the fulfillment of the HWE in all groups for the three SNPs by the Arlequin software. With one exception, negative results (p > 0.05) were found in all groups for all three SNPs, i.e. the measured distribution of the three possible genotypes did not show significant differences from the expected values. However, the genotype distribution of R219K showed a significant (p = 0.00465) alteration from HWE exclusively in the stroke-affected patient group. Since the recent origin of this SNP and non-random mating can be fairly well excluded, this alteration may have been caused by a biased selection related to the disease phenotype [17].

Allelic associations between SNP pairs were tested by combining genotype results of the control and patient groups. The V771M allele was almost exclusively found in individuals carrying the R219K allele (36/37 V771M carriers were positive for R219K). Thus a strong linkage (p < 0.0005 by the Arlequin software) was observed between V771M and R219K. Moreover, a similar, non-random allelic association was observed between R219K and I883M variants (p < 0.05). Combining all genotyping results, 94/135 (69.6%) of I883M carriers were also positive for R219K, while only 148/374 (39.6%) of I883M wild-type individuals were positive for R219K. The distribution of double-positive (R219K and I883M carriers) and single-positive (only I883M carriers) individuals was similar in the control, in the stroke and in the CHD-affected groups. These results suggest that the R219K and I883M polymorphisms are also in linkage disequilibrium in our population, although the common occurrence of these variants in the same individual is not likely to be related to disease development. No significant linkage disequilibrium was observed between V771M and I883M.

Serum Lipid Determinations

In order to test important genotype-phenotype associations, plasma lipid profile determinations were carried out in subsets of the control ($n = 193$) and patient groups (stroke: $n = 113$; CHD: $n = 95$). The comparison of plasma lipid parameters and genotypic data revealed that none of the comparisons in the control or either patient group revealed any significant differences. However, V771M carriers of the stroke group ($n = 9$) had higher plasma HDL levels than non-carriers [$n = 104$; 1.00 (0.90 – 1.30) vs. 1.60 (1.05 – 1.80) mM; $p = 0.053$].

Discussion

SNPs are relatively common in the ABCA1 gene. Several polymorphic variations affecting the amino acid sequence have recently been published, and the AFs of 11 polymorphisms are $>1\%$ [8].

The most common missense polymorphism in the coding region of the ABCA1 gene is R219K with an AF of the K allele of 25–46% in the Caucasian population. Two large studies investigating 2,028 and 794 individuals came to contradictory conclusions about the possible role of R219K in arteriosclerosis. Brousseau et al. [15] reported an elevated R219K AF in patients with CHD and a low HDL level compared to disease-free individuals, suggesting that the mutant allele may cause a decrease in the HDL level, subsequently promoting arteriosclerosis and the development of CHD. In their study, no correlation between R219K genotypes and the plasma lipid parameters could be observed either in the control group (mean age: 53 years) or in the CHD patient group (mean age: 64 years). In another study, primarily focusing on ABCA1 haplotype analyses, R219K was also found to be associated with an increased risk for myocardial infarction [16]. In contrast, Clee et al. [9] found that R219K carrier patients have reduced severity of CHD, decreased focal and diffuse arteriosclerosis and fewer coronary events than wild-type CHD patients. They showed decreased triglyceride and increased HDL levels in their R219K carrier patients, although this difference existed only in the individuals younger than 57 years. They concluded that R219K alone is an independent protective factor against CHD. Further studies also described a putative protective effect of the R219K variant [18–20]. Our study showed results similar to those of Clee et al. [9]. Although we could only demonstrate significant AF decreases for the V771M variant comparing the entire CHD-affected group to the blood donor group, a trend toward an AF

decrease could be demonstrated for both SNPs in both patient groups. Moreover, the mean age of R219K homozygous and heterozygous patients with stroke was significantly higher than the age of R219K wild-type patients (58.2 ± 13.0 , 55.4 ± 13.8 vs. 51.2 ± 14.9 years, respectively). In our CHD patient group, the mean age of the patients with different R219K genotype did not differ significantly. However, upon subgroup analyses, among patients affected by both diseases with younger ages at onset, both variants R219K and V771M showed significantly decreased AFs (fig. 1).

Clee et al. [9] reported that the ABCA1 V771M variant also plays a protective role against CHD. They explained this observation with the linkage disequilibrium between the R219K and V771M variants. In our study, the V771M variant, or compound heterozygosity for V771M and R219K, showed significant AF reduction in the patient groups, in spite of the fact that our controls were relatively younger than our patients with stroke or CHD.

We found no correlation between ABCA1 I883M genotypes and CHD or stroke development. The data about this variant are controversial in the literature. Clee et al. [9] reported that I883M carrier patients have more severe manifestation of CHD. Wang et al. [10] found that I883M homozygotes had significantly higher plasma HDL cholesterol compared to heterozygous and wild-type individuals [10]. The differences between I883M genotypes might have remained hidden in the Hungarian population because of the low number of heterozygous and homozygous individuals.

Our data confirm earlier observations that ABCA1 R219K and V771M polymorphisms may play a protective role against CHD and extend those to another frequently occurring pathologic condition, namely stroke. These protective effects seem to be more pronounced in subsets of patients with younger ages, and haplotypes carrying both variants may have a stronger protective effect.

Acknowledgments

The authors thank Horváth Csongorné, Pfundt Antalné and Kovács Margit for technical support, and Füst György for statistical analyses. This work was partly supported by a grant from OTKA T034830. A.T. is a recipient of the ‘Bolyai János’ fellowship.

References

- ▶ 1 Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, Yu L, Brewer C, Collins JA, Molhuizen HO, Loubser O, Ouellette BF, Fichter K, Ashbourne-Excoffon KJ, Sensen CW, Scherer S, Mott S, Denis M, Martindale D, Frohlich J, Morgan K, Koop B, Pimstone S, Kastelein JJ, Hayden MR: Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet* 1999;22:336–345.
- ▶ 2 Bodzioch M, Orso E, Klucken J, Langmann T, Bottcher A, Diederich W, Drobnik W, Barlage S, Buchler C, Porsch-Ozcurumez M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe G, Aslanidis C, Lackner KJ, Schmitz G: The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet* 1999; 22:347–351.
- ▶ 3 Vaisman BL, Lambert G, Amar M, Joyce C, Ito T, Shamburek RD, Cain WJ, Fruchart-Najib J, Neufeld ED, Remaley AT, Brewer HB Jr, Santamarina-Fojo S: ABCA1 overexpression leads to hyperalphalipoproteinemia and increased biliary cholesterol excretion in transgenic mice. *J Clin Invest* 2001;108:303–309.
- ▶ 4 Singaraja RR, Bocher V, James ER, Clee SM, Zhang LH, Leavitt BR, Tan B, Brooks-Wilson A, Kwok A, Bissada N, Yang YZ, Liu G, Tafuri SR, Fievet C, Wellington CL, Staels B, Hayden MR: Human ABCA1 BAC transgenic mice show increased high density lipoprotein cholesterol and apoA1-dependent efflux stimulated by an internal promoter containing liver X receptor response elements in intron 1. *J Biol Chem* 2001;276:33969–33979.
- ▶ 5 Wang N, Silver DL, Thiele C, Tall AR: ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) functions as a cholesterol efflux regulatory protein. *J Biol Chem* 2001;276:23742–23747.
- ▶ 6 Oram JF, Vaughan AM: ABCA1-mediated transport of cellular cholesterol and phospholipids to HDL apolipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 2000;11:253–260.
- ▶ 7 Brewer HB Jr, Santamarina-Fojo S: Clinical significance of high-density lipoproteins and the development of atherosclerosis: focus on the role of the adenosine triphosphate-binding cassette protein A1 transporter. *Am J Cardiol* 2003;92:10K–16K.
- ▶ 8 Probst MC, Thumann H, Aslanidis C, Langmann T, Buechler C, Patsch W, Baralle FE, Dallinger-Thie GM, Geisel J, Keller C, Menys VC, Schmitz G: Screening for functional sequence variations and mutations in ABCA1. *Atherosclerosis* 2004;175:269–279.
- ▶ 9 Clee SM, Zwinderman AH, Engert JC, Zwarts KY, Molhuizen HO, Roomp K, Jukema JW, van Wijland M, van Dam M, Hudson TJ, Brooks-Wilson A, Genest J Jr, Kastelein JJ, Hayden MR: Common genetic variation in ABCA1 is associated with lipoprotein levels and a modified risk for coronary artery disease. *Circulation* 2001;103:1198–1205.
- ▶ 10 Wang J, Burnett JR, Near S, Young K, Zinman B, Hanley AJ, Connelly PW, Harris SB, Hegele RA: Common and rare ABCA1 variants affecting plasma HDL cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1983–1989.
- ▶ 11 Yamakawa-Kobayashi K, Yanagi H, Yu Y, Endo K, Arinami T, Hamaguchi H: Associations between serum high-density lipoprotein cholesterol or apolipoprotein AI levels and common genetic variants of the ABCA1 gene in Japanese school-aged children. *Metabolism* 2004;53:182–186.
- ▶ 12 Kakko S, Kelloniemi J, von Rohr P, Hoeschele I, Tamminen M, Brousseau ME, Kesaniemi YA, Savolainen MJ: ATP-binding cassette transporter A1 locus is not a major determinant of HDL-C levels in a population at high risk for coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2003;166:285–290.
- ▶ 13 Srinivasan SR, Li S, Chen W, Boerwinkle E, Berenson GS: R219K polymorphism of the ABCA1 gene and its modulation of the variations in serum high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides related to age and adiposity in white versus black young adults. The Bogalusa heart study. *Metabolism* 2003;52: 930–934.
- ▶ 14 Harada T, Imai Y, Nojiri T, Morita H, Hayashi D, Maemura K, Fukino K, Kawanami D, Nishimura G, Tsushima K, Monzen K, Yamazaki T, Mitsuyama S, Shintani T, Watanabe N, Seto K, Sugiyama T, Nakamura F, Ohno M, Hirata Y, Yamazaki T, Nagai R: A common Ile 823 Met variant of ATP-binding cassette transporter A1 gene (ABCA1) alters high density lipoprotein cholesterol level in Japanese population. *Atherosclerosis* 2003; 169:105–112.
- ▶ 15 Brousseau ME, Bodzioch M, Schaefer EJ, Goldkamp AL, Kielar D, Probst M, Ordovas JM, Aslanidis C, Lackner KJ, Bloomfield Rubins H, Collins D, Robins SJ, Wilson PW, Schmitz G: Common variants in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 in men with low HDL cholesterol levels and coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2001;154: 607–611.
- ▶ 16 Tregouet DA, Ricard S, Nicaud V, Arnould I, Soubigou S, Rosier M, Duverger N, Poirier O, Mace S, Kee F, Morrison C, Denefle P, Tiret L, Evans A, Deleuze JF, Cambien F: In-depth haplotype analysis of ABCA1 gene polymorphisms in relation to plasma ApoA1 levels and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:775–781.
- ▶ 17 Bardocz Z, Gyorffy B, Kocsis I, Vasarhelyi B: Re-calculated Hardy-Weinberg values in papers published in *Atherosclerosis* between 1995 and 2003. *Atherosclerosis* 2004;173: 141–143.
- ▶ 18 Evans D, Beil FU: The association of the R219K polymorphism in the ATP-binding cassette transporter 1 (ABCA1) gene with coronary heart disease and hyperlipidaemia. *J Mol Med* 2003;81:264–270.
- ▶ 19 Cenarro A, Artieda M, Castillo S, Mozas P, Reyes G, Tejedor D, Alonso R, Mata P, Pocovi M, Civeira F; Spanish FH group: A common variant in the ABCA1 gene is associated with a lower risk for premature coronary heart disease in familial hypercholesterolaemia. *J Med Genet* 2003;40:163–168.
- ▶ 20 Bertolini S, Pisciotto L, Di Scala L, Langheim S, Bellocchio A, Masturzo P, Cantafora A, Martini S, Averna M, Pes G, Stefanutti C, Calandra S: Genetic polymorphisms affecting the phenotypic expression of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2004;174:57–65.

Frequencies of Four ATP-Binding Cassette Transporter G8 Polymorphisms in Patients with Ischemic Vascular Diseases

Anikó Szilvási,¹ Hajnalka Andrikovics,¹ Endre Pongrácz,² Ákos Kalina,³
Zsolt Komlósi,⁴ Izabella Klein,⁵ and Attila Tordai¹

ATP-binding cassette transporter G8 (ABCG8) was found to participate in plant sterol and cholesterol (CHOL) transport; however, the potential associations of ABCG8 genetic variants and ischemic vascular diseases are largely unknown. Determinations of allele frequencies of four common ABCG8 polymorphisms (D19H, Y54C, T400K, and A632V) were carried out in 241 unrelated patients with ischemic stroke, 148 patients with coronary heart disease, and 191 blood donors (controls). Allele frequencies of the investigated polymorphisms in patient groups showed no significant differences compared with controls. There was a tendency toward reduced 54YY-genotype frequency among male patients with stroke. On stratification by age at disease onset, male patients with stroke under the age of 50 ($n=62$) showed significantly reduced 54YY-frequency compared with male controls ($n=92$; 24.2% vs. 41.3%; odds ratio: 0.45 [95% confidence intervals: 0.22–0.93]; $p=0.038$). No such associations were found among women. In healthy controls, CHOL levels of individuals with the 54YY genotype ($n=71$; median: 4.51 mM, 25th–75th percentiles: 4.19–5.43) were significantly reduced compared with 54YC and 54CC individuals combined ($n=120$; median: 4.95 mM, 25th–75th percentiles: 4.42–5.88, $p=0.009$). Further, we identified a new ABCG8-variant, T401S, in a control subject. In conclusion, ABCG8 54YY-genotype may be a potential protecting factor against ischemic stroke in young men and may influence plasma CHOL levels.

Introduction

ATP-BINDING CASSETTE TRANSPORTER G5 and G8 (ABCG5 and G8) are half-transporters, which together form a functional heterodimer (Graf *et al.*, 2002, 2003). They are localized at the apical membrane of the enterocytes and at the canalicular membrane in the liver and mediate the transport of plant sterols and cholesterol (CHOL) into the intestinal lumen and bile (Klett *et al.*, 2004). Mutations in either ABCG5 or G8 lead to elevated plasma concentration of plant sterols and cause sitosterolemia, a rare autosomal recessive disorder described by Bhattacharyya and Connor (1974), which can lead to premature atherosclerosis (Salen *et al.*, 1985). Beside these disease-associated mutations, several single nucleotide polymorphisms (SNPs) have also been identified (Berge *et al.*, 2002; Iida *et al.*, 2002). A number of these SNPs have been selected for human studies to reveal any possible phenotypic associations. In several Caucasian populations, five common

SNPs (Q604E in exon 13 of ABCG5; D19H, Y54C, T400K, and A632V in exons 1, 2, 8, and 13 in ABCG8, respectively) have been under intensive investigation and have been reported to influence the metabolism of plant sterols or CHOL (Weggemans *et al.*, 2002; Hubáček *et al.*, 2004; Kajinami *et al.*, 2004; Grünhage *et al.*, 2007; for review see, Rudkowska and Jones, 2008).

Several studies mention the increased risk of coronary heart disease (CHD) as a potential consequence of elevated plasma sterol levels believed to be affected by ABCG5/G8 SNPs, and one published study performed classical association in large patient cohorts with common ischemic vascular diseases (Koeijvoets *et al.*, 2009).

The aim of our study was to investigate the frequencies and potential association of the four most common SNPs of ABCG8 (D19H, Y54C, T400K, and A632V) in patients with stroke and CHD in comparison to healthy blood donors as controls.

¹Laboratory of Molecular Diagnostics, Hungarian National Blood Transfusion Service, Budapest, Hungary.

²Department of Neurology, National Health Center, Budapest, Hungary.

³Department of Cardiology, National Health Center, Outpatient Clinic, Budapest, Hungary.

⁴Department of Pulmonology, Semmelweis University, Budapest, Hungary.

⁵Institute of Enzymology, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary.

Materials and Methods

Subjects

Our study involved two cohorts of patients and one cohort of controls. In each cohort, subjects were recruited from the central part of Hungary and all subjects belonged to the Caucasian race.

In the first patient cohort, 241 unrelated patients (164 men and 77 women) with ischemic stroke were investigated. The mean age at disease onset was 53.4 ± 14.5 years (range: 18–86 years). Ischemic stroke was characterized by computed tomography, and the etiology was examined by carotis duplex scan (CDS). The severity of stroke varied from transient ischemic attack (TIA, 77 patients) and persistent reversible ischemic neurological deficit (121 patients) to irreversible neurological defect (43 patients). Concomitant risk factors (such as hypertension, diabetes, and smoking) were recorded. The prevalence values of risk factors were the following: hypertension, 49.0% (118/241); diabetes, 11.6% (28/241); and smoking, 53.5% (121/226).

In the second patient cohort, 148 patients (107 men and 41 women) with documented CHD were investigated. The mean age at onset was 61.4 ± 9.3 years (range: 32–86 years). Patients with CHD suffered from angina pectoris ($n = 99$) or acute myocardial infarction ($n = 51$). Coronary angiography was performed in all CHD cases.

The control group consisted of 191 repeated voluntary blood donors (2–5 previous blood donations, 92 men, and 99 women) with a mean age of 35.3 ± 11.8 years (range: 19–63 years). Blood donors were interviewed by a physician employee of the blood bank on each occasion to exclude major diseases in their previous history such as malignant disorders, infections, CHD, or stroke.

In a previous study, the same subjects were investigated for ABCA1 SNPs R219K and V771M, which were found to be protective factors against CHD and stroke (Andrikovics *et al.*, 2006). Our study was approved by the Institutional Ethics Committee.

DNA isolation and detection of ABCG8 D19H, Y54C, T400K, and A632V alleles with LightCycler hybridization probe technique

DNA isolation was performed from anticoagulated peripheral blood with the standard “salting-out” procedure. The following ABCG8 sequence variants were studied: D19H (rs11887534, exon 1, c.52G>C); Y54C (rs4148211, exon 2, c.161A>G), T400K (rs4148217, exon 8, c.1199C>A), and A632V (rs6544718, exon 13, c.1895C>T). Genotype analyses of the four genetic variants were performed using the LightCycler technology (Roche Diagnostics).

The amplification primers, the fluorescence labeled detection, and anchor probes were designed by the LightCycler Probe Design software (Roche Diagnostics), and all oligonucleotides were synthesized by Integrated DNA Technologies (Coralville). The sequences and conditions of optimized reactions are available on request.

Genotyping was repeatedly carried out in cases of all variant genotypes, and results were evaluated by two independent investigators.

Sequencing

Polymerase chain reaction (PCR) amplification of 50 ng whole genomic DNA was carried out in 30 cycles (94°C for 45 s; 60°C for 45 s; 72°C for 45 s) with 10 pmol of each primer and 2×PCR Master Mix (Promega). PCR products were purified

TABLE 1. GENOTYPING RESULTS FOR ATP-BINDING CASSETTE TRANSPORTER G8 SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (D19H, Y54C, T400K, AND A632V) IN THE CONTROL AND PATIENT GROUPS

Subjects	Controls n = 191	Stroke patients n = 241	CHD-patients n = 148	Total n = 580
D19H				
DD	173 (90.6)	220 (91.3)	132 (89.2)	525 (90.5)
DH	18 (9.4)	20 (8.3)	15 (10.1)	53 (9.1)
HH	0	1 (0.4)	1 (0.7)	2 (0.3)
AF (%) $\pm$ 95% CI	4.7 ± 2.2	4.6 ± 1.9	5.7 ± 2.7	4.9 ± 1.3
Y54C				
YY	71 (37.2)	80 (33.2)	58 (39.2)	209 (36.0)
YC	84 (44.0)	123 (51.0)	62 (41.9)	269 (46.4)
CC	36 (18.8)	38 (15.8)	28 (18.9)	102 (17.6)
AF (%) $\pm$ 95% CI	40.8 ± 5.0	41.3 ± 4.5	39.9 ± 5.7	40.8 ± 2.9
T400K				
TT	124 (64.9)	164 (68.0)	94 (63.5)	382 (65.9)
TK	62 (32.5)	67 (27.8)	51 (34.5)	180 (31.0)
KK	5 (2.6)	10 (4.1)	3 (2.0)	18 (3.1)
AF (%) $\pm$ 95% CI	18.8 ± 4.0	18.0 ± 3.5	19.3 ± 4.6	18.6 ± 2.3
A632V				
AA	119 (62.3)	156 (64.7)	94 (63.5)	369 (63.6)
AV	63 (33.0)	70 (29.0)	52 (35.1)	185 (31.9)
VV	9 (4.7)	15 (6.2)	2 (1.4)	26 (4.5)
AF (%) $\pm$ 95% CI	21.2 ± 4.2	20.7 ± 3.7	18.9 ± 4.6	20.4 ± 2.4

Values shown are number of cases and relative frequencies (%) in parentheses.

Allele frequencies (AF) are shown in percentages, with calculated $\pm$ 95% confidence intervals (CI).

CHD, coronary heart disease.

ABCG8 SNPS IN ISCHEMIC VASCULAR DISEASES

669

with the Montage PCR Kit (Millipore). The sequencing reaction of the PCR products was performed using the BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. For the second purification, Multiscreen-HV plates (Millipore) filled with Sephadex G-50 Superfine beads (Amersham Biosciences) were used. Automated capillary electrophoresis was performed on an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Determinations of lipid parameters

Serum total CHOL, high density lipoprotein (HDL), and triglyceride (TG) levels were measured by standard colorimetric techniques. Low density lipoprotein (LDL) was calculated using the Friedewald formula if total CHOL, TG, and HDL CHOL values were all available. Serum samples of blood donors were separated by centrifugation and stored at -70°C before the determination of lipid parameters. Serum TG levels and LDL CHOL were not determined or calculated in the blood donor group, as fasting serum samples were not available.

Statistical analyses

Allele frequencies (AFs, %) are presented with 95% confidence intervals (95% CI). Fisher's exact or χ^2 tests (univariate analyses) were used to compare the frequencies of ABCG8 genotypes between the blood donor and patient groups as preliminary analyses. Crude odds ratio and 95% CI were estimated for each ABCG8 SNP. Lipid parameters are presented as medians (25th–75th percentiles). The Mann–Whitney or Kruskal–Wallis tests were used to compare lipid values observed in groups of individuals with different genotypes (all lipid variables were abnormally distributed as tested by the Kolmogorov–Smirnov test). Control, stroke, and CHD groups were separately analyzed as lipid values were measured in different centers. Analyses were conducted with the SPSS (version 13.0) software package. Testing for the presence of Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) and linkage disequilibrium studies were performed by the SNPstats web tool (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>; Solé *et al.*, 2006). According to the general consensus, $p < 0.05$ was considered significant.

Results*Genotyping of four common allelic variants of ABCG8*

Using genomic DNA samples, simultaneous genotyping was carried out in the stroke- and CHD-affected patient groups as well as in the healthy control blood donor group by PCR and fluorescent allelic discrimination techniques. The results of genotyping are shown in Table 1. Numbers of cases with different genotypes, AF and CI values are given for the three investigated groups (stroke, CHD, and control) separately and as a combined group for each of the four SNPs. AFs of all four investigated ABCG8 SNPs in all investigated groups were in the range of previously published data on Caucasian populations (Gylling *et al.*, 2004; Hubáček *et al.*, 2004; Kajinami *et al.*, 2004; Plat *et al.*, 2005). There were no significant differences in AF values between the patient groups and controls.

TABLE 2. LINKAGE DISEQUILIBRIUM FOR FOUR LOCI OF ATP-BINDING CASSETTE TRANSPORTER G8

	Y54C	T400K	A632V
D19H	<0.0001 (0.035)	0.0510 (0.003)	0.0122 (0.005)
Y54C		<0.0001 (0.157)	0.6064 (<0.001)
T400K			<0.0001 (0.028)

Linkage disequilibrium was tested for four ABCG8 loci (D19H, Y54C, T400K, and A632V) by the SNPstats web tool. Values represent exact p -values for pairs of loci (and r^2 values in parentheses). Significant linkage disequilibrium ($p < 0.05$) was observed between neighboring loci and between D19H and A632V. Calculations were performed using the controls and the two patient groups combined as a single cohort ($n = 580$).

ABCG8, ATP-binding cassette transporter G8.

Analyses of HWE and linkage disequilibrium between ABCG8 genetic variants

Genotype distributions were examined for the fulfillment of the HWE in all groups for the four SNPs and no deviation was observed. Linkage disequilibrium was tested by SNPstats. Genetic association was revealed between the respective neighboring loci of the ABCG8 gene and between D19H and A632V (Table 2). Estimated haplotype frequencies were calculated for the control and the 2 patient groups separately and for the combined group ($n = 580$). These frequency values were very similar in all three groups, so only data for the combined group are shown in Table 3.

Subgroup analyses

No significant differences were found in AF values after stratification for sex in the patient and control groups. However, stratification based on age of disease onset revealed interesting differences regarding the Y54C SNP. In the group of male patients with stroke, a tendency was observed, in which the frequencies of the 54YY genotype were lower in patients

TABLE 3. ESTIMATED HAPLOTYPE FREQUENCIES FOR ATP-BINDING CASSETTE TRANSPORTER G8 SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS

Haplotype number	D19H	Y54C	T400K	A632V	Frequency
1	D	C	T	A	0.318
2	D	Y	T	A	0.267
3	D	Y	K	A	0.165
4	D	Y	T	V	0.100
5	D	C	T	V	0.090
6	H	Y	T	A	0.036
7	D	Y	K	V	0.012
8	H	Y	K	A	0.010
9	H	Y	T	V	0.003

Estimated haplotype frequencies for ABCG8 were calculated by SNPstats web tool. Nine haplotypes were determined and they are presented in decreasing order based on their relative frequencies. Letters represent single-letter amino acid codes for the four investigated genetic variants D19H, Y54C, T400K, and A632V (the less frequent [minor] alleles are indicated with boldface characters). Estimated haplotype frequency values are shown for the control and patient groups combined as a single cohort ($n = 580$), as comparisons between separate groups (control, stroke, and CHD) did not reveal significant differences (data not shown).

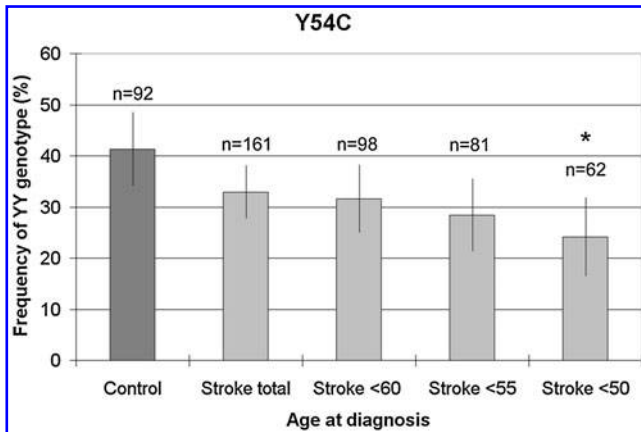


FIG. 1. Comparison of frequencies of 54YY genotype in the subgroups of male controls and male patients with stroke according to age at disease onset. Frequencies (%) of the 54YY genotypes and 95% confidence intervals (bars) are presented. There was a tendency toward decreased frequency of YY genotype among male patients with stroke with younger ages at diagnoses. The frequency of the YY genotype among patients with stroke diagnosed at age under 50 ($n=62$) compared with male controls ($n=92$) was significantly different ($p=0.038$) as marked with an asterisk.

diagnosed in younger ages compared with male controls. As shown in Figure 1, among patients diagnosed under the age of 50 ($n=62$), the frequency of the 54YY genotype was significantly reduced compared with the male control group ($n=92$) with 24.2% versus 41.3%; odds ratio: 0.45 (95% CI: 0.22–0.93); $p=0.038$. No significant differences were observed between intermediate age groups of patients with stroke and the control group. A similar tendency, for example, decreases of YY genotype frequency was not observed either among subgroups of female patients with stroke according to age at diagnosis or among patients with CHD (data not shown). Significant differences were found only when comparing the frequencies of 54YY genotype, whereas comparing AFs of the other three investigated SNPs in subsets of patients based on age of diagnosis did not reveal differences.

In the case of patients with stroke, several further stratifications were made based on the presence or absence of some disease characteristics, such as the presence or absence of TIA and coexisting ischemic heart disease. In addition, patients

with stroke were divided into three groups according to carotis duplex scan results (1: negative, 2: up to 85%, or 3: >85% reduction of carotis artery-diameter) as well as three arbitrary defined risk groups based on the number of known risk factors (hypertension, diabetes mellitus, and smoking). None of the four ABCG8 variants showed altered AFs according to any of the subgroups just mentioned.

Serum lipid determinations

To test important genotype-phenotype associations, plasma lipid profile values were compared with genotypes. In the control group ($n=191$), CHOL and HDL, whereas in subsets of patient groups (stroke: $n=111$; CHD: $n=95$), CHOL, LDL, HDL, and TG levels were compared with different genotypes of ABCG8 SNPs. The comparison of plasma lipid parameters and genotypic data using the Kruskal–Wallis test revealed significant differences ($p=0.018$) between Y54C genotypes and blood CHOL levels in the control group. Analyzing the three genotypes separately, cases with the 54YY genotype had the lowest CHOL levels, whereas those with the 54CC genotype had the highest CHOL levels, with the heterozygous individuals having intermediate values (Table 4). On comparison of the 54YY homozygous cases ($n=71$; median: 4.51 mM, 25th–75th percentiles: 4.19–5.43) with the combined group of the other two genotypes (YC and CC; $n=120$; median 4.95 [25th–75th percentiles 4.42–5.88] mM) by using Mann–Whitney test, a significant difference was observed ($p=0.009$). Multinomial logistic regression analyses revealed significant differences in CHOL levels between patients carrying the 54YY genotype compared with 54YC or 54CC genotype after adjustment by age and sex ($p=0.043$ and $p=0.006$, respectively), indicating the importance of YY homozygosity for the effect. Control individuals with the second and third most frequent haplotypes (both with 54Y allele) had significantly lower CHOL levels compared with the most frequent haplotype (containing 54C). After adjustment with age and sex, reduced CHOL levels were also detected, but this association was not significant. Surprisingly, similar differences were not found in either patient group (data not shown). Moreover, no differences were found on comparison of LDL and HDL cholesterol levels between the above groups and subgroups (not shown).

New ABCG8 variant

The allele discrimination technique based on the melting curve analysis of fluorescent labeled probes and the amplified DNA allows the detection of additional genetic variants affecting the flanking regions of the SNP under study, if they are located within the recognition sequence of the sensor probe. During our serial analyses for the T400K variant, we repeatedly observed an unusual melting curve for one particular DNA sample. Sequencing revealed a new, nonsynonymous genetic variant: T401S (c.1201A>T), in exon 8 of ABCG8. This case was excluded from our study population.

Discussion

Several studies investigated the associations between ABCG8 SNPs and different parameters of lipid metabolism or clinical disorders. Studies investigating populations different in ethnic background, sex, or health status revealed associa-

TABLE 4. CHOLESTEROL LEVELS OF THE CONTROL BLOOD DONORS ACCORDING TO Y54C GENOTYPES

Y54C genotype	Number of cases	Cholesterol level (mM)		
		25th percentile	Median	75th percentile
YY	71	4.19	4.51	5.43
YC	84	4.32	4.95	5.82
CC	36	4.53	4.98	6.31

The comparison of plasma cholesterol levels between subgroups of controls based on Y54C genotypes using the Kruskal–Wallis test revealed significant differences ($p=0.018$). Blood donors with the YY54 genotype had the lowest cholesterol levels, whereas those with the 54CC genotype had the highest cholesterol levels, with the heterozygous individuals having intermediate values.

ABCG8 SNPS IN ISCHEMIC VASCULAR DISEASES

671

tion with different SNPs (see review of Rudkowska and Jones, 2008), suggesting that there is no single SNP or haplotype which could contribute to alterations of the transporter activity in itself. Besides these SNP-association studies, two recent genome-wide association studies supported the importance of ABCG5 and ABCG8 loci in lipid metabolism, revealing associations of lipid levels and CHD risk with ABCG5 (Aulchenko *et al.*, 2009) and contribution of ABCG8 to polygenic dyslipidemia (Kathiresan *et al.*, 2009).

We aimed at investigating the AFs of the four most investigated base substitutions of ABCG8 (D19H, Y54C, T400K, and A632V) in groups of subjects with stroke or CHD in comparison to healthy controls. There were no significant differences between patient (stroke and CHD) and control groups, according to AF values. In subsequent subgroup analyses, we failed to reveal any association between AFs and subgroups based on sex (in stroke, CHD, or control group), existence of TIA, coexisting ischemic heart disease, computed tomography positivity, CDS results, or arbitrary defined risk groups (in the stroke group). The above results suggest that disease severity is not affected by the investigated ABCG8 SNPs.

However, a tendency of decreasing frequencies of 54YY genotype was noted among male patients in whom stroke was diagnosed in younger ages (see Fig. 1). Comparing the male patients in whom stroke was diagnosed under the age of 50 with the male control group, the frequency of the 54YY genotype was significantly reduced (see Fig. 1), thus suggesting a protective effect against stroke. Comparing AFs instead of YY genotype frequency did not show significant differences, suggesting that the YY genotype in homozygous form is necessary for protection against stroke in young men.

In the control group (women and men together), CHOL level of individuals showed increases in the order of genotype 54YY, 54YC, and 54CC ($p = 0.018$). However, we did not find such an association among either patient group, which can be explained by the potential effects of other factors or medications influencing serum CHOL levels.

Koeijvoets *et al.* (2009), performed similar SNP-disease association studies on a large cohort of subjects with familial hypercholesterolemia ($n = 2012$) containing 648 subjects with cardiovascular events (553 subjects with CHD, 58 subjects with peripheral artery disease, and 37 subjects with cerebral artery disease). They investigated two of the four SNPs investigated in our study, namely D19H and T400K. There was no association of SNPs within the total cardiovascular disease group ($n = 648$). The D19H SNP was associated with increased risk of CHD, but only after adjustment for year of birth, sex, smoking, diabetes, HDL-C, and TG levels in multiple Cox regression analyses. Our study could not confirm this association, which can be due to a lower case number in our CHD group ($n = 148$ vs. 648). However, Y54C was not investigated in the above publication. The first study, which revealed association between Y54C and lipid metabolism, investigated alteration in plasma lipid levels after an 8-year period; whereas dietary habits changed (Hubacek *et al.*, 2001). Female subjects with 54YY genotype had a marked decrease in CHOL and LDL levels, whereas heterozygotes had intermediate decrease in such lipid levels. These subjects were considered to be "high responder" to dietary changes (Hubacek *et al.*, 2001). Another publication revealed association between Y54C and changes in CHOL metabolism after weight

loss in female cases (men were not investigated) (Santosa *et al.*, 2007).

A more recent study revealed associations between ABCG8 SNPs and lipid levels, in which lower HDL concentrations were observed in subjects with 54CC or 54YC compared with subjects with the 54YY genotype (Junyent *et al.*, 2009). A higher level of HDL has a protecting effect against ischemic stroke (Emerging Risk Factors Collaboration, *et al.* 2009). In our study, we were unable to confirm the direct association between 54YY genotype and elevated HDL level (potentially due to the low case number), but we observed a protective effect of the 54YY genotype against stroke for which one potential mechanism may be the elevation of the HDL level in 54YY individuals. Our results are in agreement with a recently revealed Y54C-lipid association; that is, 54CC homozygous cases showed elevated CHOL and LDL levels in healthy individuals (Abellán *et al.*, 2010).

Since the 54Y allele seemed to be protective against stroke in young men and was associated with lower CHOL levels in controls, we suggest that the ABCG8 transporter containing the 54Y variant might have a higher transport activity than the protein with the C allele.

Interestingly, the protecting effect of 54YY allele could be detected only in men, but not in female cases, which can be due to the lower case number in our female stroke group compared with the male stroke group ($n = 77$ vs. 164). However, observation of a sex-specific effect of ABCG8 SNPs is not a unique phenomenon. In a Czech population study, association between Y54C genotypes and lipid levels were described in female cases only, whereas T400K genotypes were associated with lipid levels only in men (Hubacek *et al.*, 2001). In another study, carriers of the K variant at the T400K locus had elevated risk for gallstone disease, lower TG, and biliary phospholipid levels only in men but not in women (Wang *et al.*, 2007).

Linkage analysis revealed genetic linkage between the investigated loci of ABCG8, which is in concordance with published data, as different studies revealed linkage between different loci of ABCG5 and G8 (Berge *et al.*, 2002; Gylling *et al.*, 2004; Kajinami *et al.*, 2004; Plat *et al.*, 2005). On calculating estimated haplotype frequencies, we observed very similar results to those published elsewhere (Berge *et al.*, 2002; Gylling *et al.*, 2004), that is, the three most frequent haplotypes together accounted for 75% of all haplotypes. We could not identify any haplotype that would be over- or underrepresented in any of the patient groups compared with the control group.

Finally, we identified a novel G8 variant, T401S. This variant seemed to be a unique variant, as only 1 out of 581 samples carried this genotype. Putting together the results of melting curve analyses and sequencing, we conclude that this subject is a compound heterozygote for the T400K and T401S variants. This healthy female blood donor had normal lipid parameters (CHOL, 4.23 mM; HDL, 1.1 mM).

In conclusion, our study provides data of the frequencies and distributions of ABCG8 variants in patients with ischemic vascular disease. ABCG8 54Y allele was associated with lower CHOL level in a healthy Hungarian population, whereas the same allele in homozygous form seemed to be a protecting factor against stroke in young men. Further studies are needed to confirm our findings in other populations.

Acknowledgments

We thank Horvath Csongorne and Pfundt Julia for technical assistance. H.A. and A.T. were supported by OTKA (K69102), the Ministry of Health (ETT 05-401/2009), KMOP 1.1.2-07/1-2008-0003, and "Vérsejt Alapítvány."

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Abellán R, Mansego ML, Martínez-Hervás S, *et al.* (2010) Association of selected ABC gene family single nucleotide polymorphisms with postprandial lipoproteins: results from the population-based Horteiga study. *Atherosclerosis* 211: 203–209.
- Andrikovics H, Pongrácz E, Kalina E, *et al.* (2006) Decreased frequencies of ABCA1 polymorphisms R219K and V771M in Hungarian patients with cerebrovascular and cardiovascular diseases. *Cerebrovasc Dis* 21:254–259.
- Aulchenko YS, Ripatti S, Lindqvist I, *et al.* (2009) Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts. *Nat Genet* 41:47–55.
- Berge KE, von Bergmann K, Lutjohann D, *et al.* (2002) Heritability of plasma noncholesterol sterols and relationship to DNA sequence polymorphism in ABCG5 and ABCG8. *J Lipid Res* 43:486–494.
- Bhattacharyya AK, Connor WE (1974) Beta-sitosterolemia and xanthomatosis. A newly described lipid storage disease in two sisters. *J Clin Invest* 53:1033–1043.
- Emerging Risk Factors Collaboration, Di Angelantonio E, Sarwar N, *et al.* (2009) Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA* 302:1993–2000.
- Graf GA, Li WP, Gerard RD, *et al.* (2002) Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface. *J Clin Invest* 110:659–669.
- Graf GA, Yu L, Li WP, *et al.* (2003) ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. *J Biol Chem* 278:48275–48282.
- Grünhage F, Acalovschi M, Tirziu S, *et al.* (2007) Increased gallstone risk in humans conferred by common variant of hepatic ATP-binding cassette transporter for cholesterol. *Hepatology* 46:793–801.
- Gylling H, Hallikainen M, Pihlajamäki J, *et al.* (2004) Polymorphisms in the ABCG5 and ABCG8 genes associate with cholesterol absorption and insulin sensitivity. *J Lipid Res* 45:1660–1665.
- Hubacek JA, Berge KE, Cohen JC, *et al.* (2001) Mutations in ATP-cassette binding proteins G5 (ABCG5) and G8 (ABCG8) causing sitosterolemia. *Hum Mutat* 18:359–360.
- Hubáček JA, Berge KE, Stefková J, *et al.* (2004) Polymorphisms in ABCG5 and ABCG8 transporters and plasma cholesterol levels. *Physiol Res* 53:395–401.
- Iida A, Saito S, Sekine A, *et al.* (2002) Catalog of 605 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) among 13 genes encoding human ATP-binding cassette transporters: ABCA4, ABCA7, ABCA8, ABCD1, ABCD3, ABCD4, ABCE1, ABCF1, ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5, and ABCG8. *J Hum Genet* 47:285–310.
- Junyent M, Tucker KL, Smith CE, *et al.* (2009) The effects of ABCG5/G8 polymorphisms on plasma HDL cholesterol concentrations depend on smoking habit in the Boston Puerto Rican Health Study. *J Lipid Res* 50:565–573.
- Kajinami K, Brousseau ME, Nartsupha C, *et al.* (2004) ATP binding cassette transporter G5 and G8 genotypes and plasma lipoprotein levels before and after treatment with atorvastatin. *J Lipid Res* 45:653–656.
- Kathiresan S, Willer CJ, Peloso GM, *et al.* (2009) Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat Genet* 41:56–65.
- Klett EL, Lee MH, Adams DB, *et al.* (2004) Localization of ABCG5 and ABCG8 proteins in human liver, gall bladder and intestine. *BMC Gastroenterol* 4:21.
- Koeijvoets KC, van der Net JB, Dallinga-Thie GM, *et al.* (2009) ABCG8 gene polymorphisms, plasma cholesterol concentrations, and risk of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 204:453–458.
- Plat J, Bragt MC, Mensink RP (2005) Common sequence variations in ABCG8 are related to plant sterol metabolism in healthy volunteers. *J Lipid Res* 46:68–75.
- Rudkowska I, Jones PJ (2008) Polymorphisms in ABCG5/G8 transporters linked to hypercholesterolemia and gallstone disease. *Nutr Rev* 66:343–348.
- Salen G, Horak I, Rothkopf M, *et al.* (1985) Lethal atherosclerosis associated with abnormal plasma and tissue sterol composition in sitosterolemia with xanthomatosis. *J Lipid Res* 26:1126–1133.
- Santosa S, Demonty I, Lichtenstein AH, *et al.* (2007) Single nucleotide polymorphisms in ABCG5 and ABCG8 are associated with changes in cholesterol metabolism during weight loss. *J Lipid Res* 48:2607–2613.
- Solé X, Guinó E, Valls J, *et al.* (2006) SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 22:1928–1929.
- Wang Y, Jiang ZY, Fei J, *et al.* (2007) ATP binding cassette G8 T400K polymorphism may affect the risk of gallstone disease among Chinese males. *Clin Chim Acta* 384:80–85.
- Weggemans RM, Zock PL, Tai ES, *et al.* (2002) ATP binding cassette G5 C1950G polymorphism may affect blood cholesterol concentrations in humans. *Clin Genet* 62:226–229.

Address correspondence to:

Attila Tordai M.D., Ph.D.

Laboratory of Molecular Diagnostics
Hungarian National Blood Transfusion Service

Karolina st. 19-21

Budapest 1113

Hungary

E-mail: tordai@kkk.org.hu