

# **A kardiovaszkuláris rizikó és a *C4B* gén hiányos haplotípusok közötti kapcsolat mechanizmusának vizsgálata**

Doktori értekezés

**Bánlaki Zsófia**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Prof. Füst György

Hivatalos bírálók: Dr. Papp Krisztián  
Dr. Pós Zoltán

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Ligeti Erzsébet

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Vásárhelyi Barna  
Dr. Prechl József

Budapest  
2012

## TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....	4
1 IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	7
1.1 AZ MHC RÉGIÓ ÉS A NÉVADÓ FEHÉRJÉK.....	7
1.1.1 <i>A régió jellemzői</i> .....	7
1.1.2 <i>A klasszikus MHC molekulák</i> .....	8
1.1.3 <i>Az MHC fehérjéket kódoló gének nomenklatúrája</i> .....	10
1.1.4 <i>Az MHC régió egyéb, az immunrendszer működését szabályozó génjei</i> .....	11
1.2 ŐSI MHC HAPLOTÍPUSOK.....	12
1.2.1 <i>Az ősi haplotípus fogalma</i> .....	12
1.2.2 <i>Ősi MHC haplotípusok és különböző kórképek kapcsolata</i> .....	13
1.2.3 <i>A tagSNP fogalma</i> .....	14
1.3 AZ RCCX MODULÁRIS STRUKTÚRA.....	14
1.3.1 <i>Az RCCX szerkezet felépítése, alkotói</i> .....	14
1.3.2 <i>Egyenlően átkezesztődések az RCCX struktúrán belül</i> .....	16
1.3.3 <i>RCCX szerkezeti variációk</i> .....	17
1.4 A 4-ES KOMPLEMENT KOMPONENS .....	17
1.4.1 <i>A C4 fehérje és funkciója</i> .....	17
1.4.2 <i>A C4 gén és fehérje variációi</i> .....	19
1.4.3 <i>C4 hiányos egyének</i> .....	20
1.4.4 <i>C4A*Q0 haplotípusok</i> .....	20
1.4.5 <i>C4B*Q0 haplotípusok</i> .....	21
1.5 A 21-HIDROXILÁZ ENZIM.....	22
1.5.1 <i>A 21-hidroxiláz enzim működése</i> .....	22
1.5.2 <i>A CYP21 aktív- és pszeudogén</i> .....	23
1.5.3 <i>A CYP21A2 gén szabályozó régiói</i> .....	24
1.5.4 <i>A hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely</i> .....	24
1.5.5 <i>A HPA tengely és a stresszválasz kapcsolata</i> .....	25
1.5.6 <i>21-hidroxiláz hiányos állapotok</i> .....	26
1.5.7 <i>A 21-hidroxiláz és a kardiovaszkuláris rendszer</i> .....	27
2 CÉLKITŰZÉSEK.....	28
3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	29
3.1 VIZSGÁLT SZEMÉLYEK .....	29
3.1.1 <i>Az MHC haplotípusok és RCCX szerkezetek felméréséhez gyűjtött minták</i> .....	29
3.1.2 <i>A C4A és a C4B gének 35. intronbeli szekvenciájának összehasonlításához válogatott minták</i> .....	29
3.1.3 <i>A C4B*Q0 hordozás és a szteroid hormonszintek kapcsolatának vizsgálata során analizált minták</i> .....	30
3.2 DNS IZOLÁLÁS .....	30
3.3 GENETIKAI ANALÍZISEK .....	31
3.3.1 <i>HLA-tipizálás</i> .....	31
3.3.2 <i>SNP detektálás restriktions fragmenthossz polimorfizmus (RFLP) technikával</i> .....	31
3.3.3 <i>SNP meghatározás TaqMan technikával</i> .....	33
3.3.4 <i>Génkópia-szám mérések</i> .....	33
3.3.5 <i>Allélspecifikus long PCR reakciók</i> .....	35
3.3.6 <i>A C4 gén 35. intronjának szekvenálása</i> .....	37
3.4 A SZTEROID HORMONOK KONCENTRÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA .....	38
3.4.1 <i>Nyugalmi hormonszint meghatározások</i> .....	38
3.4.2 <i>ACTH stimuláció és dexametazon teszt</i> .....	38
3.5 STATISZTIKAI ELEMZÉS.....	38
3.5.1 <i>A magyarországi MHC haplotípusok és RCCX szerkezetek elemzése</i> .....	38

	3.5.2	<i>A C4B*Q0 hordozás és a szteroid hormonszintek kapcsolatának vizsgálata ...</i>	39
4		EREDMÉNYEK.....	40
	4.1	MHC HAPLOTÍPUSOK ÉS A C4B*Q0 HORDOZÁS.....	40
	4.1.1	<i>A vizsgált SNP-k allélfrekvenciái .....</i>	41
	4.1.2	<i>A vizsgált haplotípusok és összeillesztésük .....</i>	41
	4.1.3	<i>A hazai kaukázusi populációban előforduló MHC haplotípusok.....</i>	43
	4.1.4	<i>C4B gén hiányos MHC haplotípusok az egészséges kaukázusi populációban..</i>	45
	4.1.5	<i>A mintavételezés validálása .....</i>	47
	4.2	AZ RCCX MODULÁRIS SZERKEZET VARIÁCIÓI .....	50
	4.2.1	<i>C4 és CYP21 gének az egészséges kaukázusi populációban.....</i>	51
	4.2.2	<i>A kaukázusi populációban előforduló RCCX szerkezeti variánsok.....</i>	52
	4.2.3	<i>C4B gén hiányos RCCX szerkezeti variánsok .....</i>	54
	4.3	A C4 GÉNEK 35. INTRONJÁBAN TALÁLHATÓ TRANSZKRIPCIÓS FAKTOR KÖTŐHELY VIZSGÁLATA .....	54
	4.3.1	<i>A C4A és C4B gének 35. intronbeli bázissorrendjének összehasonlítása .....</i>	55
	4.4	A SZTEROID BIOSZINTÉZIS ÉS A C4B*Q0 HORDOZÁS .....	56
	4.4.1	<i>A C4B*Q0 hordozás összefüggése a nyugalmi hormonszintekkel .....</i>	56
	4.4.2	<i>ACTH stimuláció utáni kortikoszteroid szintek és a C4B géndózis.....</i>	57
	4.4.3	<i>Homozigóta C4B*Q0 hordozók hormonszintjei.....</i>	61
	4.4.4	<i>Dexametazon beadást követő kortikoszteroid szintek és a C4B géndózis .....</i>	62
5		MEGBESZÉLÉS .....	64
	5.1	MHC HAPLOTÍPUSOK ÉS RCCX STRUKTÚRÁK.....	64
	5.1.1	<i>Az egészséges kaukázusiak MHC haplotípusai és a C4B*Q0 hordozás .....</i>	64
	5.1.2	<i>MHC haplotípusok előfordulása különböző kaukázusi populációkban .....</i>	67
	5.1.3	<i>Az RCCX szerkezet variációi és a C4B gén hiánya.....</i>	68
	5.2	A C4 ÉS A CYP21 GÉNEK KAPCSOLATA.....	70
	5.2.1	<i>A C4 gének 35. intronjában található regulációs szekvenciák vizsgálata .....</i>	70
	5.2.2	<i>A szteroid bioszintézis és a C4B*Q0 haplotípusok kapcsolata .....</i>	72
6		ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK, KÖVETKEZTETÉSEK.....	76
7		ÖSSZEFOGLALÁS .....	78
8		SUMMARY .....	79
9		HIVATKOZÁSOK.....	80
10		SAJÁT PUBLIKÁCIÓK.....	89
11		KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	90

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACTH: adrenokortikotrop hormon

AGER: /advanced glycation endproducts receptor/ késői glikációs végtermékek receptora

AVP: arginin-vazopresszin

AH: /ancestral haplotype/ ősi haplotípus

C4: 4-es komplement komponens

*C4A* és *C4A*: A izotípusú C4 fehérje és génje

*C4B* és *C4B*: B izotípusú C4 fehérje és génje

*C4L*: HERV-K(C4) szekvenciát tartalmazó (hosszú) *C4* gén

*C4S*: HERV-K(C4) szekvenciát nem tartalmazó (rövid) *C4* gén

*C4A*\*Q0: *C4A* gén hiányos haplotípus

*C4B*\*Q0: *C4B* gén hiányos haplotípus

CAH: congenitalis adrenalis hyperplasia

CEH: /conserved extended haplotype/ konzervált kiterjesztett haplotípus

CFB: /complement factor B/ B faktor

cM: centiMorgan

CR1: 1-es típusú komplementreceptor

CRH: /corticotropin-releasing hormone/ kortikotropin felszabadító hormon

CYP21: 21-hidroxiláz

*CYP21A1P*: 21-hidroxiláz pszeudogén

*CYP21A2*: 21-hidroxiláz aktív gén

DNS: deoxiribonukleinsav

dNTP: deoxi-nukleozid-triszfoszfát

FAM: 520 nm hullámhosszon emittáló fluorofór

HERV: humán endogén retrovírus

HLA: humán leukocita antigén

HPA (-tengely): /hypothalamic-pituitary-adrenal/ hypothalamus-hypophysis-mellékvese

HSP: /heat shock protein/ hő sokkfehérje

IHWG: International Histocompatibility Workgroup

IL: interleukin

kb: kilobázis  
LD: /linkage disequilibrium/ kapcsoltsági egyensúlytalanság  
LPS: lipopoliszacharid  
LTA: limfotoxin- $\alpha$   
MASP: mannóz asszociált szerin proteáz  
Mb: megabázis  
MBL: /mannose binding lectin/ mannózkötő lektin  
MHC: /major histocompatibility complex/ fő szövet-összeférhetőségi komplex  
MR: mineralokortikoid receptor  
NK-sejt: /natural killer sejt/ természetes ölösejt  
NKT-sejt: /natural killer T-sejt/ természetes ölö T-sejt  
NF-W2: nukleáris faktor W2  
OR: /odds ratio/ esélyhányados  
PCR: /polymerase chain reaction/ polimeráz láncreakció  
RCCX modul: RP-C4-CYP21-TNX génekből álló modul  
RIA: radioimmunesszé  
RFLP: /restriction fragment length polymorphism/ restrikciós fragmenthossz polimorfizmus  
RNS: ribonukleinsav  
    mRNS: messenger RNS  
ROC (-analízis): /receiver operating characteristics/ vevő működési karakterisztikája  
RP: ld. STK19  
RS szám: referencia SNP szám  
SDS: /sodium-dodecyl-sulphate/ nátrium-dodecil-szulfát  
SLE: szisztémás lupus erythematosus  
SF-1: szteroidogén faktor 1  
SNP: /single nucleotide polymorphism/ egyponos nukleotid polimorfizmus  
SSO: szekvencia-specifikus oligonukleotid  
SSP: szekvencia-specifikus primer  
STK19 (korábban RP): nukleáris szerin-protein kináz  
SV: /simple virilizing/ a CAH egyszerű virilizáló formája  
SW: /salt wasting/ a CAH sóvesztő formája

TNF: tumornekrózis-faktor

TNX: tenascin-X extracelluláris mátrixfehérje

T1D: 1-es típusú cukorbetegség

UV: ultraviola

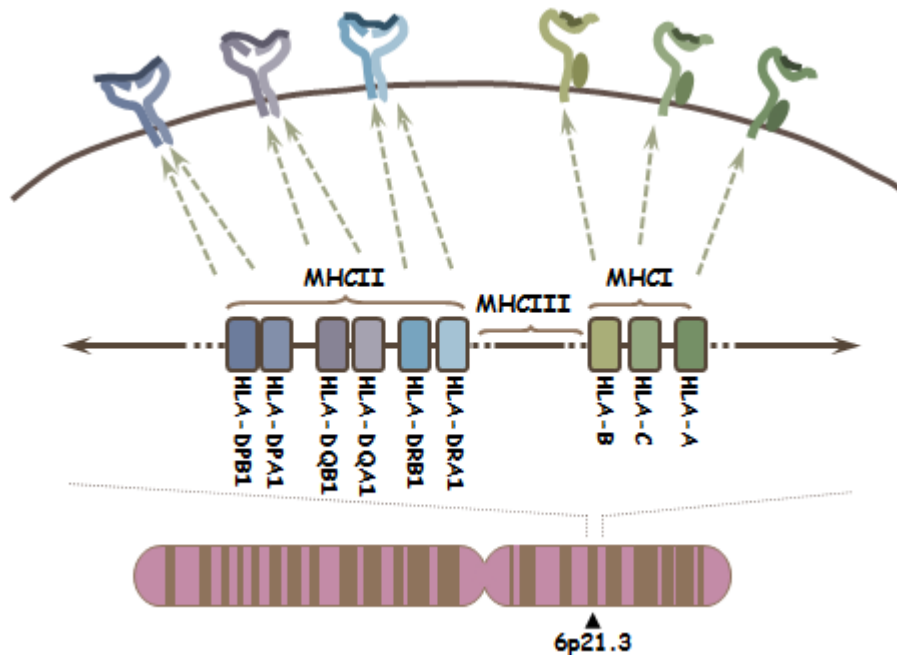
VIC: 545 nm hullámhosszon emittáló fluorofór

# 1 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

## 1.1 AZ MHC RÉGIÓ ÉS A NÉVADÓ FEHÉRJÉK

### 1.1.1 A régió jellemzői

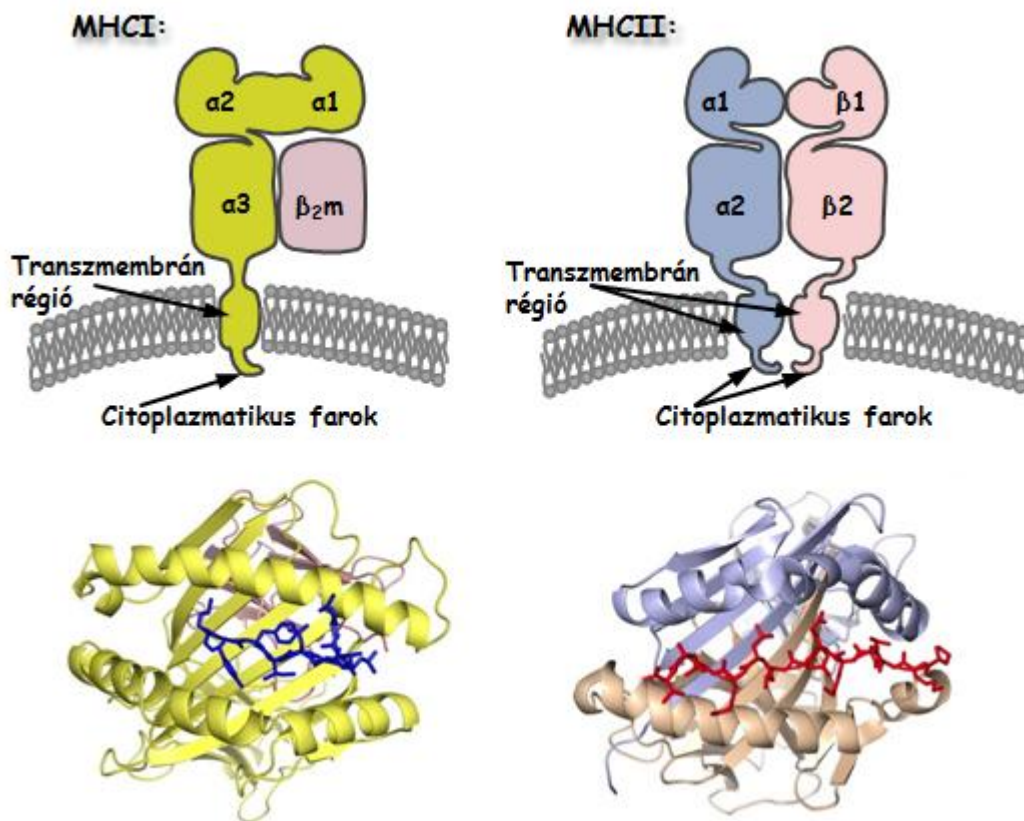
Az MHC régió (major histocompatibility complex, fő szövet-összeférhetőségi komplex) a humán genom egyik génekben leggazdagabb és legtöbbet tanulmányozott része. Az itt kódolt fehérjék döntő többsége az adaptív illetve a természetes immunrendszer résztvevője, így a terület kiemelkedő jelentőséggel bír mind a gyulladásos folyamatok, a patogének elleni küzdelem, az autoimmunitás és a szervátültetés szempontjából. A régió a 6. kromoszóma rövid karján (6p21.3) található és egy 7,6 Mb hosszúságú szakaszt ível át. Öt fő egységre tagolódik: a három klasszikus MHC régióra (MHCI-III), valamint az ezeken 5'-, illetve 3'-irányban túlnyúló területekre. A klasszikus MHCI régió a teloméra, az MHCII a centroméra felé esik; közöttük foglal helyet a centrális MHC (MHCIII) (1. ábra). A kiterjesztett MHC régió összesen 421 lókuszt tartalmaz, melyek közül 252-ről fejeződik ki fehérjetermék, további 30-ról csupán RNS transzkriptum keletkezik, 139 lókuszt pedig pszeudogénként tartanak nyilván [1].



1. ábra: Az MHC régió és a névadó fehérjék

### 1.1.2 A klasszikus MHC molekulák

A terület névadó molekuláját, az MHC-t a szövet- és szervátültetések kapcsán fedezték fel, mint a transzplantációt követő kilökődési reakciók elsődleges okozóját. A fehérjék valódi szerepe az adaptív immunválasz kialakulásához nélkülözhetetlen T-sejtek számára történő antigén-prezentáció. Az ember esetében az MHC fehérjét HLA (human leukocyte antigen, humán leukocita antigén) néven is szokás említeni [2].



**2. ábra:** Az MHC molekulák doménszerkezete és peptidkötő zsebeik felülnézeti modellje (A doménszerkezetes ábrák Klein közleménye alapján [3] készültek; a szalagmodelles ábrák készítője: Ermanno Gherardi, Paviai Egyetem)

Szerkezetüket tekintve az MHC molekulák az immunglobulin szupercsaládba tartozó heterodimer transzmembrán glikoproteinek. Két osztályba sorolhatók; ezek az MHC I és az MHC II (2. ábra). Az I-es osztály tagjai az öt domént tartalmazó, erősen polimorf  $\alpha$ -láncból (nehézlánc) és annak  $\alpha_3$ -doménjével nem-kovalensen kapcsolódó konzervált  $\beta_2$ -mikroglobulinból (könnyűlánc) állnak, az MHC II molekulák pedig két különböző, egyenként négy doménből felépülő és egymáshoz nem-kovalens módon



kötődő polimorf polipeptidláncból ( $\alpha$ - és  $\beta$ -lánc) [4, 5]. Míg az MHCII fehérjék mindkét polipeptidlánca az MHCII régióban kódolt (*HLA-DP*, *-DQ*, *-DR* gének), az MHCI molekulák esetében csupán a polimorf  $\alpha$ -lánc gének (*HLA-A*, *-B*, *-C*) találhatóak az MHCI régióban, a  $\beta_2$ -mikroglobulin génje a 15. kromoszómán helyezkedik el. Bár a két osztály tagjainak felépítése jellegzetesen eltér, térbeli struktúrájuk igen hasonló. Mind a kettő tartalmaz egy két domén alkotta peptidkötő árkot, transzmembrán régiót és citoplazmatikus farokrészt, amely a jelátvitelben szerepel. Az MHCI molekulák kizárólag meghatározott hosszúságú, 8-10 aminosavból álló peptidek bemutatására alkalmasak, mivel a kötőhelyük két végén elhelyezkedő ún. konzervatív aminosavak a peptidek terminális amino- illetve karboxicsoportjaival hoznak létre hidrogénhid-kötéseket. Ezzel szemben a II-es osztály tagjai ún. nyitott peptidkötő hellyel rendelkeznek, amely változatos hosszúságú peptidlánccokat is képes fogva tartani [6].

Az MHCI fehérjék a vörösvértestek kivételével gyakorlatilag minden testi sejten kifejeződnek és a citotoxikus T-sejtek felé prezentálják a fogva tartott, döntően endogén eredetű peptideket. Jelentőségük elsősorban a vírussal fertőzött illetve a tumoros sejtek elleni védekezésben áll. Az MHCII molekulák rendes körülmények között egyedül a hivatásos antigénprezentáló sejteken vannak jelen és az immunválasz szabályozásában játszanak fontos szerepet, mivel exogén eredetű peptideket mutatnak be a helper T-sejtek számára [3]. Amennyiben a T-sejt akár magát az MHC molekulát, akár a peptidet idegenként ismeri fel, aktiválódik, és közvetve vagy közvetlenül hozzájárul az idegen ágens eliminálásához [6].

Az MHC fehérjék peptidkötésért felelős polipeptidláncainak génjei igen nagyfokú polimorfizmust mutatnak, az egyes MHC allotípusok pedig eltérő kémiai sajátosságú peptideket képesek megkötni. Így más-más kórokozókkal szemben tudják a leghatásosabb védelmet biztosítani, ami igen lényeges a populáció hosszú távú fennmaradása szempontjából [7]. Emellett az MHC molekulák polimorf láncait kódoló gének kodomináns öröklésmenetéből kifolyóan egyetlen sejten akár hat különböző MHCI-, és még több MHCII fehérje is kifejeződhet, ami az egyed szintjén is növeli a patogénekkal szembeni ellenállóképességet [6].

### 1.1.3 Az MHC fehérjéket kódoló gének nomenklatúrája

Történeti okokból kifolyólag a *HLA*-allélok nevezéktana meglehetősen bonyolult és összetett. A *HLA*-tipizálást korábban főként szerológiai módszerrel, limfocitacitotoxicitási teszttel [8] végezték, ezt az eljárást azonban egyre inkább kiszorítja a DNS szintű meghatározás. Utóbbi révén az adott allélról igen részletes információ nyerhető; a részletesség a konkrét technika megválasztásától függ. Elterjedten alkalmazzák mind a PCR-SSP (szekvenca-specifikus primer), mind a PCR-SSO (szekvenca-specifikus oligonukleotid) hibridizációs eljárást. Előbbi lényege, hogy az egyes primerek enzimatis meg hosszabbítása csak akkor következik be, ha a templát DNS az adott primer 3'-végével tökéletesen komplementer szekvenca-szakaszt tartalmaz, míg a PCR-SSO technika során a már amplifikált DNS szakaszt hibridizáltatják különböző oligonukleotidokkal [9, 10].

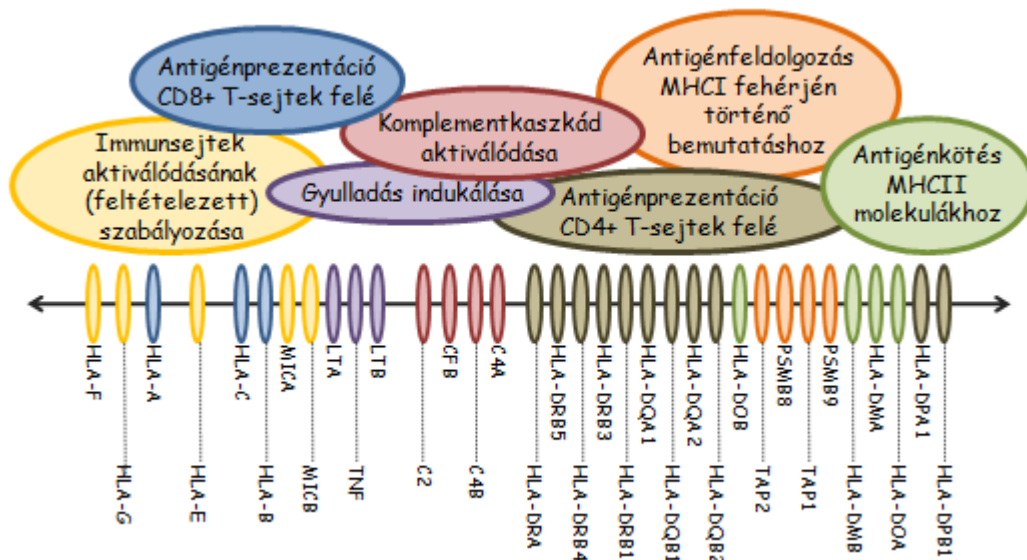
Az egyes *HLA*-allélokat eleinte a felfedezésük időrendi sorrendjének megfelelően nevezték el, ám az egyes tipizálási módszerek eltérő felbontóképessége és a *HLA*-allélok nagyfokú diverzitása miatt utólag számos alléllal kapcsolatban kiderült, hogy az voltaképpen egy több szubtípust (vagy „split” antigént) is magába foglaló, „szélesen” reagáló („broad”) antigént takar (1. táblázat) ([www.ebi.ac.uk/imgt/hla](http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla)).

1. táblázat: Szuballélokkal rendelkező *HLA*-allélok

Allél	Szuballélok	Allél	Szuballélok
A9	A23, A24	B21	B49, B50
A10	A25, A26, A34, A43, A66	B22	B54, B55, B56
A19	A29, A30, A31, A32, A33, A74	B40	B60, B61
A28	A68, A69	B70	B71, B72
B5	B51, B52	DR2	DR15, DR16
B12	B44, B45	DR3	DR17, DR18
B14	B64, B65	DR5	DR11, DR12
B15	B62, B63, B70, B71, B72, B75, B76, B77	DR6	DR13, DR14
B16	B38, B39	DQ1	DQ5, DQ6
B17	B57, B58	DQ3	DQ7, DQ8, DQ9

### 1.1.4 Az MHC régió egyéb, az immunrendszer működését szabályozó génjei

A klasszikus MHC molekulákon túl az MHC régióban számos egyéb, immunológiai szempontból kiemelkedő jelentőségű protein is kódolt (3. ábra) [1]. Az MHCI régióban található nem-klasszikus MHCI gének termékei például a sejtes immunitásban töltenek be szabályozó szerepet, a köztük tartozó HLA-G fehérje terhesség alatt tölt be fontos szerepet a szövetidegen magzat kilökődésének megakadályozásában [11]. Az MHCII régió több, az antigén-prezentációhoz nélkülözhetetlen gént tartalmaz. A *PSMB* (korábban *LMP*) génekről keletkező fehérjék az ún. immunproteaszóma részei [12]. Ez az enzimkomplex a citoszólban degradálódó fehérjéket az MHC molekulák kötőhelyébe illeszkedő peptidekre hasítja. Utóbbiakat a *TAP* gének termékei pumpálják a citoplazmából az endoplazmatikus retikulumba. A *HLA-DM* gének által kódolt heterodimerek az MHCII molekulák peptidkötése során töltenek be chaperon funkciót; működésüket a HLA-DO fehérje szabályozza [13]. Az MHCIII régióban kódolódik a komplement-kaszád több eleme (C2, C4, B faktor), bizonyos gyulladáshoz kapcsolódó citokinek (TNF- $\alpha$ , LTA), a MIC fehérjék, melyek feltételezhetően az NK-, NKT- és a  $\gamma\delta$  T-sejtek aktiválódását szabályozzák, továbbá például a 70 kDa hő sokkfehérjék családjába tartozó Hsp70-2 és a késői glikációs végtermékek receptora (AGER) [1, 6].



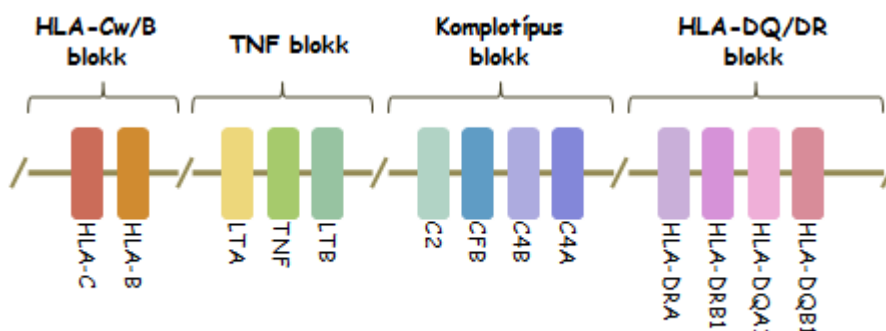
3. ábra: Az MHC régió immunológiailag fontos génjei

## 1.2 ÓSI MHC HAPLOTÍPUSOK

### 1.2.1 Az ősi haplotípus fogalma

A kiterjesztett MHC régió egyik nevezetessége az itt megfigyelhető nagyfokú linkage disequilibrium (LD; „kapcsoltsági egyensúlytalanság”), ami által akár megabázisnyi (Mb) hosszúságú kromoszómaszakaszok öröklődhetnek generációkon át szinte változatlan formában. Az egyetlen őstől származó, az emberi evolúció korai időszakában kialakult és azóta csupán minimális módosulásokon átesett, hosszú DNS szekvenciákat „ősi” (ancestral haplotype; AH) vagy „konzervált kiterjesztett” haplotípusnak (conserved extended haplotype; CEH) is nevezik [14, 15].

A humán MHC régió esetében az ilyen konzervált szekvenciák hossza elérheti a 3,2 Mb-t, ugyanakkor a konzerváltság kiterjedtségének tekintetében lényeges különbségek adódnak az egyének között [16]. Ennek magyarázata az ún. befagyott blokkok létében áll, amelyeken belül szinte soha nem történik rekombináció, közöttük azonban előfordulhat. Az MHC régióon belül négy ilyen klasztert említ az irodalom, amelyek a telomérától a centroméra felé haladva a következők: HLA-Cw/B-, TNF-, komplotípus- és HLA-DQ/DR-blokk (4. ábra) [17]. Ennek megfelelően nem rokon egyének hordozhatnak egy az egyben azonos ősi haplotípusokat is, míg másokban ezeknek csak egy töredéke található meg. Mivel az ősi haplotípusok szekvenciája evolúciós viszonylatban korán konzerválódott, napjainkra etnikumra jellemző eloszlású haplotípus-mintázatok alakultak ki [18].



4. ábra: Az MHC régió befagyott blokkjai

### 1.2.2 Ősi MHC haplotípusok és különböző kórképek kapcsolata

Számos jól karakterizált ősi MHC haplotípust ismerünk, melyek közül soknak betegségekre hajlamosító hatása is van. Ennek magyarázata esetenként magukban az MHC molekulákban keresendő, amelyek allotípusoknak megfelelően preferenciálisan mutatnak be adott tulajdonságú aminosavakat tartalmazó fehérjeszakaszokat. Előfordul azonban, hogy a haplotípus számos génjében fellelhető polimorfizmusok összessége okozza az effajta jelenségeket [19, 20].

A kaukázusi populációban leggyakoribb, több mint 9%-os előfordulási arányú 8.1 ősi haplotípus (AH8.1) [*HLA-A1, B8, DR3, DQ2*] hordozói például sajátos immunológiai profillal rendelkeznek. A TNF- $\alpha$  és az IL-10 szintjük konstitutívan emelkedett, az IgG2 szérumkoncentrációjuk alacsony, illetve relatíve magas a szervezetükben a cirkuláló immunkomplexek és az autoantigének mennyisége. Az AH8.1 hordozása előnyt jelent a patogének elleni küzdelemben, hosszú távon azonban egy egész sor autoimmun kórkép kialakulására hajlamosít, köztük 1-es típusú cukorbetegsége (T1D), szisztémás lupus erythematosusra (SLE), szisztémás szklerózisra, lisztérzékenységre és myasthenia gravisra [21-24]. Emellett munkacsoportunk eredményei alapján a 8.1 ősi haplotípus bizonyos tumorok kialakulásának esélyét is fokozza [25]. Kaukázusi populációban az AH7.1 [*HLA-A3, B7, DR15, DQ6*] összefüggést mutat multiplex szklerózissal [26], az AH18.2 [*HLA-A26, B18, DR17, DQ2*] T1D-vel [27], az AH13.1 [*HLA-A2, B13, DR7, DQ2*] és az AH57.1 [*HLA-A2, B57, DR7, DQ3*] pikkelysömörrel [28], az AH35.2 [*HLA-A11, B35, DR1, DQ5*] pedig sporadikus zárványtestes myositisszel [29]. Ugyanakkor japánok körében ez utóbbi betegsége inkább az AH52.1 [*HLA-A24, B52, DR15, DQ6*] hajlamosít [30].

Az sem ritka, hogy nem egy teljes kiterjesztett haplotípus mutat asszociációt egy adott kórképpel, hanem annak csupán egy fragmentuma, amely állhat egy vagy több befagyott blokkból. Például a [*HLA-DR3, DQ2*] és a [*HLA-DR4, DQ8*] haplotípusok döntő többsége a T1D rizikófaktora, ugyanakkor a [*HLA-DR15, DQ6*], [*HLA-DR14, DQ5*] és a [*HLA-DR7, DQ9*] erős védőhatással rendelkezik e betegség ellen [31, 32]. A [*HLA-B44, DR4*] haplotípus autizmusra [33], a [*HLA-A24, B35*] pedig japán populációban primer petefészkek elégtelenségre hajlamosít [34].

### 1.2.3 A tagSNP fogalma

Bár az MHC régió esetében a haplotípusokat eredetileg a klasszikus MHC fehérjéket kódoló *HLA* allélokkal szokás leírni azok nagyfokú variabilitása miatt, elvileg bármely ősi haplotípus nagy megbízhatósággal meghatározható egy vagy néhány jól megválasztott egy pontos nukleotid polimorfizmus (single nucleotide polymorphism, SNP) kombinációjával [35]. Az efféle, a genom erős linkage disequilibriummal rendelkező régiójában elhelyezkedő SNP-eket, amelyek meghatározásából következtethetünk egyéb polimorfizmus(ok) vagy egy adott haplotípus jelenlétére azok közvetlen detektálása nélkül, tagSNP-nek szokás nevezni. A tagSNP-k száma és elhelyezkedése az adott kimutatandó variációtól illetve haplotípustól függ; az AH8.1 például jól jellemezhető az *LTA 252G*, *TNF -308A*, *HSPA1B 1267G*, *CFB S*, és *AGER -429C* allélok együttesével [19, 36].

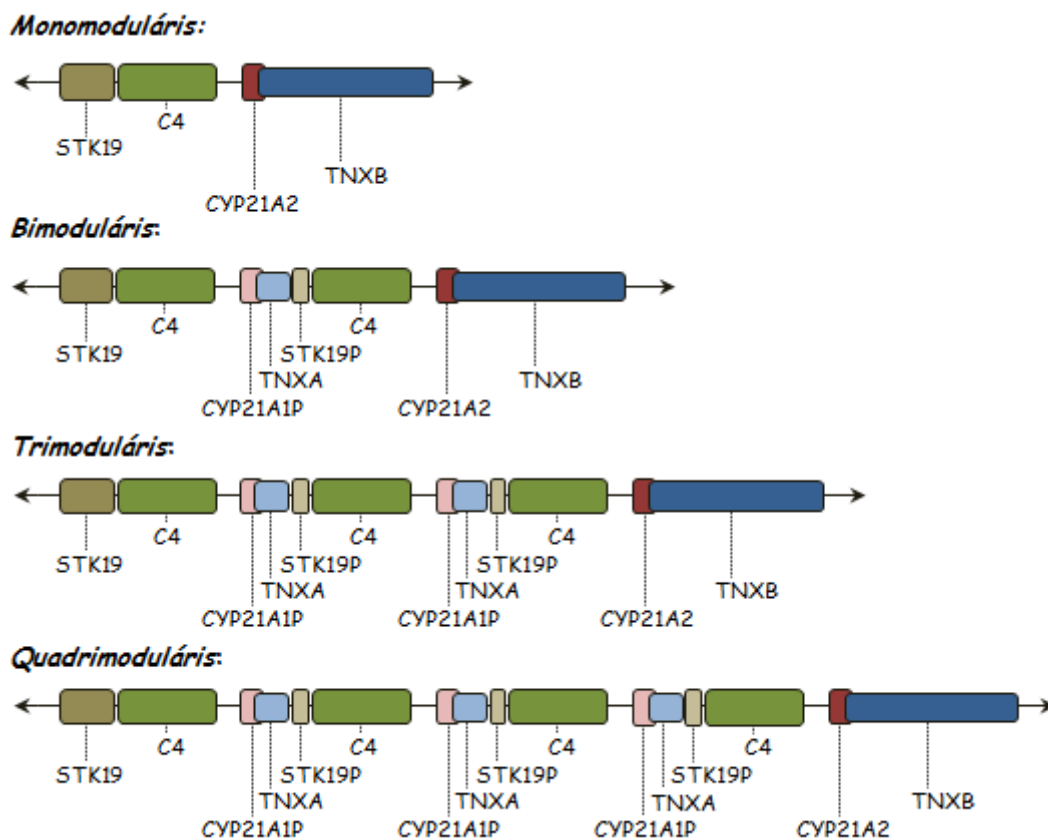
## 1.3 AZ RCCX MODULÁRIS STRUKTÚRA

### 1.3.1 Az RCCX szerkezet felépítése, alkotói

A centrális MHC régióban található a humán genom egyik legtöbbet tanulmányozott kópiaszám-variáció lókusza, az úgynevezett RCCX modul. Modulnak hívjuk azokat a többgénés szerkezeteket, amelyek diszkrét egységként viselkednek, vagyis az azokat alkotó gének mindig együtt duplikálódnak vagy deletálódnak. Az RCCX struktúra a nevét négy tagja után kapta; ezek az *STK19* (korábban *RP*) nukleáris szerin-treonin kináz, a *C4* komplement komponens, a 21-hidroxiáz (*CYP21*) és az extracelluláris mátrixfehérjék családjába sorolt tenascin-X (*TNX*) génei. Az egy kromoszómán található RCCX modulok száma leggyakrabban kettő, nem ritkán egy vagy három, illetve igen ritkán négy (5. ábra) [37].

A mutációktól eltekintve a monomoduláris haplotípus kizárólag funkcionális géneket tartalmaz, a duplikált szegmensekben azonban egyedül a 4-es komplement komponens génjéről keletkezik protein. Az egyes *C4* gének *C4A*, vagy *C4B* izotípusú fehérjét kódolhatnak, és egy HERV-K(C4) endogén retrovírus szekvencia jelenlététől függően különböző méretűek lehetnek (hosszú, *C4L* vagy rövid, *C4S*) [38]. Az aktív

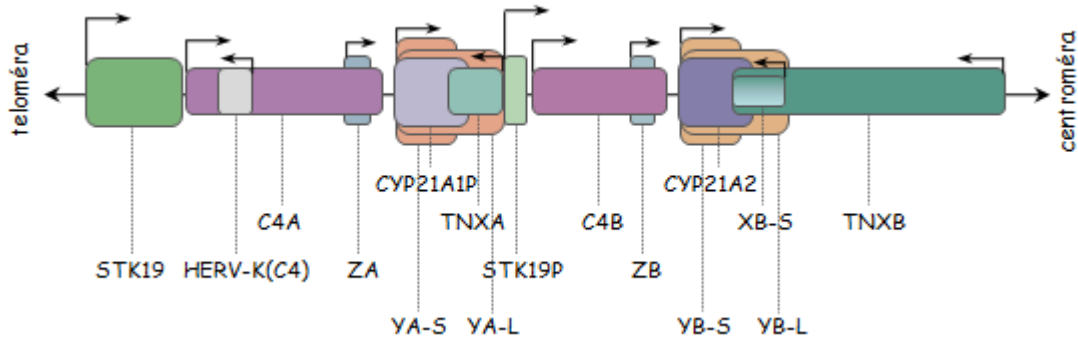
*STK19* génről kétféle hosszúságú fehérje keletkezik splicing közben bekövetkező exonátugrás miatt [39]. A *TNX* gének részlegesen átfednek a szomszédos *CYP21* génnel és orientációjuk ellentétes a többi *RCCX* összetevőével [40]. A funkcionális *STK19* és *TNXB* gének csonkolt pszeudogén párjait [41] *STK19P*-nek illetve *TNXA*-nak nevezik, az aktív *CYP21A2* génnel nagyfokú homológiát mutató pszeudogént [42] *CYP21A1P*-nek. A leggyakrabban előforduló, egy *C4A* és egy *C4B* génkópiát tartalmazó bimoduláris *RCCX* struktúrában a telomérától számítva a gének sorrendje: *STK19-C4A-CYP21A1P-TNXA-RP2-C4B-CYP21A2-TNXB* [43].



5. ábra: *RCCX* szerkezeti variációk

A fentiekén túl a *TNXB* génről átíródik egy, a *TNX* fehérjét kódoló mRNS-hez képest megrövidült, szintén fehérjekódoló mRNS (*XB-S*) is [44], illetve két további, RNS transzkriptummal rendelkező lókuszpár (*YA/YB* és *ZA/ZB*) is található az *RCCX* szerkezetekben. Az *YA* és *YB* transzkriptumok a *CYP21A1P* illetve a *CYP21A2* gének promóteréről íródnak át és két-két hossz-variánsuk létezik (*YA-S/YA-L* és *YB-S/YB-L*); melyek közül a hosszabbik teljes mértékben átfed a *TNX* génről származó RNS-sel

[45]. A ZA és ZB transzkriptumok átírása a *C4A* illetve *C4B* géneken belül elhelyezkedő kritikus promóterről indul, a *C4* génekével azonos leolvasási kerettel (6. ábra) [46].



**6. ábra: Transzkriptumok az RCCX struktúrában**

Az RCCX szerkezetet alkotó gének élettani jelentőségét tekintve átfogó információ egyedül a *C4*-ről és a *CYP21*-ről áll rendelkezésre. Előbbi fehérjeterméke a komplementkaskád tagjaként az immunológiai folyamatok szabályozásában tölt be fontos szerepet, míg a 21-hidroxiláz nélkülözhetetlen a glükokortikoidok és a mineralokortikoidok szintéziséhez. A tenascin-X a normális izomfejlődéshez szükséges [47, 48], míg az STK19 enzim feltételezhetően a DNS szintézisben és a transzkripcióban vesz részt [49]. Az XB-S protein szerepe nem tisztázott, de hipoxia hatására fokozódik a termelődése [50]. Az *Y* és *Z* lokuszok jelentősége egyelőre ismeretlen, viszont figyelemreméltó módon a transzkripciójuk szövetspecifikus [45, 46]; a *CYP21A1P* és a *TNXA* pszeudogénekéhez hasonlóan kifejezetten a mellékvesére jellemző [44, 51].

### 1.3.2 Egyenlőtlen átkereszteződések az RCCX struktúrában belül

Az RCCX struktúrában belül a sejtosztódás során aránylag gyakran történik hibás bázispárosodás a kromoszómánkénti modulszám variabilitása, valamint az itt található aktív- és pszeudogének nagyfokú szekvenciabeli hasonlósága miatt. Ezek vagy kisléptékű génkonverzióhoz, vagy egyenlőtlen átkereszteződéshez vezethetnek. Az előbbi esetben pszeudogénre specifikus szekvencia-szakaszok kerülhetnek át a megfelelő aktív génbe, funkcióképtelenné téve azt, az utóbbi folyamat pedig gyakran aktív-/pszeudogén kimérák keletkezését eredményezi. *De novo* nem-allélikus homológ rekombinációs eseményeket elsősorban a *CYP21* gének kapcsán említi az irodalom, ahol homozigóta formában az aktív gén hiánya vagy defektusa congenitalis adrenalis hyperplasiát (CAH)



okoz [52, 53]. Emellett *de novo* létrejött *TNX* aktív-/pszeudogén kimérákról is vannak feljegyzések, amelyek az Ehlers-Danlos szindróma III. (hipermobilis) típusának kialakulásához járulnak hozzá [54].

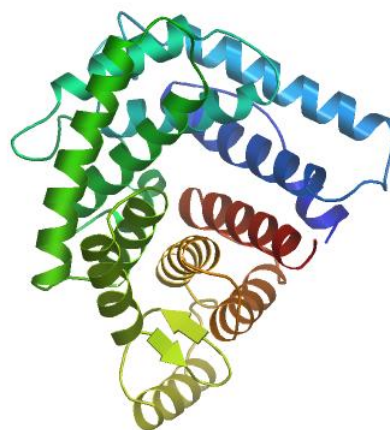
### 1.3.3 *RCCX szerkezeti variációk*

A kromoszómánkénti modulszámok diverzitásának és a *C4* gének hosszpolimorfizmusának köszönhetően az *RCCX* struktúra figyelemreméltó variabilitást mutat. Az ezt vizsgáló tanulmányok rendszerint különféle Southern blot technikákra épültek, és elsősorban a telomerikusan elhelyezkedő *C4* gén (ezáltal *RCCX* szegmens) hosszának, valamint az össz-*C4A* és -*C4B* génszám megállapítására irányultak [43, 55, 56]. Alkalmanként a haplotípusonkénti *C4L* és *C4S* gének számát is meghatározták [37, 57]. Mindezek alapján számos ritka variáns mellett hét gyakori *RCCX* szerkezeti típust írtak le: monomoduláris L (hosszú) és S (rövid), bimoduláris LL és LS, valamint trimoduláris LLL, LSS és LLS (vagy LSL; megkülönböztetni ilyen módszerrel nem lehet) változatokat [43]. Ezenkívül valószínűsíthető, hogy a leginkább telomerikusan elhelyezkedő modul rendszerint hosszú *C4A* gént tartalmaz és hogy a rövid monomoduláris struktúrákban gyakorlatilag kizárólag *C4B* gén található [38]. Amennyiben az *RCCX* szerkezet nem tartalmaz egyetlen *C4A* gént sem, *C4A\*Q0* haplotípusról beszélünk, míg a *C4B* gén hiánya esetében *C4B\*Q0*-ról (ezekben az elnevezésekben a „Q0” megjelölés a „quantity zero”, azaz a „mennyisége nulla” kifejezés rövidítése) [58].

## 1.4 A 4-ES KOMPLEMENT KOMPONENS

### 1.4.1 *A C4 fehérje és funkciója*

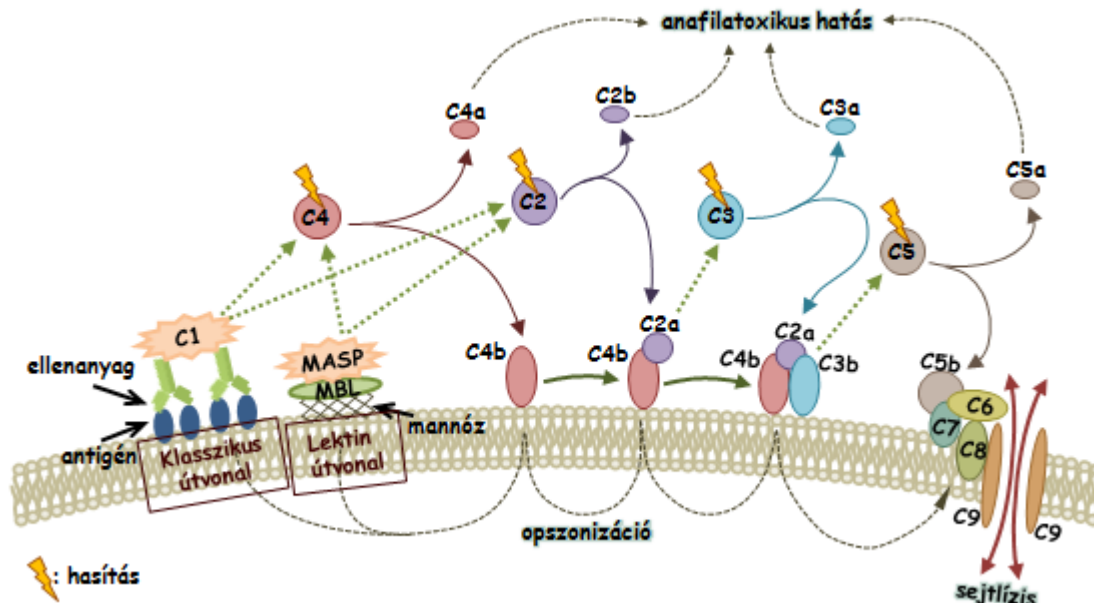
A *C4* fehérje (7. ábra) a komplementrendszer klasszikus és lektinindukált útvonalának résztvevője, szerkezetileg az  $\alpha_2$  makroglobulinok családjába tartozik. Elsősorban a máj termeli, de kismértékű expresszió egyéb szövetekben is kimutatható. Prekursora



7. ábra: A *C4* fehérje térszerkezeti modellje a Swiss-Prot adatbázis alapján ([www.expasy.ch](http://www.expasy.ch))

egyetlen, 200 kDa méretű polipeptidláncként szintetizálódik, majd a fehérje érése során egy három láncból ( $\alpha$ -lánc: 95 kDa,  $\beta$ -lánc: 75 kDa,  $\gamma$ -lánc: 33kDa) álló struktúra alakul ki, a láncok között diszulfidhid-kötésekkel [59, 60].

A molekula hasítás révén aktiválódik, amit a C1 komplement komponens C1s alegysége vagy a mannózkötő lektin asszociált szerin proteáz (MASP) végez. E két enzim alapesetben inaktív formában van jelen a keringésben, autoaktivációjukat a targethez való kötődés hatására bekövetkezett konformáció-változás indukálja. A C1 molekula elsősorban a célsejthez kikötődött IgG és IgM izotípusú ellenanyagokat képes felismerni, a MASP pedig az egyes patogének cukorban gazdag felszínéhez asszociált mannózkötő lektint (MBL) és a fikolinokat [60, 61].



8. ábra: A C4 fehérje szerepe a komplementrendszer aktiválódása során

A C4 fehérje hasításakor két fragmentum keletkezik: a nagyobb méretű C4b és az  $\alpha$ -lánc N-terminális végéről leváló kismolekula, a C4a. Ez utóbbi feltételezhetően enyhe anafilatoxikus hatással rendelkezik, tehát gyulladást közvetítő anyagok felszabadulását váltja ki, serkenti a hisztamin felszabadulását hízósejtekben és granulocitákban, fokozva az ér permeabilitását, továbbá kemotaktikusan vonzza főként a neutrofil granulocitákat. A C4b peptiden a hasadáskor bekövetkező térszerkezeti változások eredményeképpen feltárul egy láncon belüli tioészterkötés, amely hidroxil- és aminosz csoportokkal kovalens kötést képes létrehozni. Ezáltal a C4b az aktiváló felülethez

kapcsolódik, közvetlenül a C1 illetve a MASP mellett, ahol megköti a következő komplement komponenst, a C2-t. Ez utóbbit szintén a C1s vagy a MASP aktiválja hasítás révén. A keletkező nagyobbik fragmentum, a C2a a C4b molekulához kötődik, kialakítva a C3 proenzimet aktiválni képes C3 konvertázt. A kaszkád további aktiválódása végül a membránkárosító komplex kialakulásáig vezethet el, ami pórust hoz létre a célsejten (8. ábra). Emellett a komplementrendszer opsonizálja is a patogéneket, könnyebben felismerhetővé téve azokat a fagociták számára. Mindezekon túl a C4b peptid fontos szerepet tölt be az immunkomplexek keringésből történő eltávolításában is, egyrészt azok szolubilizálása (és a precipitáció gátlása) által, másrészt a vörösvértesteken kifejeződő CR1 receptorokhoz történő kötődésén keresztül [60, 61].

#### **1.4.2 A C4 gén és fehérje variációi**

A C4 gének 41 exonból állnak, méretük 14,6 kb vagy 21 kb lehet annak megfelelően, hogy a 9. intronba beékelődött-e a HERV-K(C4) szekvencia. Számuk a humán genomban kettő és nyolc között változhat az RCCX modulok számának megfelelően. A két izotípuson (C4A és C4B) belül több mint 41 különböző allotípusú fehérjét kódolhatnak. Az izotípusok DNS szekvenciája 99%-ban azonos, a köztük levő fő különbséget mindössze öt, a 26. exonban elhelyezkedő nukleotid eltérése jelenti, amelyek négy aminosavcserét okoznak [58]. Az RCCX szerkezeti variációkra vonatkozó vizsgálatok alapján a C4A gének döntő többsége valószínűleg tartalmazza az endogén retrovírust, míg a C4B gének feltehetően körülbelül fele-fele arányban hosszúak illetve rövidek [38]. A C4 protein egyéenként változó szérumkoncentrációja (laboratóriumunk referencia tartománya szerint 150-550 mg/l) valamint hemolitikus aktivitása erősen összefügg a géndózissal, míg a C4A és C4B izotípusú fehérjék egymáshoz viszonyított aránya a megfelelő gének mennyiségi arányát tükrözi [62].

A C4A (acidic, savas) elsősorban amidkötést hoz létre aminocsoporttal rendelkező targetekkel, míg a C4B (basic, bázikus) az izotípusára jellemző 1106-os pozíciójű hisztidinnek köszönhetően inkább észterkötést alakít ki hidroxilcsoportot tartalmazó szubsztrátokkal. Az aktivált C4A féléletideje (~10 s) egy belső tioészterkötésnek köszönhetően hosszabb, mint a C4B-é (<1 s), így valószínűsíthető, hogy a C4A izotípus inkább az immunkomplexek eltávolításában, míg a C4B elsősorban a fertőző ágensek elleni védelemben játszik szerepet [63, 64].

A *C4* gének többségébe beépült HERV-K(*C4*) szekvencia szintén élettani jelentőséggel bír. A benne található számos stop kodon lehetetlenné teszi a retrovirális fehérjék termelődését, ugyanakkor antiszensz irányban kimutattak RNS szintézist, ami transzfekciós kísérletek alapján hatékony védelmet nyújt az exogén retrovírusokkal szemben, különösen interferon- $\gamma$  hatására [65, 66]. Ugyanakkor az endogén retrovírus jelenléte dóziszfüggően csökkenti a *C4* fehérje szérumszintjét, vélhetően a méretéből (6,4 kb) fakadóan a transzkripció lelassítása révén [62].

### **1.4.3 *C4* hiányos egyének**

A *C4* fehérje expressziójának teljes hiánya rendkívül ritka, az irodalmi utalások szerint összesen harminc-egyven eset ismeretes. *C4* gén ezekben az egyéneknél is jelen van és kismértékű RNS szintézis is kimutatható, azonban a fehérjetermelést megakadályozzák a gén defektusai. A *C4* gén működésképtelenségét rendszerint kisléptékű inszerciók és deléciók okozzák, amelyek eltolják a leolvasási keretet. Közülük is leggyakoribb a 29. exont érintő 2 bázispáros inszerció, amely *C4A* és *C4B* géneknél is fellelhető [67].

A *C4* hiányos egyéneknél súlyosan sérül az immunkomplexek keringésből történő eltávolítása, ami az esetek túlnyomó többségében immunkomplex-betegségeket indukál, nemritkán glomerulonephritishez, majd végállapotú veseelégtelenséghez vezetve. Mivel a komplementrendszer klasszikus útja az apoptotikus sejtek eliminálásában is szerepet játszik, valószínűleg ez a funkció is károsodik, ami antinukleáris autoantitestek termelését eredményezi. Emellett a *C4* deficiens betegek többnyire visszatérő, elsősorban tokos baktériumok által okozott fertőzésekben is szenvednek, illetve fokozottan fogékonyak szepszis kialakulására [68-70].

### **1.4.4 *C4A\*Q0* haplotípusok**

A *C4A\*Q0* haplotípusokat elsősorban különböző autoimmun betegségek rizikófaktoraként írták le. Többek között SLE-vel, szisztémás szklerózissal, rheumatoid arthritisszel, autoimmun hepatitiszsel és T1D-vel hozták összefüggésbe [71-75]. Ennek egyik lehetséges oka, hogy – a *C4* hiányos egyénekhez hasonlóan – a *C4A\*Q0* hordozók körében az A izotípusú *C4* fehérjék átlagosnál alacsonyabb koncentrációja

(vagy hiánya) miatt az immunkomplexek viszonylag hosszú ideig vannak jelen a keringésben, ami gyulladási folyamatokat indukál [76]. Ugyanakkor elképzelhető, hogy a magyarázat számos egyéb, egymástól viszonylag távoli gén bizonyos alléljaiban, vagyis genetikai kapcsoltságban keresendő, mivel a *C4A* gén hiánya mindenképp az autoimmun kórképekre hajlamosító 8.1 ősi MHC haplotípusban fordul elő [21].

#### **1.4.5 *C4B\*Q0* haplotípusok**

A *C4B\*Q0* haplotípusok, illetve az átlagosnál alacsonyabb *C4B* szérumszint a *C4A* hiányos haplotípusokhoz képest változatosabb kórképekkel asszociálnak, köztük Schönlein-Henoch purpurával, autizmussal és szkizofréniával [77-79]. Homozigóta formában a *C4B* gén hiánya bakteriális eredetű agyhártyagyulladásra és visszatérő fertőzésekre hajlamosít, ami összhangban áll a fehérjetermék izotípusból eredő sajátsgaival [80, 81].

Munkacsoportunk megfigyelése szerint a *C4B\*Q0* haplotípusok szignifikánsan ritkábban fordulnak elő egészséges idős korosztályban (60-90 évesek) az egészséges fiatalokhoz (18-45 évesek) képest magyar és izlandi populációban egyaránt, ami arra utal, hogy a *C4B\*Q0* hordozók fokozatosan kiszelektálódnak az egészséges populációból [82, 83]. A későbbiekben munkacsoportunk kimutatta, hogy a legalább egyik kromoszómájukon *C4B* gén hiányos egyének fokozottan hajlamosak myocardialis infarktusra, koronária artéria betegségekre és stroke-ra [84-86]. Mindezekon felül a már infarktuson átesett *C4B\*Q0* hordozó betegek rövid távú (a kórházi bent fekvés idejére vonatkozó) túlélési esélyei rosszabbak a nem *C4B\*Q0* hordozókhöz képest [87]. Ez az összefüggés különösen a dohányzók körében bizonyult erősnek [88].

A *C4B\*Q0* hordozók körében tapasztalt, fokozott mértékű kardiovaszkuláris mortalitás és morbiditás megindokolhatja, hogy az ilyen haplotípusok előfordulási aránya miért csökken a kor előrehaladtával, molekuláris szinten viszont nem triviális az összefüggés háttere. Elvileg felmerül a lehetőség, hogy a *C4B\*Q0* hordozókban az átlagosnál alacsonyabb össz-*C4* génszám, így relatíve alacsony *C4* szérumszintek miatt a komplementrendszer aktivitása is csökkent mértékű, de a teljes szérummal végzett funkcionális vizsgálatok ezt nem támasztották alá [89]. Ráadásul éppen hogy a komplementrendszer nagyobb mértékű aktivitása eredményez komolyabb szöveti károsodást, így súlyosabb lefolyású kórképet a kardiovaszkuláris eseményeket követően

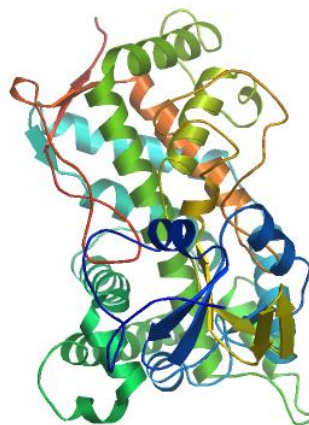
[90, 91]. Egy másik lehetséges magyarázat szerint a fenti jelenségek oka abban keresendő, hogy az alacsonyabb C4 fehérjeszint miatt csökken az immunkomplexek eltávolításának hatékonysága [92]. Ezt támasztja alá, hogy a C4B\*Q0 hordozás az IgA immunkomplexek lerakódása által kiváltott Schönlein-Henoch purpurával asszociál [77], illetve hogy különböző autoimmun betegségekben szenvedő egyének esetében pozitív korrelációt írtak le a C4B szérumszint és az immunprecipitáció komplement mediálta megelőzhetősége között [93]. Ugyanakkor a C4A\*Q0 hordozás és a kardiovaszkuláris morbiditás között nem sikerült összefüggést kimutatni [22], holott az immunkomplexek eltávolításában feltételezhetően még nagyobb is a C4A izotípusú fehérjék szerepe a C4B izotípushoz képest. Ezenkívül – a C2 deficienciától eltekintve – még a homozigóta komplement hiányos egyének kapcsán sem számol be semminemű tanulmány fokozott kardiovaszkuláris mortalitásról illetve morbiditásról [94].

## 1.5 A 21-HIDROXILÁZ ENZIM

### 1.5.1 A 21-hidroxiláz enzim működése

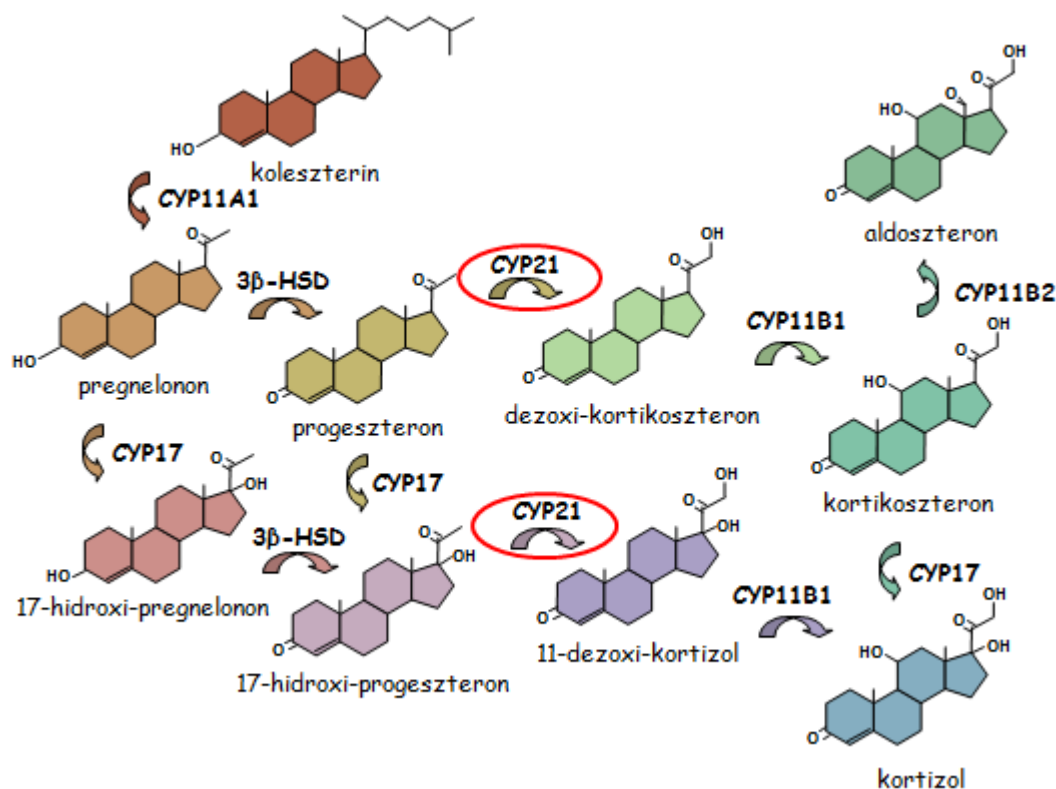
A CYP21 (citokróm P450 21-hidroxiláz) (9. ábra) a szteroid bioszintézis egyik kulcsenzime, hiányában nem keletkezhet sem kortizol, sem aldoszteron (10. ábra). Expressziója erősen szövetspecifikus, kizárólag a mellékvesekéregre jellemző. A fehérje tömege 52 kDa és többnyire 494 aminosavból áll (létezik egy extra leucint tartalmazó variánsa is) [95].

Az enzim aktivitásához magán a fehérjén és a szubsztrátján túl szükség van egy hem proszтетikus csoportra és a citokróm P450 oxidoreduktázra mint redox partnerre. A katalitikus modellek egyike szerint a reakció első lépéseként a szubsztrát az oxidált állapotú 21-hidroxilázhoz köt, majd a redox partnertől származó elektron redukálja a vasatomot. Ezután az enzim megköt egy oxigénmolekulát is, amit a redox partnertől származó második elektron negatív töltéssel ruház fel. Ekkor egy konzervált, savas aminosavmaradékról (aszpartát/ glutamát) közvetve két proton kerül a disztális oxigén-



**9. ábra: A CYP21 enzim térszerkezeti modellje a Swiss-Prot adatbázis alapján (www.expasy.ch)**

atomra, ami víz formájában távozik. Végül a visszamaradó, erősen reaktív oxigénatom hidroxilálja a szubsztrátot [95, 96].



10. ábra: A 21-hidroziláz szerepe a szteroid hormonok bioszintézisében

### 1.5.2 A CYP21 aktív- és pszeudogén

Az aktív *CYP21A2* gén számottevő homológiát mutat a *CYP21A1P* pszeudogénnel, szekvenciájuk az exonokban 98%-ban, az intronokban 96%-ban azonos. Hosszuk 3,1 kilobázis és 10-10 exont tartalmaznak. A köztük levő legnagyobb különbség a pszeudogén 3. exonjában található 8 bázispáros, frameshiftet (kereteltolódást) okozó deléció, de egyéb defektusok is jellemzőek a *CYP21A1P* génre. Egy 2. intronbeli nukleotid megváltozása aberráns splicingot okoz, a 7. exonban található egy frameshiftet okozó egy nukleotidos inszerció, a 8. exonban egy stop kodon, emellett összesen nyolc, aminosavcserét eredményező mutáció szintén ellehetetleníti a megfelelő fehérjetermék keletkezését [95].

A humán gén mutációs adatbázis (HGMD, [www.hgmd.org](http://www.hgmd.org)) alapján a *CYP21A2* génnek több mint 100 mutációja ismert, melyeknek csupán kb. 5%-a nem hozható

összefüggésbe a pszeudogénnel. A hibás allélok közel háromnegyede valószínűleg mikrokonverzió révén (pszeudogénre jellemző szekvencia szakaszok az aktív génben), míg a fennmaradó 20% egyenlőtlen átkereszteződés eredményeképp (aktív-/pszeudogén kimérák vagy géndeléció) alakult ki [97, 98].

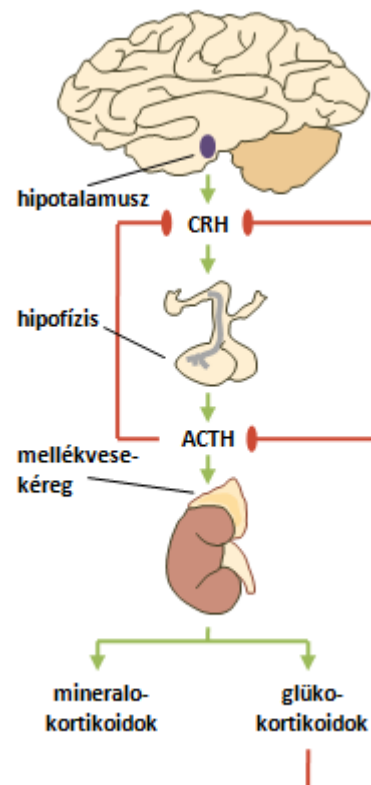
### 1.5.3 A *CYP21A2* gén szabályozó régiói

A *CYP21A2* gén transzkripciójának szabályozása kapcsán a közeli promóteren kívül távoli elemek szerepét is igazolták. Utóbbiak a – közvetlenül a *CYP21* gén előtt elhelyezkedő – *C4* gén 35. intronjában találhatóak, és az *RCCX* moduláris struktúra kapcsán említett *Z* transzkriptumok promóterének területére esnek. A régió három transzkripciós faktor kötőhelyet is tartalmaz. Közülük kettő a kísérletes eredmények alapján az SF-1 (szteroidogén faktor 1), míg a harmadik feltételezhetően az NF-W2 (nukleáris faktor W2) transzkripciós faktort köti [99].

A *CYP21A1P* pszeudogén transzkripciós aktivitása az aktív génhez viszonyítva mindössze 20% körüli, ami legalábbis részben a két gén proximális promótere közötti 4 bp-os eltérésnek köszönhető [100]. A disztális szabályozó régiók szerepéről a pszeudogén kapcsán nincsen adat.

### 1.5.4 A hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely

A 21-hidroxiláz enzim termelődésének szabályozásában központi szerepet játszik a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese (HPA) tengely (11. ábra). A hipotalamusz paraventriculáris magjában található neuroendokrin sejtek egyebek közt kortikotropin felszabadító hormont (CRH) szekretálnak. Utóbbi az agyalapi mirigy elülső lebenyében stimulálja az adrenokortikotrop hormon (ACTH) felszabadulását. A CRH hatását a szintén a hipotalamuszban termelődő arginin-vazopresszin (AVP) tovább fokozza. Az ACTH a mellékvesekéregben glükó- és mineralo-



11. ábra: A HPA tengely

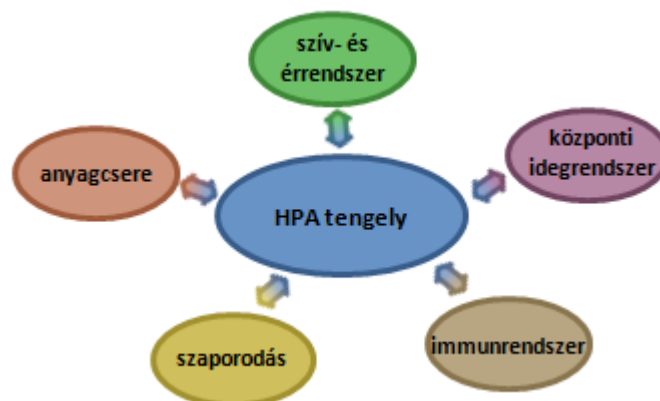


kortikoidok, végső soron kortizol és aldoszteron bioszintézisét indukálja a megfelelő enzimek, köztük a 21-hidroxiláz expressziójának növelésén keresztül. Ugyanakkor a kortizol szintjének emelkedése negatív visszacsatolással hat a keletkezését serkentő CRH-ra és ACTH-ra, megakadályozva ezáltal önmaga túltermelődését [101].

A hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely aktivitása cirkadián ritmust mutat, amit lényegében a CRH gén expressziós mintázata szabályoz. Ez a mintázat független a kortikoszteroid hormonok szintjétől, kialakításában elsősorban a szembe jutó fény és az étkezés szerepét feltételezik [102, 103]. Ezenkívül egyéb faktorok is befolyással bírnak a HPA tengely működésére, mint például a stressz és bizonyos bakteriális endotoxinok, köztük a Gram-negatív sejtfal lipopoliszacharid (LPS) komponense [104, 105].

### 1.5.5 A HPA tengely és a stresszválasz kapcsolata

Mivel a HPA tengely elemei sokrétű szabályozó funkcióval rendelkeznek, a rendszer aktivitása és aktiválhatósága központi tényező a homeosztázisban (12. ábra). A mineralokortikoidok hatására fokozódik a szervezetben a nátrium és ezáltal a víz visszatartása; növekszik a vérnyomás. A glükokortikoidok a májban raktározott glikogén és fehérjék lebontását serkentik, illetve emelik a vércukorszintet [101]. A glüko- és mineralokortikoidokra specifikus receptorok kifejeződnek különböző agyi területeken, köztük a hippokampuszban és az amigdalában, befolyásolva a kognitív funkciókat és az érzelmeket [106, 107]. A glükokortikoidok számos immunsejt működését, citokintermelését is szabályozzák, gyulladáscsökkentő hatásuk van és az immunválaszt humorális irányba tolják el [108].



12. ábra: A HPA tengely kapcsolata a szervezet egyéb rendszereivel

A HPA tengely stimulációja a stresszválasz lényeges eleme; aktivációja összefonódik a szimpatikus idegrendszerével és a hatásaik is kiegészítik, felerősítik egymást. Az akut stressz végeredményben az izmok oxigénnel és glükózzal való ellátottságát növeli és módosult tudatállapotot eredményez, ami a vészhelyzetből való elmenekülésnek vagy éppen a harc készségnek, tehát a túlélésnek kedvez. Ezzel egyidejűleg negatív visszacsatolási hurkokon keresztül beindulnak a stresszreakció gátló folyamatok is. A stresszor krónikus jelenléte esetében azonban a szervezet készségi állapota állandósul, ami több szempontból is kártékony (2. táblázat) [109-113].

**2. táblázat: A stressz rövid- és hosszú távú hatásai (Sapolsky [114] után módosítva)**

<b>Akut stresszválasz</b>	<b>Krónikus stressz okozta kórképek</b>
energia felszabadulás (lebontó anyagcsere)	kimerültség, elhízás, 2-es típusú cukorbetegség
megnövekedett kardiovaszkuláris tónus	magas vérnyomás betegség, infarktus, stroke
emésztőrendszer vérellátásának csökkenése	gyomor-/ bélrendszeri fekélyek
immunválasz módosulása, gyulladásgátlás	csökkent ellenállóképeség, daganatok
ivarszervek vérellátásának csökkenése	termékenység csökkenése
kognitív képességek fokozódása, fájdalomérzet csökkenése	fokozott neurodegeneráció
félelem, idegesség	depresszió, poszt-traumás stressz szindróma

### **1.5.6 21-hidroxiláz hiányos állapotok**

Amennyiben a szervezetben nem szintetizálódik ép funkciójú 21-hidroxiláz enzim, nem termelődik kielégítő mennyiségű kortikoszteroid sem. Emiatt kórosan magas lesz az ACTH szint, ami a mellékvesekéreg szteroid termelő sejtjeinek túlaktiválásához és túlburjánzásához vezet, és kialakul a világszerte egyik leggyakoribb recesszív öröklésmentű betegség, a congenitalis adrenalis hyperplasia (CAH). A betegség súlyossága egyénenként változik annak megfelelően, hogy az enzimfunkció milyen mértékben károsodott. Elkülöníthető a CAH enyhe, nem-klasszikus, valamint a klasszikus formája, illetve az utóbbinak két változata létezik: a sóvesztő (salt wasting, SW) és az egyszerű virilizáló (simple virilizing, SV) [115].

Az SW forma akkor alakul ki, ha az enzim aktivitása a normálisnak az 1%-át sem éri el. Ekkor az aldosteron hiányában felborul a szervezet só- és vízháztartása, súlyos nátrium- és ezáltal vízvesztés következik be. A kortizol hiánya miatt csökken a szív pumpafunkciója, így a glomerulusok szűrőfunkciója is, még erőteljesebb sóvesztést eredményezve. Kezeletlen állapotban a sóvesztő CAH a születést követő néhány héten belül hipovolémiás sokkot idéz elő. Az SV fenotípusban a legfőbb gond a virilizáció, hiszen a felhalmozódó szteroid prekursorok végül androgén hormonokká alakulnak. A nem klasszikus CAH nem jár szembeötlő tünetekkel, ugyanakkor például a termékenységre a betegség enyhébb formái is negatív hatással vannak [115, 116].

A CAH súlyosságát döntően a kisebb mértékben károsodott allél határozza meg; a genotípus-fenotípus korreláció 80% körüli [117, 118]. A betegség klasszikus változatainak hátterében elsősorban az aktív gén hiánya, a hem- illetve szubsztrát-közeli aminosavak cseréje vagy a fehérje másodlagos szerkezetét érintő hibák állnak. Nem-klasszikus CAH-ért főleg sztérikus problémát okozó aminosav-cserék illetve az enzimműködés szempontjából nem kiemelt aminosavak polaritásának változása a felelősek [96]. Hibás *CYP21A2* allélok csupán az egyik kromoszómájukon hordozó egyének klinikailag tünetmentesek, kortikoszteroid prekursoraik szintje nyugalomban normális, ACTH indukcióra átmenetet mutat a normál és a nem klasszikus CAH-ra jellemző tartomány között [119].

### ***1.5.7 A 21-hidroxiláz és a kardiovaszkuláris rendszer***

Miután a szteroid hormonok megfelelő termelődése és mobilizációja kulcsfontosságú lépés az adaptív stresszválasz során, a 21-hidroxiláz enzim aktivitását érintő mutációk befolyással bírnak ez utóbbi folyamatra is. Tekintve a stresszválasz zavarai és a kardiovaszkuláris betegségek kialakulása közötti szoros összefüggést, a hibás *CYP21A2* allélok valószínűsíthetően szív- és érrendszeri kórképekre hajlamosítanak [120]. Ezt a feltételezést több tanulmány is alátámasztja. A CAH-ban szenvedő egyéneknek az átlagosnál magasabb a vérnyomásuk, testzsír-arányuk és test-tömeg indexük, illetve alacsonyabb az inzulinnal szembeni rezisztenciájuk, amelyek mind rizikótényezők a keringési rendszer betegségeinek kialakulásában [121-123]. A CAH-os betegekben továbbá megnövekedett intima-media vastagságot figyeltek meg, ami az atherosclerosis kezdeti stádiumának jellemzője [124].

## 2 CÉLKITŰZÉSEK

Doktori munkám a *C4B\*Q0* haplotípusok hordozása és a kardiovaszkuláris betegségekre mutatott fokozott hajlam közti összefüggés mibenlétének feltárására irányult. Mivel a *C4B* gén termékének részleges vagy teljes hiánya nem ad magyarázatot a megfigyelt jelenségekre, a választ a genetikai kapcsoltságban kerestük. Tekintve, hogy a *C4* gének egy igen hosszán konzervált kromoszómaszakaszon helyezkednek el, a közvetlenül szomszédos területeken túl figyelembe kellett vennünk a távolabbi régiók esetleges szerepét is.

A konkrét célkitűzések a következők voltak:

1. A kaukázusi populációban előforduló MHC haplotípusok összetételének és gyakoriságának felmérése, illetve válaszkérés arra, hogy a *C4B* gén hiánya jellemzően egyazon, avagy több eltérő ősi, kiterjesztett MHC haplotípusban jelenik-e meg.
2. A kaukázusi populációban előforduló RCCX szerkezetek részletes jellemzése és annak vizsgálata, hogy a *C4B* gén hiánya társul-e valamely gyakori RCCX szerkezeti variánssal.
3. A *C4A* és *C4B* gének 35. intronjában található, *CYP2I* szabályozó régiók összehasonlítása, tekintettel arra, hogy az aktív *CYP2IA2* gén rendszerint *C4B*, míg a jelentősen alacsonyabb transzkripciós aktivitású *CYP2IA1P* pszeudogén rendszerint *C4A* gén után áll.
4. Nyugalmi és indukált kortikoszteroid hormonszintek összehasonlítása *C4B\*Q0* hordozók és nem-hordozók között, abból kiindulva, hogy a *C4* mellett található *CYP2IA2* gén polimorfizmusai közvetlen kihatással lehetnek a kortizol és az aldoszteron termelésére, így a stresszválásra is.

### 3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1 VIZSGÁLT SZEMÉLYEK

##### 3.1.1 *Az MHC haplotípusok és RCCX szerkezetek felméréséhez gyűjtött minták*

A hazai MHC haplotípusok és RCCX szerkezeti variánsok feltérképezése egy családvizsgálat keretei között zajlott, így az egyes polimorfizmusokat egyértelműen kromoszómához tudtuk rendelni. A mintagyűjtést az Országos Vérellátó Szolgálat Transzplantációs Immunológiai Laboratóriumában végezték, 49, kaukázusi populációba tartozó szülőpár és összesen 105 gyermekük (203 személy) részvételével. Minden családban volt egy csontvelő-transzplantációra váró leukémiás gyermek (a betegségük természete heterogén volt); a betegek szülei és testvérei egészségesek voltak. A tanulmányokban részt vevő összes személy (kiskorúak esetében a szülők) írásos beleegyezését adta mintája kutatási célokra való felhasználására.

A mintavétel reprezentatív voltának ellenőrzéséhez az eredményeket egy bostoni kaukázusi családvizsgálat eredményeihez mint kontroll adatbázishoz hasonlítottuk. A szülők minden esetben egészségesek voltak; míg a családok többségében legalább egy gyermek valamiféle betegségben szenvedett. Amennyiben ez a betegség az MHC régióval állt összefüggésben (pl. 1-es típusú cukorbetegség, rheumatoid arthritis, szisztémás lupus erythematosus, multiplex szklerózis, lisztérzékenység), az adott családban kizárólag azokat a haplotípusokat vettük figyelembe, amelyeket a szülők egyetlen beteg utódjukba sem örökítettek. Mindent összevetve a bostoni kontroll adatbázis összesen 2675 független (szülői) kromoszómáról tartalmazott információt.

##### 3.1.2 *A C4A és a C4B gének 35. intronbeli szekvenciájának összehasonlításához válogatott minták*

A C4A és a C4B gének 35. intronjában elhelyezkedő CYP21 regulációs szekvenciák összehasonlításához olyan egyéneket válogattunk össze, akik vagy egyetlen C4A vagy egyetlen C4B génkópiával sem rendelkeztek. A C4 génszámokat korábbi vizsgálatok során már több különböző, a munkacsoportunk által gyűjtött mintaanyagon is meghatároztuk, így egészségesekben [82, 83], 1-es típusú diabéteszesekben (nem publikált adatok), pneumónia eredetű szepszises betegekben [125, 126], valamint koro-

nária bypass műtéten [127] illetve myocardialis infarktuson átesetteken [84, 88]; összesen 1505 genetikailag független személyben.

### **3.1.3 *A C4B\*Q0 hordozás és a szteroid hormonszintek kapcsolatának vizsgálata során analizált minták***

A C4B\*Q0 hordozás és a szteroid hormonszintek közötti esetleges összefüggés felderítésére retrospektív vizsgálatot végeztünk 76 mellékvese incidentalómás beteg (11 férfi és 65 nő, koruk  $64,2 \pm 9,4$  év) bevonásával. A betegeket a Semmelweis Egyetem II. számú Belgyógyászati Klinikáján diagnosztizálták és követték nyomon átlagosan 9,1 (legalább 5 és legfeljebb 16) éven át. Beválogatási kritérium volt, hogy a tumor ne legyen hormontermelő, illetve rosszindulatú. A tumor méretére vonatkozóan 63 beteg esetében állt rendelkezésünkre információ, amit komputer tomográfiával és/ vagy hasi ultrahang vizsgálattal határoztak meg.

## **3.2 DNS IZOLÁLÁS**

A minták perifériás vérből származtak. A fehérvérsejtek DNS tartalmát hagyományos kisózásos módszerrel vontuk ki [128] az alábbiak szerint. 500 µl EDTA-val vagy heparinnal alvadásgátolt vérhez 1 ml vörösvértest lízis puffert mértünk, majd fél perces intenzív rázást követően maximális fordulatszámon lecentrifugáltuk azt. A felülúszót leöntöttük, a pelletként visszamaradt sejteket kétszer mostuk 1-1 ml desztillált vízzel. Ezután a sejteket 1% SDS-t tartalmazó proteináz K pufferben (0,075 M NaCl, 0,024 M EDTA) tártuk fel 0,75 mg/ml proteináz K enzimmel (Fermentas) 55°C-os vízfürdőben 30 percig. A minták szobahőmérsékletre hűlését követően 200 µl telített NaCl oldatot mértünk a lizátumra, és erőteljes rázás közepette kicsaptuk a fehérjéket. Majd maximális fordulatszámon 7 percig centrifugáltuk a mintákat, és a DNS-t tartalmazó felülúszót tiszta Eppendorf csőbe pipettáztuk át. A DNS-t 500 µl izopropanollal kicsaptuk, 500 µl 70%-os etanollal tisztítottuk, vákuum centrifugában 20 percig szárítottuk, végül 50-100 µl desztillált vízben oldottuk. (Ahol nincs másképp jelölve a vegyszereket a Sigma-Aldrich cégtől rendeltük.)

A családvizsgálatos minták esetében a DNS izolálás nagyobbik részben az Országos Vérellátó Szolgálat Transzplantációs Immunológiai Laboratóriumában történt

Puregene kereskedelmi kittel (Gentra), részben laboratóriumunkban a fent leírt módszerrel. A mellékvese incidentalómás betegcsoport esetében a DNS izolálást a Semmelweis Egyetem II. számú Belgyógyászati Klinikáján végezték. A tisztított DNS preparátumokat  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

### 3.3 GENETIKAI ANALÍZISEK

#### 3.3.1 *HLA-tipizálás*

A *HLA-A* és *HLA-B* allélok meghatározása szerológiai módszerrel történt HLA Ready Plate mikrolimfocita-toxicitási tesztek felhasználásával (Inno-Train). A *HLA-DRB1* és *HLA-DQB1* lokuszok alacsony felbontású vizsgálata polimeráz láncreakcióval valósult meg szekvencia-specifikus primerek alkalmazásával (Olerup SSP, GenoVision), közepes felbontású vizsgálatuk pedig reverz dot-blot technikával történt Inno-LiPa DRB és DQB kitékkel (Innogenetics). A HLA-tipizálást minden esetben az Országos Vérellátó Szolgálat Transzplantációs Immunológiai Laboratóriumában végezték.

#### 3.3.2 *SNP detektálás restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (RFLP) technikával*

Az RFLP módszerrel genotipizált polimorfizmusok közül az *LTA 252A>G* allélokot (rs909253) Seidemann [129], a *HSPA1B 1267A>G* variánsokat (rs1061581) Vargas-Alarcon [130], a *CFB S>F* (rs641153) alléljait Jahn [131], az *AGER -374T>A* SNP-t (rs1800624) pedig Hudson [132] módszere alapján detektáltuk. A PCR elegyek az alábbi összetevőket tartalmazták 10  $\mu\text{l}$ -es végtérfogatban:  $1\times$  HotStartTaq puffer (Qiagen), 0,2 mM dNTP (Fermentas), 1-1  $\mu\text{M}$  a megfelelő forward és reverse primerekből (3. táblázat), 2-5 ng DNS templát, 0,025 U/ $\mu\text{l}$  HotStartTaq polimeráz (Qiagen), valamint a 3. táblázatban jelzett koncentrációjú  $\text{MgCl}_2$  és/ vagy Q oldat (Qiagen). A termociklusok egy  $95^{\circ}\text{C}$ -on 15 percig zajló kezdeti denaturációs lépéssel indultak, amit 35 cikusból álló DNS amplifikálás követett [denaturálás:  $94^{\circ}\text{C}$  30 s, anellálás: 30 s a megfelelő hőmérsékleten (3. táblázat), elongáció:  $72^{\circ}\text{C}$  1 perc], majd a reakciót a  $72^{\circ}\text{C}$ -on 7 percig tartó végső extenzió zárta.

**3. táblázat: A PCR reakciók eltérései az RFLP technikával vizsgált SNP-k esetében**

	MgCl <sub>2</sub>	Q oldat	Forward primer	Reverse primer	Anellálási hőmérséklet
<i>LTA</i> <i>252A&gt;G</i>	6,25 mM	-	5' CTC CTG CAC CTG CTG CCT GGA TC 3'	5' GAA GAG ACG TTC AGG TGG TGT CAT 3'	56°C
<i>HSPA1B</i> <i>1267A&gt;G</i>	-	1x	5' CAT CGA CTT CTA CAC GTC CA 3'	5' CAA AGT CCT TGA GTC CCA AC 3'	58°C
<i>CFB</i> <i>S&gt;F</i>	6,25 mM	1x	5' GCC TCT TGT CTG GAG GTA AG 3'	5' GCA CAG GGT ACG GGT AGA AG 3'	58°C
<i>AGER</i> <i>-374T&gt;A</i>	-	1x	5' TAG GGA GAG GGA GGA GGT TGC 3'	5' TCA GAG CCC CCG ATC CTA TTT 3'	62°C

Az amplikonok restrikciós endonukleázzal történő emésztését 37°C-on végeztük minimum 4 órán, de legfeljebb egész éjszakán át tartó inkubációval. Az *LTA 252A>G* allélok meghatározásához *StyI* (Fermentas), a *HSPA1B 1267A>G* allélokéhoz *PstI* (Fermentas), a *CFB S>F* allélokéhoz pedig *MspI* enzimet (New England Biolabs) alkalmaztunk. A keletkezett hasítási termékeket 1 µg/ml etídium-bromidot tartalmazó, 3%-os (a *HSPA1B 1267A>G* variáció vizsgálatokor 2%-os) SeaKem agaróz gélen (Lonza) választottuk el. A gélelektroforézis 100 V feszültségen (6,7 V/cm térerő alkalmazásával) történt átlagosan 45 percig. Az etídium-bromiddal jelölt DNS fragmentumokat UV fényvel detektáltuk Chemigenious2 rendszerben. Az egyes allélokhoz tartozó emésztési fragmentumok méretét a 4. táblázat tartalmazza.

**4. táblázat: Az emésztési termékek hossza az RFLP technikával vizsgált polimorfizmusok esetében**

	Vad típus	Heterozigóta	Homozigóta variáns	Emésztési kontroll
<i>LTA</i> <i>252A&gt;G</i>	140 bp	51, 89 és 140 bp	51 és 89 bp	45 és 184 bp
<i>HSPA1B</i> <i>1267A&gt;G</i>	1117 bp	181, 936 és 1117 bp	181 és 936 bp	-
<i>CFB</i> <i>S&gt;F</i>	120 és 132 bp	120, 132 és 252 bp	252 bp	-
<i>AGER</i> <i>-374T&gt;A</i>	110 és 130 bp	110, 130 és 240 bp	240 bp	29 és 269 bp



### 3.3.3 SNP meghatározás TaqMan technikával

Taqman-próbán alapuló alléldiszkriminációval két promóter polimorfizmust detektáltunk: az *AGER* -429T>C (rs1800625) és a *TNF* -308G>A (rs1800629) SNP-t. Előbbit a munkacsoportunk által kidolgozott módszerrel határoztuk meg [133], utóbbit gyári genotipizáló kittel. A reakciók 10 µl-es végtérfogatban zajlottak, 1× PCR Mix (Fermentas) és 2-5 ng genomialis DNS templát felhasználásával. A reakcióelegy ezenfelül tartalmazott még az *AGER* -429T>C variáció vizsgálata esetében 1× TaqMan SNP Genotyping Assay-t (Applied Biosystems; Assay ID: C\_8848033\_1), illetve a *TNF* -308G>A polimorfizmus analizálása során 0,3 µM forward (5' CAA AAG AAA TGG AGG CAA TAG GTT 3') és 0,3 µM reverse (5' GGC CAC TGA CTG ATT TGT GTG T 3') primert, 0,2 µM FAM jelölésű, a 308A allélra specifikus próbát (5' AAC CCC GTC CTC ATG 3') és 0,2 µM VIC jelölésű, a 308G allélra specifikus próbát (5' AAC CCC GTC CCC ATG 3'). (A két próba közötti különbség vastag aláhúzott betűvel van kiemelve.) A termociklusok egy 10 perces, 95°C-on zajló inkubációs lépéssel indultak, majd 35 kétlépéses ciklus (*AGER* -429T>C: 92°C 15 s és 60°C 1 perc; *TNF* -308G>A: 95°C 15 s és 58,5°C 1 perc) következett. A DNS amplifikálást (a génkópia-szám mérésekhez hasonlóan) ABI 7300 Real Time PCR rendszerben végeztük a Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológia és Patobiokémiai Intézetében, Dr. Sasvári Mária laboratóriumában. A genotípusok meghatározásánál figyelembe vettük az extenziós lépések során rögzített fluoreszcencia intenzitás értékekből kirajzolódó kinetikus görbék lefutását és a reakció végén az elongációs hőmérsékleten mért fluoreszcencia értékek alapján felvett scatter plot ábrát is.

### 3.3.4 Génkópia-szám mérések

A különböző *C4* génvariánsok (*C4A*, *C4B*, *C4L*, *C4S*) valamint a *CYP21* aktív és pszeudogének kópiaszámát real-time PCR módszerrel határoztuk meg TaqMan-próba felhasználásával. A *C4A* és *C4B* génszámokat a munkacsoportunk által kifejlesztett technikával detektáltuk [134], a *C4* gén hosszú és rövid változatának kópiaszámát Wu leírása alapján [135]. A *CYP21A2* és *CYP21A1P* gének számát egy újonnan beállított házi módszerrel mértük. A *C4A* és a *C4B* génre tervezett próbák az összesen öt izotípus-specifikus nukleotidból négyet tartalmaztak. A *CYP21A2* és a *CYP21A1P* gének

elkülönítése a pszeudogén 3. exonjában található 8 bázispáros deléció alapján; az aktív génen tapadó próba tartalmazta ezt a szakaszt, míg a pszeudogénre specifikus az azt határoló szekvenciákból állt. A *C4L* és *C4S* génszámok mérése során a próbák azonosak voltak, a különbség a reverse primerekben állt. Ez a hosszú génvariáns esetében a HERV-K(C4) szekvenciára volt specifikus, a rövid gén esetében – a *C4L* gén egyidejű felszorzódását elkerülendő – a tapadási pontja a retrovírus inszerciós helyéhez képest downstream irányban helyezkedett el. Ugyan a DNS szintézis így is megindulhatott mindkét irányból a *C4L* génről is, PCR termék mégsem keletkezhetett, mivel a retrovírust is tartalmazó szekvencia teljes másolására nem jutott elég idő. A génszámok megállapításához referenciául az *RNázP* háztartási (housekeeping) gén szolgált.

**5. táblázat: A génkópia-számok meghatározásához alkalmazott primer és próba szekvenciák és mennyiségek**

	Szekvencia	Mennyiség
<b><i>C4A/ C4B</i> mérés</b>		
Közös forward primer	5' GCA GGA GAC ATC TAA CTG GCT TCT 3'	0,3µM
Közös reverse primer	5' CCG CAC CTG CAT GCT CCT 3'	0,3 µM
<i>C4A</i> próba	5' ACC CCT GTC CAG TGT TAG 3'	0,2 µM
<i>C4B</i> próba	5' ACC TCT CTC CAG TGA TAC 3'	0,2 µM
<b><i>CYP21A2/ CYP21A1P</i> mérés</b>		
Közös forward primer	5' CTC CTC CTG CAG ACA AGC TG 3'	0,3 µM
Közös reverse primer	5' AGC TTC TTG TGG GCT TTC CA 3'	0,3 µM
<i>CYP21A2</i> próba	5' CCT TGG GAG ACT ACT C 3'	0,2 µM
<i>CYP21A1P</i> próba	5' CGG ACC TGT CGT TGG TCT CTG 3'	0,2 µM
<b><i>C4L/ C4S</i> mérés</b>		
Közös forward primer	5' TTG CTC GTT CTG CTC ATT CCT T 3'	0,5 µM
<i>C4L</i> reverse primer	5' GTT GAG GCT GGT CCC CAA CA 3'	0,5 µM
<i>C4S</i> reverse primer	5' GGC GCA GGC TGC TGT ATT 3'	0,5 µM
Közös próba	5' CTC-CTC CAG TGG ACA TG 3'	0,2 µM

A reakcióelegyek végtérfogata a *C4A* és *C4B* gének mérése esetében 25 µl, egyébként 20 µl volt. Összetevőik az alábbiak szerint alakultak: a detektálandó génnek

megfelelő forward és reverse primer, valamint FAM festékkel jelölt próba (5. táblázat), 1× (a *C4L* és *C4S* gének esetében 0,5×) VIC festékkel jelölt RNase Detection Mix (Applied Biosystems), 1× TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) vagy a *C4* hossz-variánsok vizsgálata során 1× Maxima™ Probe/Rox Master Mix (Fermentas) és 10-15 ng genomiális DNS templát.

Mintánként 3-3 párhuzamos mérést végeztük. A termociklusok egy 95°C-on zajló 10 perces inkubációval indultak, amit 35 ciklus követett: DNS denaturálás 95°C 15 s, anellálás/ elongáció 60°C 40 s (a *C4S* gének amplifikálása során 65°C 35 s). A fluoreszcencia intenzitás értékek rögzítése a termociklusok során az elongációs lépések alatt történt. Az egyes gének kópiaszámát ( $n_x$ ) a munkacsoportunk részvételével kidolgozott programmal [134] számítottuk ki, az alábbi egyenlet alapján:

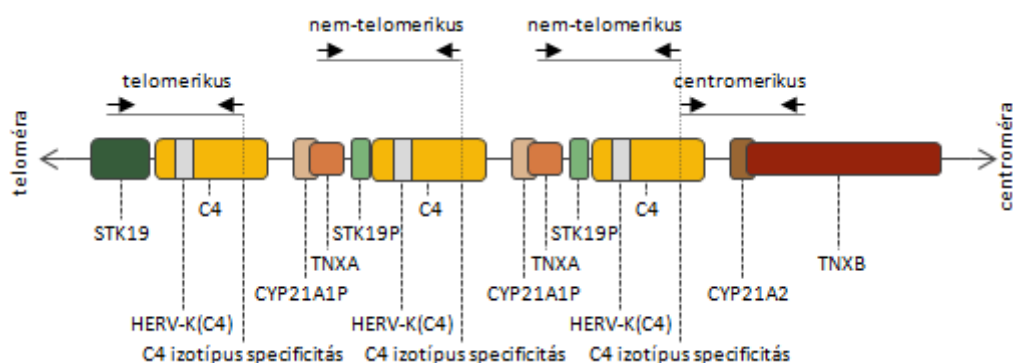
$$n_x = \frac{2^{C_{T(R)} - C_{T(X)} + 1}}{q_{X:R}}$$

A valódi génszámokat az  $n_x$  értékek kerekítésével kapjuk meg. Az egyenletben a  $C_{T(R)}$  illetve  $C_{T(X)}$  jelölés a referencia (*RNáz P*) és a mérendő gén amplifikációjának küszöbciklus-értékére vonatkozik;  $q_{X:R}$ : a vizsgálandó génre specifikus próba és a referencia próba hatékonysági hányadosa.

### 3.3.5 Allélspecifikus long PCR reakciók

Az RCCX struktúrák pontosabb karakterizálása végett munkacsoportunk több kilobázis hosszúságú DNS szakaszok amplifikálására alkalmas, ún. allélspecifikus long PCR reakciókat dolgozott ki. Így lehetőség nyílt annak vizsgálatára, hogy az RCCX szerkezetek adott pozíciójú moduljai milyen *C4* gént tartalmaznak. A telomerikus (legelső pozícióban található) RCCX modul *C4* génjének karakterizálásához a forward primert az aktív *STK19* génre, a reverse primert pedig a *C4A* illetve a *C4B* génre terveztük. A centromerikus *C4* gén vizsgálata során a forward primer volt specifikus a *C4A* illetve a *C4B* génre, míg a reverse primer az aktív *TNXB* génen tapadt. Trimoduláris szerkezetek esetében elvégeztünk egy, a nem-telomerikus pozíciójú *C4* gének hosszúságának kimutatására alkalmas mérést is. Ekkor a *TNXA* pszeudogénre specifikus forward primert alkalmaztunk a *C4A* illetve a *C4B* génre specifikus reverse

primer mellett. Azon reakciók esetében, ahol a reverse primerek voltak allélspecifikusak, a keletkező ampikon lefedte a HERV-K(C4) szekvencia inszerciós helyét, így az adott *C4* gén hossza is kimutathatóvá vált. (13. ábra)



**13. ábra: Az allélspecifikus long PCR módszerrel ampifikált DNS szakaszok lokalizációja**

Az egyes reakcióelegyek végtérfogata minden esetben 10  $\mu$ l volt. Összetételük az alábbiak szerint alakult: 0,3  $\mu$ M dNTP (Fermentas), 0,4  $\mu$ M forward és 0,4  $\mu$ M reverse primer (6. táblázat), 1 unit LongAmpTaq DNS polimeráz (New England Biolabs), 1 $\times$  LongAmp Taq puffer (New England Biolabs) és 5-10 ng (a centromerikus *C4A* gén kimutatása során 30 ng) DNS templát.

**6. táblázat: Az allélspecifikus long PCR reakciók során alkalmazott primerek szekvenciái**

<b>Telomerikus RCCX modul vizsgálata</b>	
Közös forward primer	5' TGC CCG TGT TTC TGG AGA CTT GTG 3'
<i>C4A</i> specifikus reverse primer	5' CGC ACC TGC ATG CTC CTG TCT AAC 3'
<i>C4B</i> specifikus reverse primer	5' CCG CAC CTG CAT GCT CCT ATG TAT C 3'
<b>Centromerikus RCCX modul vizsgálata</b>	
Közös reverse primer	5' GCA GCA TGT GAC TAA GAG CTT TCC 3'
<i>C4A</i> specifikus forward primer	5' AGG ACC CCT GTC CAG TGT TAG ACA 3'
<i>C4B</i> specifikus forward primer	5' CCA GGA CCT CTC TCC AGT GAT ACA TA 3'
<b>Nem-telomerikus RCCX modul(ok) vizsgálata</b>	
Közös forward primer	5' GTG GAA CTG GCT GGT TGA GGT GAC T 3'
<i>C4A</i> specifikus reverse primer	5' CGC ACC TGC ATG CTC CTG TCT AAC 3'
<i>C4B</i> specifikus reverse primer	5' CCG CAC CTG CAT GCT CCT ATG TAT C 3'

A termociklusok kezdeti denaturációs lépése 95°C-on 1 percig tartott, majd 30 (a centromerikus *C4* gének vizsgálata esetében 32) amplifikációs ciklus következett, végül a reakció egy, az elongációs lépéssel megegyező végső extenzióval zárult. Az amplifikációs ciklusok a következő lépésekből álltak: DNS denaturáció 95°C 10 s, anellálás 64°C (a nem-telomerikus *C4* gének amplifikálásakor 66 °C) 5 s, elongáció 68°C 13 perc 30 s (a centromerikus *C4* gének amplifikálásakor 15 perc). A PCR termékeket 1 µg/ml etídium-bromidot tartalmazó, 1,5% töménységű NuSieve agaróz gélen (Lonza) futtattuk 60 V feszültségen 90 percig.

Az amplikonok méretéből fakadóan a jelen módszerek kizárólag ép, még részlegesen sem degradálódott DNS-en végezhetőek el. Emiatt a reakciókat megelőzően minden esetben gélelektroforézissel (1,5% NuSieve agaróz gélen (Lonza), 35 V feszültségen 150 percig futtatva) ellenőriztük a minták minőségét.

### **3.3.6 A *C4* gének 35. intronjának szekvenálása**

A *C4* gének 35. intronbeli szekvenciájának amplifikálása az 5' GGA GGG AAC GTA AGA AAT GAC CAG 3' (forward) és az 5' CTC ACC GGG GTT GTA GTA GTC GTA 3' (reverse) primerekkel történt az alábbiak szerint. Kezdeti denaturáció: 95°C 15 perc, DNS amplifikálás (35 ciklus): 94°C 30 s, 58°C 40 s, 72°C 1 perc, végső extenzió: 72°C 10 perc. A reakcióelegyek 0,2 mM dNTP-t (Fermentas), 1× HotStartTaq puffert (Qiagen), 1× Q oldatot (Qiagen), 0,8-0,8 µM primert, 0,025 U/µl HotStartTaq DNS polimerázt (Qiagen) és kb. 15 ng DNS templátot tartalmaztak 50 µl végtérfogatban. A reakciót követően – az esetleges aspecifikus termékek keletkezését ellenőrizendő – mintánként 5-5 µl PCR terméket megfuttattunk 2% SeaKem agaróz gélen (Lonza). A DNS szekvenálást a Szegedi Biológiai Központban végezték. A PCR termékek szekvenálása mindkét irányból megtörtént. Az egyes kromatogramokat CLC DNA Workbench 5.6.1 szoftverrel elemeztük és hasonlítottuk össze.

### 3.4 A SZTEROID HORMONOK KONCENTRÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA

A mellékvese incidentalómás betegekben mért nyugalmi és indukált hormonkoncentrációk dr. Patócs Attila jóvoltából a Semmelweis Egyetem II. számú Belgyógyászati Klinikáján rendelkezésünkre álltak.

#### 3.4.1 Nyugalmi hormonszint meghatározások

A nyugalmi szérumban kortizol, illetve plazma aldoszteron, 17-hidroxi-progeszteron és kortikoszteron szinteket reggel 08:00 és 09:00 óra között mérték, nyugodt éjszakai alvást követően. Az aldoszteron és a kortizol szintjét elektrokemilumineszcens immunszéssel vizsgálták (Elecsys, Roche Diagnostics) Cobas E411 (Roche Diagnostics) analizátoron, a 17-hidroxi-progeszteron és a kortikoszteron mennyiségét pedig házilag beállított radioimmunszé (RIA) módszerrel [136-138].

#### 3.4.2 ACTH stimuláció és dexametazon teszt

Az ACTH stimuláció egy dózis szintetikus ACTH analóg (1 mg Cortrosyn injekció) intramuszkuláris beadásával valósult meg. A dexametazont (1 mg) a betegek orálisan vették be éjjel 24:00 órakor, majd a másnap reggeli (8:00 és 9:00 óra között) vérvételt követően a plazma kortizol szintjének meghatározása gyári elektrokemilumineszcens immunszéssel (Elecsys E170, Roche Diagnostics) történt.

### 3.5 STATISZTIKAI ELEMZÉS

#### 3.5.1 A magyarországi MHC haplotípusok és RCCX szerkezetek elemzése

A Magyarországon és Bostonban előforduló ősi MHC haplotípusok gyakoriságának összehasonlításához a GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc.) statisztikai programot használtuk. A kategorikus értékek elemzéséhez  $\chi^2$  tesztet végeztünk. A korrelációs együtthatót és annak szignifikancia értékét Pearson-teszttel határoztuk meg. A Hardy-Weinberg egyensúlyt a Fisher-féle egzakt teszten alapuló Arlequin 3.1 szoftverrel [139] vizsgáltuk.

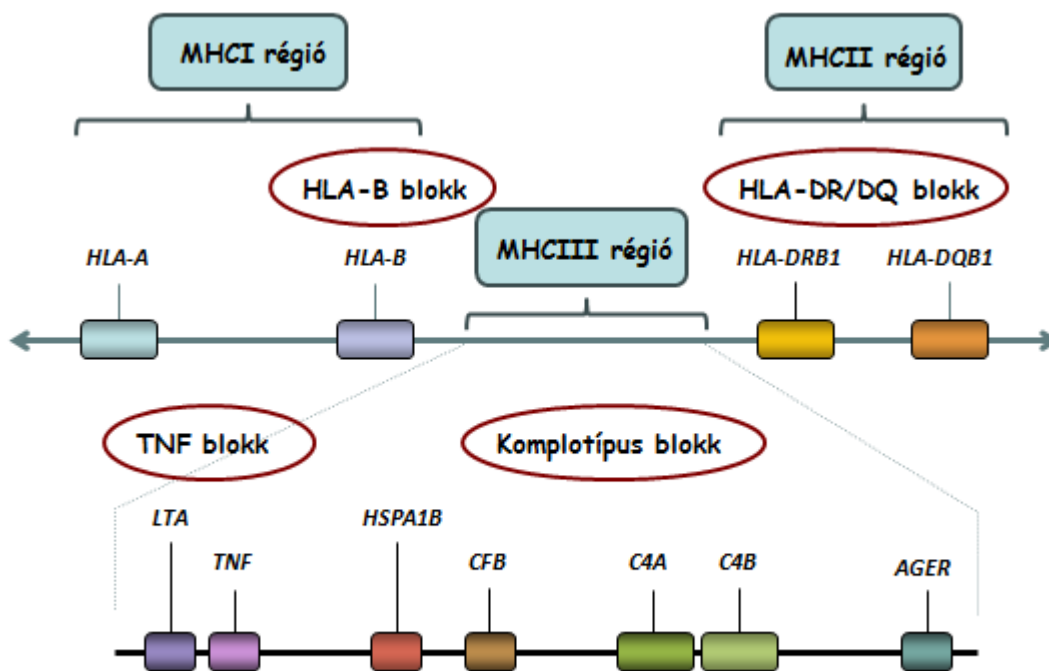
### **3.5.2 *A C4B\*Q0 hordozás és a szteroid hormonszintek kapcsolatának vizsgálata***

A szteroid hormonszintek összehasonlításakor a statisztikai analízist GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc.) és SPSS 13.0 (SPSS Inc.) szoftverekkel végeztük. Az egyes csoportok közötti eltéréseket Mann-Whitney teszttel, illetve párosított összehasonlítások esetében Wilcoxon próbával elemeztük. A kortizol, az aldoszteron és a kortikoszteron esetében az optimális szenzitivitással és specificitással rendelkező vágópontokat ROC analízissel állapítottuk meg. A *C4B* gének száma és az egyes hormonok koncentrációja közötti összefüggéseket logisztikus regressziós analízissel számoltuk. Többszörös összehasonlítást nem végeztünk. Minden próba kétoldalas volt. A különbségeket  $p < 0,05$  értékek esetében tekintettük szignifikánsnak.

## 4 EREDMÉNYEK

### 4.1 MHC HAPLOTÍPUSOK ÉS A C4B\*Q0 HORDOZÁS

Az MHC haplotípusok és a C4B\*Q0 hordozás viszonyának felderítéséhez 49, kaukázusi populációba tartozó magyar család (apa, anya és gyerekeik) összesen 203 tagjának DNS-ét elemeztük. A vizsgált egyének bizonyos *HLA*-adatai (*HLA-A*, *-B*, *-DQB1*, *-DRB1*) a mintákat gyűjtő Országos Vérellátó Szolgálat révén eleve rendelkezésünkre álltak. A haplotípusok részletesebb jellemzése végett a *C4A* és *C4B* génszámokon túl minden személyben meghatároztuk a centrális MHC régióban található *LTA* 252A>G (rs909253), *TNF* -308G>A (rs1800629), *HSPA1B* 1267A>G (rs1061581), *CFB* S>F (rs641153), *AGER* -429T>C (rs1800625) és *AGER* -374T>A (rs1800624) polimorfizmusokat is (14. ábra). Három családban a csontvelő-transzplantációra váró gyermektől nem állt rendelkezésre megfelelő mennyiségű DNS, így esetükben egyedül a *HLA*-allélok tipizálása történt meg.



14. ábra: Az MHC haplotípusok elemzéséhez vizsgált polimorfizmusokat tartalmazó gének egymáshoz viszonyított elhelyezkedése



#### 4.1.1 A vizsgált SNP-k allélfrekvenciái

A családvizsgálat során analizált valamennyi SNP genotípus eloszlása Hardy-Weinberg egyensúlyban volt. Az egyes allélok szülői genotípusok alapján számolt gyakorisága a 7. táblázatban látható.

**7. táblázat: Az MHC haplotípusok vizsgálatakor analizált SNP-k allélfrekvenciái a hazai kaukázusi populációban**

	Genetikailag független személyek			Allélgyakoriság		Hardy-Weinberg egyensúly p érték
	Homozigóta vad típus	Heterozigóta	Homozigóta variáns	Vad	Variáns	
<i>LTA</i> <i>252A&gt;G</i>	49 (50,0%)	44 (44,9%)	5 (5,1%)	72,4%	27,6%	0,311
<i>TNF</i> <i>-308G&gt;A</i>	79 (80,6%)	19 (19,4%)	0 (0,0%)	90,3%	9,7%	0,593
<i>HSPA1B</i> <i>1267A&gt;G</i>	34 (34,7%)	48 (49,0%)	16 (16,3%)	59,2%	40,8%	0,998
<i>CFB S&gt;F</i>	61 (62,2%)	34 (34,7%)	3 (3,1%)	79,6%	20,4%	0,756
<i>AGER</i> <i>-429T&gt;C</i>	75* (76,5%)	20 (20,4%)	3 (3,1%)	86,7%	13,3%	0,453
<i>AGER</i> <i>-374T&gt;A</i>	39* (39,8%)	41 (41,8%)	18 (18,4%)	60,5%	39,5%	0,332

\* Az egyik egyén egyik *AGER* génje a vizsgált szakaszt tekintve deléciós variáns volt

#### 4.1.2 A vizsgált haplotípusok és összeillesztésük

Az egyes haplotípusokat az eredetileg diploid állapotra vonatkozó genetikai analízisek eredményeiből kiindulva a családon belüli öröklődés alapján, az összes vizsgált marker egyidejű figyelembevételével állítottuk fel. Az egyes genomokban azonosított *HLA*-allélokot és a *C4A/C4B* génszámokat kivétel nélkül egyértelműen egy adott kromoszómához tudtuk kötni, az SNP-k esetében ez nem minden esetben valósult meg. A különböző haplotípusok gyakoriságának felmérésekor egyedül az egymástól genetikailag független, szülői kromoszómákat vettük számításba. Mivel a vizsgált populációban a gamétaképzés során négy esetben bizonyíthatóan átkereszteződés (crossing over) történt a *HLA-A* és *HLA-DQB1* gének közötti szakaszon (8. táblázat), az ezen eseményekben érintett nyolc kromoszómát kizártuk a tanulmányból. Ennek megfelelően végül 188 független haplotípust tudtunk értékelni.

8. táblázat: Átkeresztződés nyomai a *HLA-A* és *-DQB1* közötti kromoszómaszakaszon a 49 vizsgált kaukázusi családban

	<i>HLA-A</i>	<i>HLA-B</i>	<i>LTA 252A&gt;G</i>	<i>TNF -308G&gt;A</i>	<i>HSPA1B 1267A&gt;G</i>	<i>CFB S&gt;F</i>	<i>C4A</i> génszám	<i>C4B</i> génszám	<i>AGER -429T&gt;C</i>	<i>AGER -374T&gt;A</i>	<i>HLA-DRBI</i>	<i>HLA-DQB1</i>	Kromoszóma
<b>5. család</b>													
Apa	2	62	A	G	A	S	1	1	T	A	11	6	A
	24	51	A	G	A	F	2	0	T	T	13	7	B
Anya	23	49	G	G	A	S	1	1	T	A	11	7	C
	2	49	A	G	A	S	1	1	T	A	11	7	D
Gyerek 1	2	62	A	G	A	S	1	1	T	A	11	6	A/B?
	23	49	G	G	A	S	1	1	T	A	11	7	C
Gyerek 2	24	51	A	G	A	F	2	0	T	T	13	6	A/B?
	23	49	G	G	A	S	1	1	T	A	11	7	C
<b>13. család</b>													
Apa	28	51	A	G	A	F	1	1	T	A	11	7	A
	3	14	A	G	G	S	1	2	T	T	4	8	B
Anya	2	51	G	G	A	S	1	1	T	A	15	6	C
	32	27	A	G	A	S	1	1	T	T	10	5	D
Gyerek 1	28	51	A	G	A	F	1	1	T	A	11	7	A
	2	51	G	G	A	S	1	1	T	A	15	6	C/D?
Gyerek 2	28	51	A	G	A	F	1	1	T	A	11	7	A
	2	27	G	G	A	S	1	1	T	A	10	5	C/D?
<b>41. család</b>													
Apa	29	62	G	G	A	S	1	1	T	A	4	8	A
	24	35	G	G	A	S	1	1	T	T	11	7	B
Anya	11	35	A	G	A	S	1	1	T	T	11	7	C
	31	51	G	G	G	S	1	1	T	T	4	4	D
Gyerek 1	29	62	G	G	A	S	1	1	T	A	4	8	A
	11	35	A	G	A	S	1	1	T	T	11	7	C/D?
Gyerek 2	24	35	G	G	A	S	1	1	T	T	11	7	B
	31	51	G	G	G	S	1	1	T	T	11	7	C/D?
<b>47. család</b>													
Apa	2	62	A	G	A	S	1	1	T	A	4	8	A
	11	35	A	G	A	S	1	0	T	T	7	2	B
Anya	3	7	A	G	A	S	1	1	T	T	16	5	C
	23	44	A	G	G	F	1	1	T	T	7	2	D
Gyerek 1	2	62	A	G	A	S	1	1	T	A	4	8	A
	3	7	A	G	A	S	1	1	T	T	16	5	C/D?
Gyerek 2*	11	35									7	2	B
	23	44									16	5	C/D?

\* A csillaggal jelölt gyermek esetében csupán a *HLA*-allélokról állt rendelkezésünkre információ

#### 4.1.3 A hazai kaukázusi populációban előforduló MHC haplotípusok

A 188 tanulmányozott kromoszóma közül 58 valamely nemzetközileg elismert ősi MHC haplotípust hordozta, 31 olyan MHC haplotípust tartalmazott, amely ugyan nem tartozott a nyilvántartott ősi haplotípusok közé, de a vizsgált populációban legalább kétszer fordult elő, míg a maradék 99 kromoszóma esetében egyedi allélkombinációkat figyelhettünk meg az MHC régióban. Az ősi MHC haplotípusokba sorolás az International Histocompatibility Workgroup (IHWG) referencia sejtvonalaikat leíró, átfogó tanulmány által megadott adatok szerint történt [19], a *HLA-B*, *-DRB1* és *-DQB1* allélok, a *C4A/C4B* génszámok és az *LTA 252A>G*, *HSPA1B 1267A>G* és *CFB S>F* allélok alapján. Az IHWG által elfogadott 37 ősi MHC haplotípus közül tizenhetet sikerült azonosítani a vizsgált populációban (9. táblázat).

**9. táblázat: A nemzetközileg elismert ősi MHC haplotípusok előfordulása a hazai kaukázusi populációban**

Ősi haplotípus	Hordozók száma	<i>HLA-A</i>	<i>HLA-B</i>	<i>LTA 252A&gt;G</i>	<i>TNF -308G&gt;A</i>	<i>HSPA1B 1267A&gt;G</i>	<i>CFB S&gt;F</i>	<i>C4A</i> génszám	<i>C4B</i> génszám	<i>AGER -429T&gt;C</i>	<i>AGER -374T&gt;A</i>	<i>HLA-DRB1</i>	<i>HLA-DQB1</i>
AH7.1	8	3, 2, 11	7	A	G	A	S	1	1	T	T	15	6
AH8.1	11	1, 2, 3, 24, 25	8	G	A	G	S	0	1	C	T	3	2
AH13.1	5	2, 3, 11, 29	13	A	G	G	S	1	1	C	T	7	2
AH14.2	4	33, 24, 28	14	A	G	G	S	1	2	T	T	1	5
AH18.1	1	25	18	A	G	A	S	1	1	T	T	15	6
AH18.2	1	30	18	A	G	G	S	1	0	T	T	3	2
AH18.3	3	2, 25	18	A	G	A	S	1	1	T	A	11	7
AH35.3	1	11	35	A	G	A	S	2	0	T	T	1	5
AH35.5	4	1, 11, 29	35	G	G	A	S	1	1	T	A	11	7
AH35.4	2	24, 28	35	A	G	A	S	1	1	T	A	11	7
AH38.1	3	26	38	A	G	A	S	1	1	T	A	4	8
AH44.2	2	23, 11	44	A	G	G	F	1	1	T	T	7	2
AH52.1	3	2, 11, 24	52	A	G	A	S	2	0	T	T	15	6
AH55.1	1	11	55	A	G	G	S	1	1	T	T	14	5
AH57.1	3	1, 2, 25	57	A	G	A	S	1	1	C	T	7	9
AH62.1	1	2	62	A	G	A	S	1	1	T	A	4	8
AH62.2	2	2	62	A	G	G	S	1	1	T	A	4	8

Ezenkívül a vizsgált haplotípusok között 13 olyan is szerepelt, amely nem tartozik ugyan az IHWG által elfogadottak közé, ám legalább két egymással nem rokon személyben jelen volt (10. táblázat). Közülük kettő csupán egyetlen SNP-ben tért el egy-egy IHWG által elismert ősi haplotípustól a vizsgált markerek tekintetében. Az egyik az általunk 35.var(C)-ként jelölt haplotípus volt, amely az AH35.2-től az *LTA* 252 allélban különbözött, míg a 44.var(A) a *HSPA1B* allélra nézve tért el az AH44.2-től. (Jelen vizsgálati populációban sem az AH35.2, sem az AH44.2 nem fordult elő standard formában.) Mivel a nemzetközi gyakorlat szerint az adott populációban legalább 1%-os gyakorisággal előforduló MHC haplotípusok már ősinek számítanak, ezért ezek a kiterjesztett haplotípusok is ősinek tekinthetők.

**10. táblázat: Ismételten előforduló, nem elismert ősi MHC haplotípusok**

Haplotípus	Hordozók száma	<i>HLA-A</i>	<i>HLA-B</i>	<i>LTA</i> 252A>G	<i>TNF</i> -308G>A	<i>HSPA1B</i> 1267A>G	<i>CFB</i> S>F	<i>C4A</i> génszám	<i>C4B</i> génszám	<i>AGER</i> -429T>C	<i>AGER</i> -374T>A	<i>HLA-DRBI</i>	<i>HLA-DQBI</i>
<b>7.var(A)</b>	2	3, 24	7	A	G	A	S	1	1	T	A	11	7
<b>35.var(A)</b>	2	11, 31	35	A	G	A	S	1	1	T	A	16	5
<b>35.var(B)</b>	2	2, 3	35	A	G	G	F	2	0	T	T	11	7
<b>35.var(C)</b>	2	2, 3	35	A	G	G	F	2	0	T	T	1	5
<b>35.var(D)</b>	2	28	35	A	G	A	S	1	1	T	A	8	8
<b>35.var(E)</b>	2	2	35	A	G	G	F	1	1	T	A	14	6
<b>38.var(A)</b>	6	2, 26	38	A	G	A	S	1	1	T	A	13	6
<b>39.var(A)</b>	2	1, 24	39	G	G	G	S	1	1	T	A	8	4
<b>39.var(B)</b>	2	2	39	A	G	A	S	1	1	T	A	16	5
<b>44.var(A)</b>	3	23, 29	44	A	G	A	F	1	1	T	T	7	2
<b>44.var(B)</b>	2	2, 26	44	G	A	A	S	1	1	T	A	11	7
<b>48.var(A)</b>	2	2, 24	48	A	G	A	S	1	1	T	T	12	7
<b>49.var(A)</b>	2	23, 33	49	G	G	A	S	1	1	T	T	11	7

Az általunk elsőként leírt konzervált haplotípusok között négy olyan található, amelynek maga a névadó *HLA-B* allélja sem fordult még elő az IHWG által idáig elismert ősi haplotípusok egyikében sem [39.var(A) és 39.var(B), 48.var(A), 49.var(A)]. Ugyanakkor *HLA-B7*-et -*B35*-öt, -*B38*-at és -*B44*-et tartalmazó elismert ősi haplotípus(oka)t már leírtak.

A fentiekén túl három olyan MHC haplotípust is azonosítottunk, amelyek bár a *HLA*-allélok tekintetében megegyeztek valamely nemzetközileg elismert ősi haplotípussal, de azoktól legalább a *C4A/C4B* génszámokban eltértek, és a vizsgált populációban csak egy példányban fordultak elő (11. táblázat). Olyan, a jelen mintákban csupán egy kópiában fellelhető haplotípust nem találtunk, amely valamely elismert ősi haplotípustól kizárólag SNP-kben különbözött volna.

**11. táblázat: Az IHWG által elismert MHC haplotípusoktól *C4* génszámokban eltérő, egy kópiában előforduló haplotípusok**

Haplotípus	<i>HLA-A</i>	<i>HLA-B</i>	<i>LTA 252A&gt;G</i>	<i>TNF -308G&gt;A</i>	<i>HSPA1B 1267A&gt;G</i>	<i>CFB S&gt;F</i>	<i>C4A</i> génszám	<i>C4B</i> génszám	<i>AGER -429T&gt;C</i>	<i>AGER -374T&gt;A</i>	<i>HLA-DRBI</i>	<i>HLA-DQBI</i>
<b>AH8.1</b>	1	8	G	A	G	S	0	1	C	T	3	2
(minta: 46/a)	24	8	G	G	A	F	1	1	T	T	3	2
<b>AH35.3</b>	11, 30	35	A	G	A	S	2	0	T	T	1	5
(minta: 28/b)	2	35	A	G	A	S	1	0	T	T	1	5
<b>AH44.1</b>	2	44	G	-#	A	S	1	1	-#	-#	4	7
(minta: 26/b)	2	44	G	G	A	S	2	0	T	T*	4	7

\* A csillaggal jelölt SNP esetében az öröklésmentből nem lehetett meghatározni, melyik kromoszóma melyik allélt hordozza; erre a családban előforduló ősi haplotípusok alapján következtettünk.

# A kettős kereszttel jelzett polimorfizmusokról nem áll rendelkezésre adat

#### 4.1.4 *C4B* gén hiányos MHC haplotípusok az egészséges kaukázusi populációban

Mindezek után feltérképeztük a *C4B\*Q0* hordozó kromoszómák előfordulási gyakoriságát a hazai egészséges kaukázusi populációban, illetve megvizsgáltuk, hogy a *C4B* gén hiánya milyen MHC haplotípusokkal társul. Összesen 30 olyan genetikailag független kromoszómát azonosítottunk, amely nem tartalmazott *C4B* gént (12. táblázat); ami közel 16%-os gyakoriságot jelent az itt tanulmányozott populációra vonatkozóan. Ez a harminc kromoszóma 26 különböző MHC haplotípust hordozott, melyek közül a leggyakoribb is mindössze három példányban volt kimutatható. Amennyiben csupán az egyes haplotípus-blokkokat reprezentáló *HLA-B* vagy *HLA-DR-DQ* allélokat vesszük figyelembe, megállapítható, hogy a *C4B* gén hiánya leggyakrabban (23,3-23,3%-ban) a

*HLA-B44* és *-B35* allélokkal társul, illetve (20,0%-ban) a *HLA-DR1-DQ5* kombinációval.

**12. táblázat: *C4B* gén hiányos (*C4B\*Q0*) haplotípusok**

Minta sorszáma	<i>HLA-A</i>	<i>HLA-B</i>	<i>LTA</i> 252A>G	<i>TNF</i> -308G>A	<i>HSPA1B</i> 1267A>G	<i>CFB</i> S>F	<i>C4A</i> génszám	<i>AGER</i> – 429T>C	<i>AGER</i> – 374T>A	<i>HLA-DRB1</i>	<i>HLA-DQB1</i>	Ősi haplotípus
33/a	2	7	A	G	A	F	2	T	T	13	6	
28/b	33	17	A	G	A	F	1	T	T	13	6	
31/b	3	18	A	G	A	S*	1	T	T	15	6	
8/a	25	18	A	G	G	F	2	T	T	1	5	
30/b	30	18	A	G	G	S	1	T	T	3	2	AH18.2
22/b	11	27	G	G	A	F*	2	T	T	13	6	
28/b	2	35	A	G	A	S	2	T	T	1	5	
15/a	2	35	A	G	G*	F	2	T	T	1	5	35.var(C)
17/a	2	35	A	G	G	F	2	T	T	11	7	35.var(B)
7/a	3	35	A	G	A*	F	2	T	T	1	5	
27/a	3	35	G*	G	G	S	1	T	A	11	7	
36/a	3	35	A	G	G	F	2	T	T	1	5	35.var(C)
43/a	3	35	A	G	G	F	2	T	T	11	7	35.var(B)
34/b	11	35	A	G	A	S	2	T	T	1	5	AH35.3
47/a	11	35	A	G	A	S	1	T	T	7	2	
51/b	2	41	G	G	G	S	1	T	T	3	2	
26/a	2	44	G	G	A	S	2	T	A*	4	7	
29/a	3	44	A	G	G	F	1	T	T	7	2	
31/b	3	44	G	G	G	F	1	T	T	7	2	
19/b	11	44	G	A	A	F	2	T	T	13	6	
26/b	29	44	A	G	G	S	1	T	T*	3	2	
6/b	31	44	A	G	G	S	1	T	A*	16	6	
39/b	31	44	G	G	G	F	1	T	T	4	8	
6/a	2	51	A	G	A*	F	2	T	T*	13	6	
34/a	2	51	A	G	G	F	1	T	A	8	4	
14/b	24	51	G	G	A	S	2	T	T	1	5	
38/b	2	52	A	G	A	S	2	T	T	15	6	AH52.1
34/b	11	52	A	G	A	S	2	T	T	15	6	AH52.1
50/a	24	52	A	G	A	S	2	T	T	15	6	AH52.1
49/b	2	62	A	G	A	S	1	T	A	4	8	

Az azonos ősi haplotípusok azonos színnel vannak kiemelve.

\* A csillaggal jelölt SNP-k esetében az öröklésmentből nem lehetett meghatározni, melyik kromoszóma melyik allélt hordozza; erre a családban előforduló ősi haplotípusok alapján következtettünk.

Összehasonlítással a jelen populációban fellelhető, összesen 14 *C4A* gén hiányos kromoszóma közül 11 (84,62%) az AH8.1-et hordozta, további egy kromoszóma pedig annak fragmentumát (13. táblázat).

**13. táblázat: *C4A* gén hiányos (*C4A\*Q0*) haplotípusok**

Minta sorszáma	<i>HLA-A</i>	<i>HLA-B</i>	<i>LTA</i> 252A>G	<i>TNF</i> -308G>A	<i>HSPA1B</i> 1267A>G	<i>CFB</i> S>F	<i>C4B</i> génszám	<i>AGER</i> -429T>C	<i>AGER</i> -374T>A	<i>HLA-DRB1</i>	<i>HLA-DQB1</i>	Ősi haplotípus
2/b	1	8	G*	A	G*	S	1	C	T	3	2	AH8.1
8/b	24	7	A	G	G	F	1	T	T	10	5	
9/a	1	8	G	A	G	S	1	C	T	3	2	AH8.1
16/a	1	8	G*	A*	G*	S	1	T	A	16	5	
18/b	1	8	G*	G	G	S	1	C	T	3	2	AH8.1
22/a	1	8	G	A	G	S*	1	C	T	3	2	AH8.1
23/a	1	8	G	A	G	S	1	C	T	3	2	AH8.1
23/b	1	8	G	A	G	S	1	C	T	3	2	AH8.1
30/a	2	8	G	A	G	S	1	C	T	3	2	AH8.1
16/b	3	8	G*	A*	G*	S	1	C	T	3	2	AH8.1
25/a	3	8	G	A	G	S	1	C	T	3	2	AH8.1
1/a	24	8	G	A	G	S	1	C	T	3	2	AH8.1
28/a	25	8	G	A	G	S	1	C	T	3	2	AH8.1
32/b	2	51	A	G	A	S	2	T	A	4	8	

Az azonos ősi haplotípusok azonos színnel vannak kiemelve.

\* A csillaggal jelölt SNP-k esetében az öröklésmentből nem lehetett meghatározni, melyik kromoszóma melyik allélt hordozza; erre a családban előforduló ősi haplotípus(ok) alapján következtettünk.

#### 4.1.5 *A mintavételezés validálása*

A mintavételezés reprezentatív voltának ellenőrzéseképpen a jelen populációban megfigyelt haplotípus-mintázatot összevetettük egy Bostonban élő, egészséges kaukázusiak bevonásával készült, 2675 kromoszómát számláló adatbázissal. A bostoni haplotípusok esetében az általunk vizsgált polimorfizmusok közül a *HLA-B*, *-DRB1*, *-DQB1* allélok illetve a *CFB* S>F variáció meghatározása történt meg. A *HLA-A* és a *HLA-DQ* allélok tipizálására nem minden esetben került sor, illetve nem állt rendelkezésre adat az *LTA* 252A>G, a *TNF* -308G>A, a *HSPA1B* 1267A>G, az *AGER* -429T>C és az *AGER* -374T>A polimorfizmusokról. *C4* génkópia-szám mérést a bostoni mintákban szintén

nem végeztek, ám C4 fehérje allotipizálást igen, ami alapján következtetni lehet a C4A és C4B génszámokra.

**14. táblázat: Bostoni kaukázusiakban legalább 1%-os gyakoriságot mutató MHC haplotípusok és azok előfordulása magyar kaukázusiakban**

Ősi haplotípus	<i>HLA-B</i>	<i>HLA-DRBI</i>	<i>HLA-DQB1</i>	<i>CFB S&gt;F</i>	C4A génszám	C4B génszám	Előfordulási arány bostoni kaukázusiakban	Előfordulási arány magyar kaukázusiakban
AH7.1	7	15(2) <sup>#</sup>	6	S	1	1	6,42%	4,3%
AH8.1	8	3	2	S	0	1	8,67%	5,9%
AH13.1	13	7	2	S	1	1	1,05%	2,6%
AH14.2	65(14) <sup>#</sup>	1	5	S	1	2	1,61%	2,1%
AH18.3	18	11	7	S	1	1	1,05%	2,1%
AH35.4 és AH35.5*	35	11	7	S	1	1	1,91%	3,7%
AH44.2 és 44.var(A)*	44	7	2	F	1	1	3,06%	2,6%
	44	4	7(3) <sup>#</sup>	S	2	0	2,73%	0,5%
44.var(B)	44	11	7	S	1	1	1,46%	1,1%
	51	11	7	S	1	1	1,20%	1,1%
AH57.1	57(17) <sup>#</sup>	7	9	S	1	1	2,13%	1,6%
	60	4	8	S	1	1	1,01%	0,0%
<b>Összesen:</b>							<b>32,3%</b>	<b>27,6%</b>

\* A csillaggal jelölt haplotípusok esetében a bostoni kromoszómákra vonatkozóan nem állt rendelkezésre elegendő adat ahhoz, hogy különbséget tehesünk egymáshoz erősen hasonlító ősi haplotípusok között

<sup>#</sup> A kettős kereszttel jelölt *HLA*-allélok meghatározása egyes esetekben eltérő felbontóképességű módszerrel történt; a zárójelben a szélesen reagáló antigén van feltüntetve

Első lépésként a bostoni populációban legalább 1%-os előfordulási arányt mutató (legalább 27 független kópiában előforduló), vagyis esetükben ősinek minősülő haplotípusokat elemeztük (14. táblázat). A bostoni kaukázusi mintákban összesen tizenkét olyan haplotípus volt megfigyelhető, amelyek minden rajtuk vizsgált markert illetően megegyeztek. Ugyanakkor e tizenkét haplotípus közül legalább kettő magában foglal több eltérőt, az IHWG vagy a munkacsoportunk által már részletesebben jellemzett ősi haplotípust, amelyek olyan polimorfizmusokban (jelen esetben *LTA 252A>G* vagy *HSPA1B 1267A>G*) térnek el egymástól, amelyek a bostoni adatbázisban nem szerepelnek. Az említett tizenkét haplotípusból tizenegy a magyarországi kaukázusiakban is



kimutatható volt, közülük tíz ez utóbbi populációban is elérte az ősi haplotípusba sorolás feltételének számító 1%-os előfordulási arányt. A bostoni régióban ősinek minősülő haplotípusok összesített gyakorisága érdemben nem különbözött a két populáció között ( $p=0,22$ ), eloszlási mintázatuk pedig szignifikánsan korrelált ( $R=0,789$ ,  $p=0,0023$ ). Mindkét populációban a 8.1 ősi haplotípus előfordulási aránya volt a legmagasabb, ezt követte az AH7.1, majd a bostoni adatok alapján nem megkülönböztethető AH44.2 – 44.var(A) páros együttese (14. táblázat).

**15. táblázat: Bostoni kaukázusiakban 0,50-0,99%-os gyakoriságot mutató MHC haplotípusok és azok előfordulása magyar kaukázusiakban**

Ősi haplotípus	<i>HLA-B</i>	<i>HLA-DRBI</i>	<i>HLA-DQBI</i>	<i>CFB S&gt;F</i>	<i>C4A</i> génszám	<i>C4B</i> génszám	Előfordulási arány bostoni kaukázusiakban	Előfordulási arány magyar kaukázusiakban
	7	4	8	S	1	1	0,97%	-
<b>7.var(A)</b>	7	11(5) <sup>#</sup>	7	S	1	1	0,52%	1,1%
<b>AH18.1</b>	18	15(2) <sup>#</sup>	6	S	1	1	0,71%	0,5%
<b>AH18.2</b>	18	3	2	S	1	0	0,67%	0,5%
	27	11	7	S	1	1	0,63%	-
<b>35.var(C)</b>	35	1	5	F	2	0	0,82%	1,6%
	35	4	8	S	1	1	0,82%	-
<b>AH38.1</b>	38	4	8	S	1	1	0,93%	1,6%
	44	2	6	S	1	1	0,93%	-
	44	4	8	S	1	1	0,67%	-
	44	6	6	F	2	0	0,52%	0,5%
	50	7	9	S	1	2	0,75%	-
	51	2	6	S	1	1	0,67%	0,5%
	51	4	8	S	1	1	0,52%	0,5%
	60	13	6	S	1	1	0,56%	-
<b>AH62.1 és AH62.2*</b>	62	4	8	S	1	1	0,97%	1,6%
	62	11	7	S	1	1	0,67%	0,5%
<b>AH62.3</b>	62	6	6	F	1	1	0,67%	-
	65	7	2	S	1	1	0,71%	-
<b>Összesen:</b>							13,8%	8,5%

\* A csillaggal jelölt haplotípusok esetében a bostoni kromoszómákra vonatkozóan nem állt rendelkezésre elegendő adat ahhoz, hogy különbséget tehesünk egymáshoz erősen hasonlító ősi haplotípusok között

<sup>#</sup> A kettős kereszttel jelölt *HLA*-allélok meghatározása egyes esetekben eltérő felbontóképességű módszerrel történt; a zárójelben a szélesen reagáló antigén van feltüntetve

Ezt követően megvizsgáltuk azon haplotípusok előfordulási arányát a magyarországi mintákban, amelyek legalább 0,5%-os gyakorisággal (azaz legalább 14 független kópiában) jelen voltak a bostoni kaukázusiakban (a hazai populációban ez volt a kimutathatósági határ), ám az ottani arányuk nem érte el az ősi haplotípus fogalma szerinti minimum 1%-ot. Ezeknek a feltételeknek tizenkilenc különböző haplotípus tett eleget (15. táblázat). A gyakoribb haplotípusokhoz hasonlóan eme tizenkilenc között is volt legalább egy olyan, ami minimum két különböző ősi haplotípust foglalt magába. A tizenkilenc haplotípus közül tíz a magyar kaukázusiakban is kimutatható volt, ezek gyakorisága hasonlított a bostoni populációban tapasztaltakhoz.

#### 4.2 AZ RCCX MODULÁRIS SZERKEZET VARIÁCIÓI

Következő lépésként a kaukázusi populációban fellelhető RCCX szerkezeti variánsok előfordulását térképeztük fel. A vizsgált populáció megegyezett a hazai MHC haplotípusok tanulmányozásakor bemutatottal. A különböző RCCX szerkezetek részletes jellemzése végett a *C4A* és *C4B* génszámokon túl meghatároztuk a hosszú és rövid *C4* gének számát, az egyes *C4* génvariánsok kromoszómán belüli sorrendjét és a *CYP21A2* aktív- illetve a *CYP21A1P* pszeudogének kópiaszámát is. A genetikai analíziseket külön-külön minden családtag mintáján elvégeztük, így az eredményekből az egyes kromoszómák utódokba történő átadása is követhetővé vált.

Mivel a *C4* génsorrendek megállapítására alkalmazott allélspecifikus long PCR reakciókhoz kizárólag jó minőségű, ép (nem töredezett) DNS templát használható, a méréseket megelőzően ellenőriztük a DNS szálak töredezettségét. Nem megfelelő minőség miatt két mintát (négy kromoszómát) kizártunk a vizsgálatból, így a jelen tanulmányban 184 haplotípust tudunk értékelni.

**16. táblázat: Az egyes *C4* génvariánsok előfordulási aránya egészséges kaukázusiakban**

	<i>C4A</i>	<i>C4B</i>	Összesen
<b>Hosszú génvariáns</b>	186 (52,4%)	89 (25,1%)	275 (77,5%)
<b>Rövid génvariáns</b>	4 (1,1%)	76 (21,4%)	80 (22,5%)
<b>Összesen</b>	190 (53,5%)	165 (46,5%)	

#### 4.2.1 *C4* és *CYP21* gének az egészséges kaukázusi populációban

A 184 vizsgált kromoszóma összesen 355 *C4* (és *CYP21*) gént tartalmazott. A *C4* gének közel fele-fele arányban kódoltak A illetve B izotípusú fehérjét; a HERV-K endogén retrovírus szekvencia körülbelül háromnegyedükben volt jelen. A *C4B* gének lényegében azonos arányban voltak hosszúak illetve rövidek, ezzel szemben a *C4A* gének döntő többsége hosszú volt (16. táblázat). Összesen négy haplotípust azonosítottunk (2,2%), amelyek a funkcionális *CYP21A2* génnek két kópiáját is tartalmazták, míg két kromozómáról (1,1%) ez a gén teljesen hiányzott.

A *C4A*, *C4B*, *C4(L)* és *C4(S)* gének előfordulási gyakorisága, valamint a különböző számú *CYP21A2* géneket tartalmazó haplotípusok előfordulási gyakorisága megfelelt az egészséges kaukázusi populációra vonatkozó irodalmi adatoknak (17. táblázat). Az egyes *C4* génvariánsok előfordulási arányát egy jelentősen nagyobb elemszámú, 1034 kromozómát analizáló tanulmánnyal [55] vetettük össze. A *CYP21A2* génszámokat ilyen nagyságrendű mintaszámon nem vizsgálták, ezeket 300 haplotípus adataival hasonlítottuk össze [43].

**17. táblázat: Az egyes *C4* génvariánsok és a különböző számú *CYP21A2* gént tartalmazó haplotípusok előfordulási aránya a vizsgált populációban és az irodalom alapján**

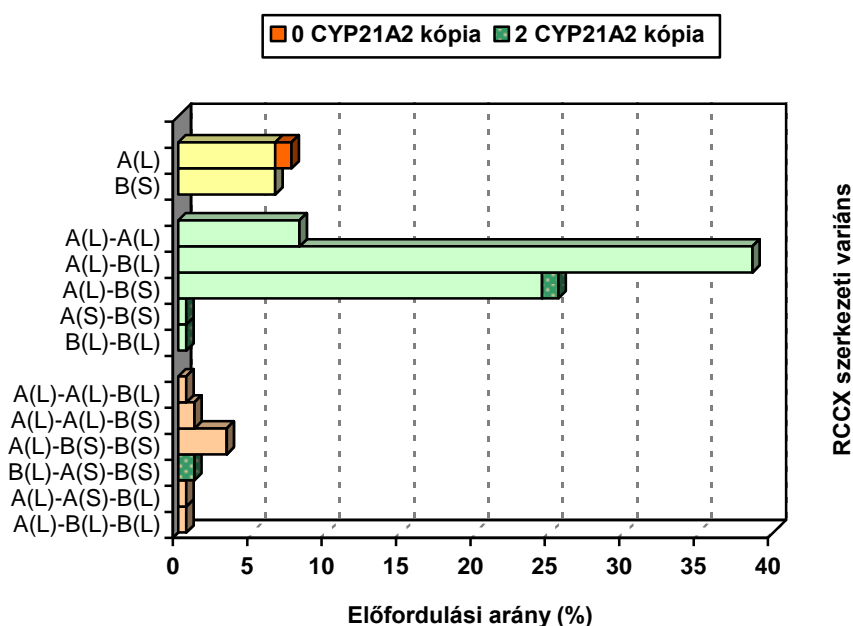
		Saját eredmények	Irodalmi adatok	p érték ( $\chi^2$ teszt)
Izotípus specifikus <i>C4</i> gének <sup>1</sup>	<i>C4A</i>	190 (53,5%)	1093 (54,8%)	0,7939
	<i>C4B</i>	165 (46,5%)	903 (45,2%)	
<i>C4</i> hossz- variánsok <sup>1</sup>	<i>C4(L)</i>	275 (77,5%)	1554 (76,8%)	0,7773
	<i>C4(S)</i>	80 (22,5%)	470 (23,2%)	
Haplotípusonkénti <i>CYP21A2</i> gének száma <sup>2</sup>	0 <i>CYP21A2</i>	2 (1,1%)	6 (2,0%)	0,6925
	1 <i>CYP21A2</i>	178 (96,7%)	289 (96,3%)	
	2 <i>CYP21A2</i>	4 (2,2%)	5 (1,7%)	

<sup>1</sup> Yang Y és mtsai alapján [55]

<sup>2</sup> Blanchong CA és mtsai alapján [43]

#### 4.2.2 A kaukázusi populációban előforduló RCCX szerkezeti variánsok

Az egyes RCCX szerkezeti variánsokat a bennük megtalálható *C4* gének száma, izotípus specificitása (A vagy B) és hossza (L – hosszú, S – rövid) alapján neveztük el és jelöltük. Így például az a bimoduláris struktúra, amely az első (telomerikus) szegmentális pozícióban hosszú *C4A*, míg a másodikban rövid *C4B* gént tartalmaz, itt mint A(L)-B(S) szerepel.



15. ábra: A hazai kaukázusi populációban előforduló RCCX szerkezeti variánsok a bennük megtalálható *C4* gének száma, izotípus specificitása és hossza alapján

A *CYP21* gének kópiaszámát figyelmen kívül hagyva az RCCX szerkezetnek 13 különböző változatát azonosítottuk a 184 vizsgált haplotípusban (15. ábra). A szerkezetek többsége (78,8%) bimoduláris volt, a monomoduláris struktúrák kb. kétszer olyan gyakran fordultak elő (14,1%), mint a trimodulárisok (7,1%). Quadrimoduláris struktúrát a jelen populációban nem találtunk. A monomoduláris szerkezetek vagy hosszú *C4A*, vagy rövid *C4B* gént tartalmaztak. A gyakoribb bimoduláris struktúrákban a *C4* gének A(L)-B(L), A(L)-B(S) illetve A(L)-A(L) elrendeződést mutattak, ezenkívül a 184-ből egy kromoszóma két hosszú *C4B* gént tartalmazott, egy másik esetében pedig az első RCCX modulban a meglehetősen ritkának számító rövid *C4A* génvariáns állt. A leggyakoribb trimoduláris struktúra típus az A(L)-B(S)-B(S) volt, de azonosítottunk

A(L)-A(L)-B(S), A(L)-A(L)-B(L) és A(L)-B(L)-B(L) elrendeződésűeket is, továbbá két olyat, amelyek rövid *C4A* gént tartalmaztak a középső modulban. Az utóbbi szerkezetek egyikében a telomerikus pozíciójú *C4* gén a megszokottól eltérően B izotípusú fehérjét kódolt, míg a másikban – szintén a megszokottól eltérően – a rövid *C4* gén után hosszú következett.

A vizsgált mintákban azonosított mindkét, funkcionális *CYP21A2* gén hiányos kromoszóma monomoduláris RCCX szerkezetet hordozott, amelyekben egy hosszú *C4A* gén állt. A négy haplotípus közül, amelyekben két-két *CYP21A2* gént mutattunk ki, kettő bi-, míg a másik kettő trimoduláris volt. A bimodulárisak az A(L)-B(S) felépítést mutatták, a trimodulárisak a B(L)-A(L)-B(S)-t. Az ellenkező oldalról szemlélve, mindkét B(L)-A(L)-B(S) szerkezeti variáns két *CYP21A2* gént tartalmazott, az A(L) és az A(L)-B(S) struktúrák többségében (85,7 illetve 95,7 százalékában) azonban – a konszenzusnak megfelelően – ennek a génnek egy kópiája volt jelen. A *C4* génsorrendeken túl a *CYP21A2* génszámokat is számításba véve így összesen 15 különböző RCCX szerkezeti típust azonosítottuk. Ezek eloszlása teljesítette a Hardy-Weinberg egyensúly kritériumait ( $p=0,52$ ). Az RCCX szerkezetek hossz-variánsainak eloszlása megfelelt az irodalom alapján vártaknak (18. táblázat) [55].

**18. táblázat: Az RCCX szerkezet egyes hossz-variánsainak előfordulási gyakorisága a vizsgált populációban és az irodalom alapján**

RCCX hossz-variáns		Saját eredmények	Irodalmi eredmények <sup>1</sup>	p érték ( $\chi^2$ teszt)
Monomoduláris	L	14 (7,6%)	47 (4,5%)	0,2652
	S	12 (6,5%)	108 (10,4%)	
Bimoduláris	LL	97 (52,7%)	526 (50,9%)	
	LS	47 (25,5%)	268 (25,9%)	
	SS	1 (0,5%)	1 (0,1%)	
Trimoduláris	LLS	2 (1,1%)	14 (1,3%)*	
	LSL	1 (0,5%)		
	LSS	8 (4,3%)	33 (3,2%)	
	LLL	2 (1,1%)	35 (3,4%)	
	SSS	-	1 (0,1%)	
Quadrimoduláris	LLLL	-	1 (0,1%)	

<sup>1</sup> Yang Y és mtsai alapján [55]

\* Az alkalmazott módszerek nem tették lehetővé az LLS és az LSL variánsok megkülönböztetését

### 4.2.3 *C4B* gén hiányos RCCX szerkezeti variánsok

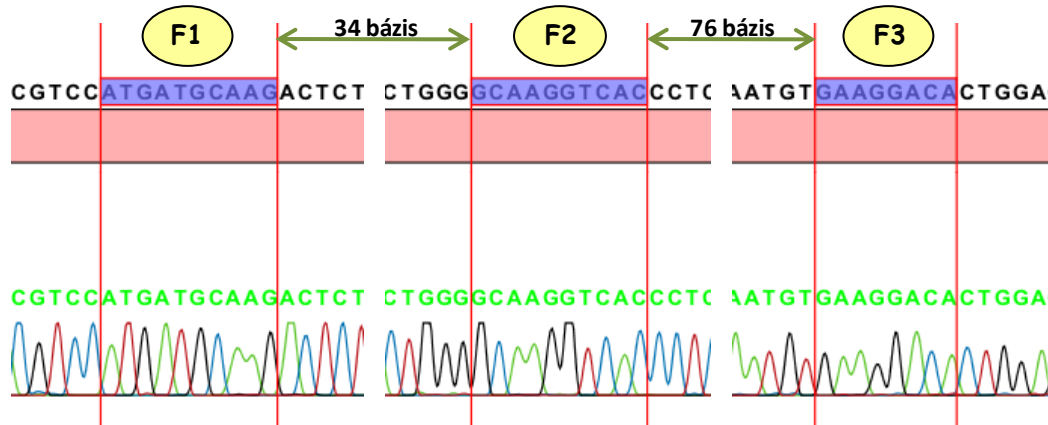
A *C4B*\*Q0 hordozó kromoszómák mindegyike kizárólag hosszú *C4A* géneket tartalmazott. A *C4B* gén hiányos RCCX struktúrák mono-, vagy bimodulárisak voltak; a *CYP21* génszámokat is figyelembe véve összesen háromféle szerkezeti típusba tartoztak (19. táblázat). Előfordulási arányaikat tekintve egyik sem bizonyult kimagaslóan gyakorinak a többihez viszonyítva.

**19. táblázat: *C4B* gén hiányos RCCX szerkezetek előfordulása az egészséges kaukázusi populációban**

	RCCX szerkezeti variáns	<i>CYP21A2</i> génszám	Előfordulási gyakoriság
<b>Monomoduláris</b>	A(L)	0	1,1%
	A(L)	1	6,5%
<b>Bimoduláris</b>	A(L)-A(L)	1	8,1%

### 4.3 A *C4* GÉNEK 35. INTRONJÁBAN TALÁLHATÓ TRANSZKRIPCIÓS FAKTOR KÖTŐHELY VIZSGÁLATA

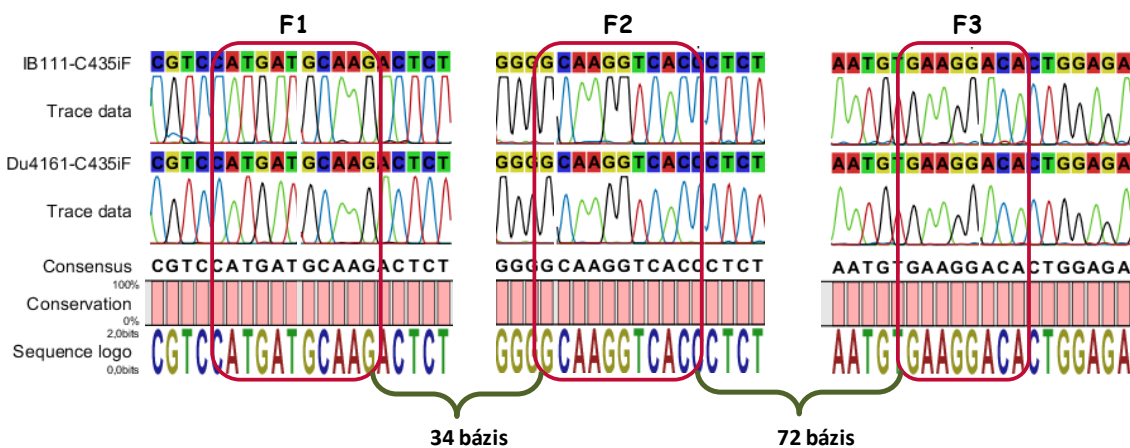
A *C4A* és *C4B* gének 35. intronjában elhelyezkedő *CYP21* regulációs szekvenciák összehasonlításához homozigóta *C4A* illetve homozigóta *C4B* gén hiányos egyének mintáit elemeztük. A tanulmányba bevont embereket a munkacsoportunk által korábban vizsgált, különböző szempontok alapján gyűjtött egészséges- és betegpopulációkból válogattuk azok *C4* gének száma alapján. Közöttük tizenötön voltak, akik egyetlen *C4A*, míg harmincnégyen egyetlen *C4B* génekkel sem rendelkeztek. Mivel közel azonos számú *C4A* és *C4B* gén deficiens egyén mintáját kívántuk vizsgálni, illetve nem mindenkitől állt rendelkezésünkre kellő mennyiségű DNS, végül tíz *C4A* és tizenkét *C4B* gén hiányos személy esetében (vagyis 20 *C4A* és 24 *C4B* deficiens kromoszómában) határoztuk meg a *C4* gének 35. intronjának bázissorrendjét. A vizsgált *C4A*\*Q0 hordozó kromoszómák összesen 23 *C4B* gént, míg a *C4B*\*Q0 hordozók összesen 32 *C4A* gént tartalmaztak.



16. ábra: Transzkripció faktor kötőhelyek (F1, F2, F3) a *C4B* gén 35. intronjában

#### 4.3.1 A *C4A* és *C4B* gének 35. intronbeli bázissorrendjének összehasonlítása

Első lépésként külön-külön megvizsgáltuk a homozigóta *C4A*\*Q0 illetve a homozigóta *C4B*\*Q0 hordozók csoportjában a *C4* gén 35. intronjában található regulációs elemeket. A régióban három transzkripció faktor kötőhelyet azonosítottak, amelyeknek felfedezőik az F1, F2 és F3 nevet adták (16. ábra) [99]. Az ampikonok mindhárom kísérletesen igazolt *CYP21* regulációs elemet lefedték, a kromatogramok mindkét irányból szépen leolvashatók voltak. Ezek bázissorrendje mind a *C4A*, mind a *C4B* gén hiányos csoporton belül teljes mértékben egyezett. Ezt követően a két csoport között vetettük össze a 35. intronikus szekvenciákat, de itt sem találtuk eltérést (17. ábra).



17. ábra: A *C4B* (fent) és a *C4A* (alul) gén 35. intronjában található transzkripció faktor kötőhelyek (F1, F2, F3) bázissorrendje két reprezentatív minta alapján

#### 4.4 A SZTEROID BIOSZINTÉZIS ÉS A C4B\*Q0 HORDOZÁS

A C4B\*Q0 hordozás és a mellékvesekéreg által termelt hormonok szérumszintje közötti összefüggést 76, kaukázusi populációba tartozó, mellékvese incidentalómás egyén bevonásával vizsgáltuk. A tumor egyik esetben sem bizonyult rosszindulatúnak, sem hormonálisan aktívnak a diagnózistól számított minimum 5 éves követési időszakon belül.

##### 4.4.1 A C4B\*Q0 hordozás összefüggése a nyugalmi hormonszintekkel

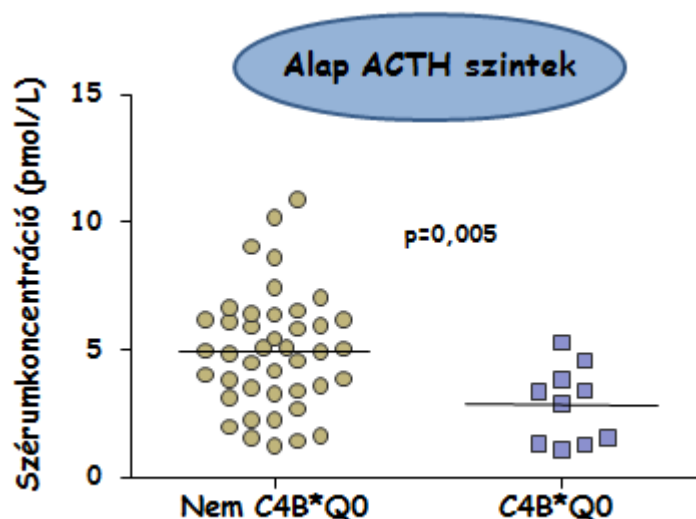
A vizsgált populációt kettébontottuk a genomiális C4B gének szám alapján. Az első csoportba azt a 15 egyént soroltuk, akik biztosan C4B\*Q0 hordozók voltak az alacsony (0 vagy 1) össz-C4B géndózisuk alapján, a második csoportba a maradék 61, magas ( $\geq 2$ ) össz-C4B kópiaszámmal rendelkező személy került. A két csoport között nem volt különbség az életkor ( $p=0,12$ ), a nem ( $p=0,89$ ), és a szteroid szérumszint koncentrációkat befolyásoló test-tömeg index (BMI) ( $p=0,23$ ) tekintetében sem.

**20. táblázat: Nyugalmi kortikoszteroid és ACTH szérumszintek összefüggése a C4B géndózzal hormonálisan inaktív mellékvese incidentalómás egyéneknél**

	Szérumszint [Medián (25.-75. percentilis)]		Mérték- egység	p érték (Mann-Whitney teszt)
	Alacsony (0 vagy 1) C4B géndózzal	Magas ( $\geq 2$ ) C4B géndózzal		
<b>Kortizol</b>	248,3 (160,0-303,5)	275,9 (193,1-358,7)	nmol/L	0,221
<b>Aldoszteron</b>	0,055 (0,036-0,166)	0,111 (0,055-0,166)	nmol/L	0,142
<b>17-hidroxi- progeszteron</b>	1,288 (0,644-3,219)	1,348 (0,924-2,129)	nmol/L	0,733
<b>Kortikoszteron</b>	4,942 (4,046-9,190)	6,893 (3,266-15,15)	nmol/L	0,476
<b>ACTH</b>	3,110 (1,320-4,008)	4,955 (3,377-6,253)	pmol/L	0,005

Elsőként az alap kortikoszteroid és az ACTH szérumszinteket vetettük össze a két csoportban (20. táblázat). Előbbiek közül az ébredési kortizol, aldoszteron, 17-hidroxi-progeszteron és kortikoszteron szintjeit vizsgáltuk. Szignifikáns eltérést egyedül a nyugalmi ACTH koncentrációk esetében tapasztaltunk, ami a C4B\*Q0 hordozókban alacsonyabbnak ( $p=0,005$ ) bizonyult a nem hordozókhoz képest (18. ábra).





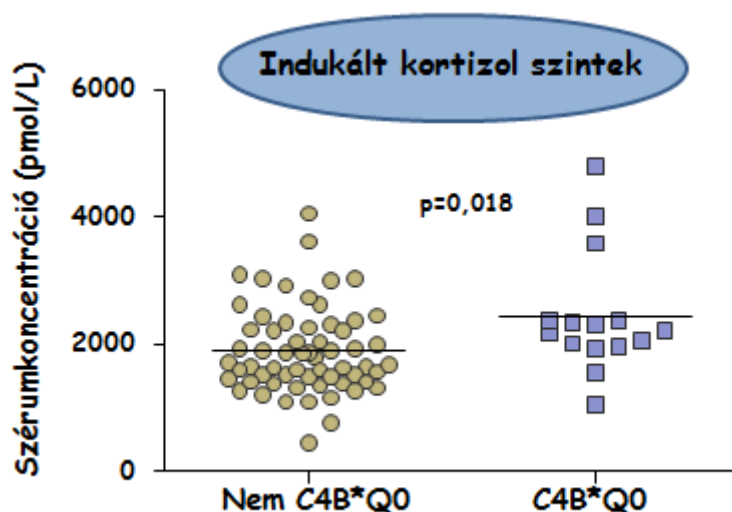
18. ábra: A nem C4B\*Q0 hordozó és a hordozó mellékvese incidentalómások nyugalmi (ébredéskor mért) ACTH szintjei

#### 4.4.2 ACTH stimuláció utáni kortikoszteroid szintek és a C4B géndózis

A C4B géndózis alapján elkülönített csoportokban összehasonlítottuk az ACTH indukcióra mért kortizol, aldoszteron, 17-hidroxi-progeszteron és kortikoszteron szérumszintjeit is (21. táblázat). A stimuláció az ACTH szintetikus analógiával, az annak első 24 aminosavát tartalmazó Cortrosynnal történt, ami egészséges egyének esetében az ACTH-val megegyező hatást vált ki, így a mellékvesékéregben serkenti a glükó-, és a mineralokortikoidok szintézisét. A két csoport között szignifikáns eltérést egyedül a kortizol esetében tapasztaltunk, aminek magasabb ( $p=0,018$ ) volt a szintje C4B\*Q0 hordozók körében a többiekhez képest (19. ábra).

21. táblázat: ACTH stimuláció után mért kortikoszteroid szintek és a C4B géndózis összefüggése hormonálisan inaktív mellékvese incidentalómás egyéneknél

	Szérumszint (nmol/ml) [Medián (25.-75. percentilis)]		p érték (Mann-Whitney teszt)
	Alacsony (0 vagy 1) C4B géndózisúak	Magas ( $\geq 2$ ) C4B géndózisúak	
<b>Kortizol</b>	2207,2 (1958,9-2372,7)	1710,6 (1434,7-2290,0)	0,018
<b>Aldoszteron</b>	0,402 (0,277-0,443)	0,457 (0,249-0,644)	0,392
<b>17-hidroxi-progeszteron</b>	28,69 (17,63-54,43)	24,94 (17,09-46,33)	0,524
<b>Kortikoszteron</b>	211,2 (132,9-416,5)	195,2 (141,5-251,2)	0,223

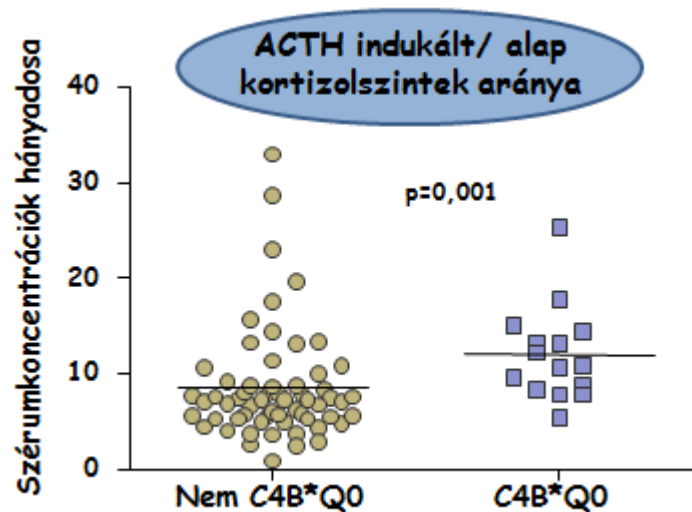


19. ábra: A nem C4B\*Q0 hordozó és a hordozó mellékvese incidentalómások ACTH stimulus után mért kortizol koncentrációi

Következő lépésként összehasonlítottuk a különböző kortikoszteroidok ACTH indukcióra adott reaktivitását is a két csoportban (22. táblázat). A reaktivitást az ACTH stimulus után mért és az alap hormonszintek hányadosával (index érték) jellemeztük. E hányados értéke szintén szignifikánsan magasabb ( $p=0,001$ ) volt a C4B\*Q0 hordozók esetében a nem C4B\*Q0 hordozókhöz viszonyítva (20. ábra). Az aldoszteron és a kortikoszteroid szintek hányadosa ugyan nem mutatott szignifikáns eltérést a csoportok között, ám mindkét hormon esetében megfigyelhető volt a magasabb értékek felé tartó tendencia a legfeljebb egy C4B génekkel rendelkezők körében. Ezzel ellentétben C4B géndózisra vonatkoztatott 17-hidroxiprogoszteron hányadosokat tekintve semmi nemű különbség nem volt tapasztalható.

22. táblázat: Egyes kortikoszteroid hormonok ACTH indukcióra mutatott reaktivitása a C4B géndózis függvényében hormonálisan inaktív mellékvese incidentalómás egyénekben

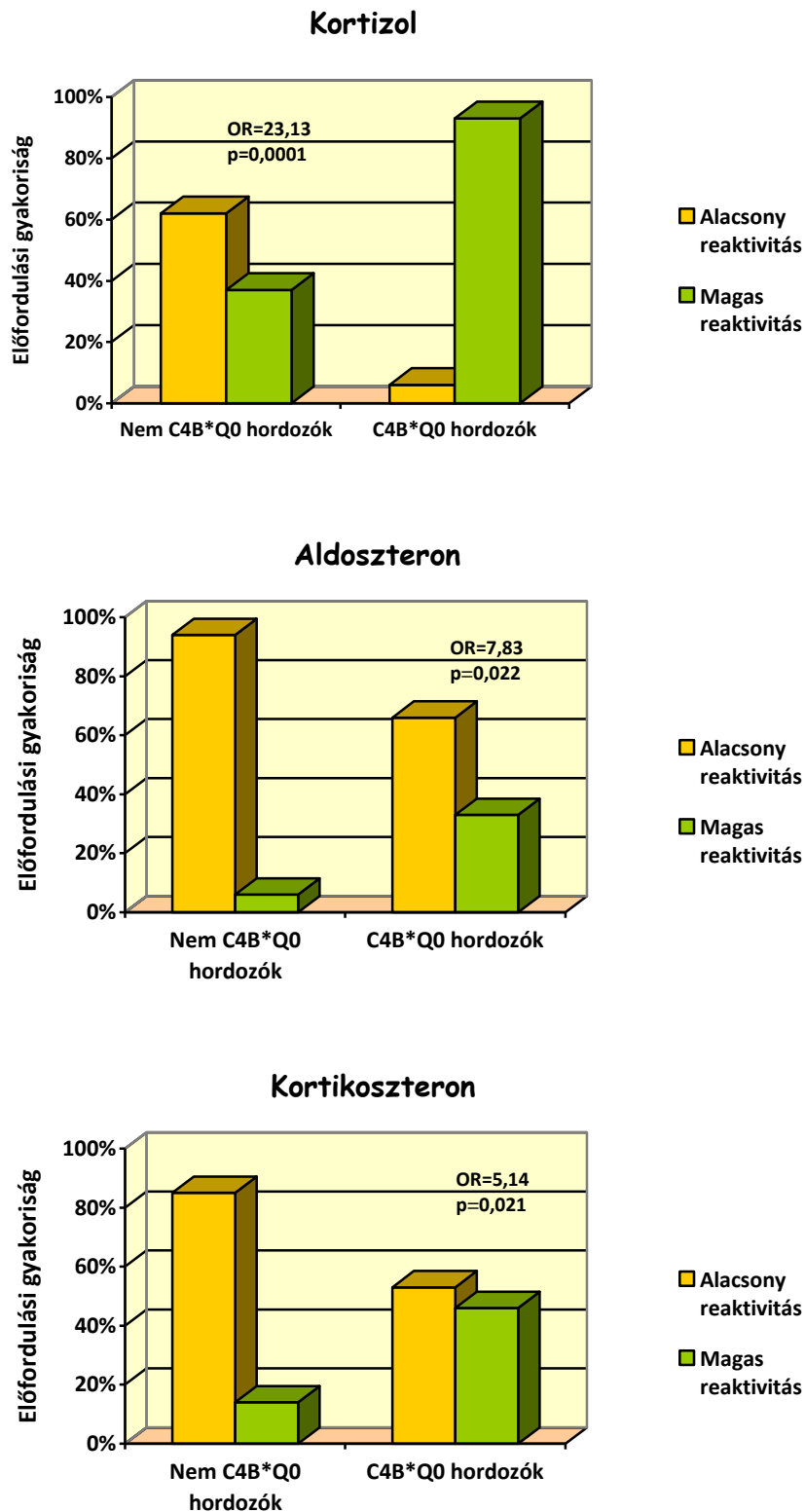
	Az ACTH stimulusra adott/ az alap szérumkoncentrációk hányadosa [Medián (25.-75. percentilis)]		p érték (Mann-Whitney teszt)
	Alacsony (0 vagy 1) C4B géndózisúak	Magas ( $\geq 2$ ) C4B géndózisúak	
<b>Kortizol</b>	10,9 (8,4-14,4)	7,2 (5,3-8,9)	0,001
<b>Aldoszteron</b>	7,5 (2,6-15,8)	4,3 (2,4-8,3)	0,258
<b>17-hidroxi- progoszteron</b>	19,5 (9,7-68,8)	19,1 (9,4-36,0)	0,635
<b>Kortikoszteron</b>	31,7 (21,1-90,9)	30,0 (14,2-56,6)	0,216



**20. ábra: A nem C4B\*Q0 hordozó és a hordozó mellékvese incidentalómások ACTH stimulus után mért és a nyugalmi (ébredéskor mért) kortizolszintjeinek aránya**

Mindezek után megvizsgáltuk a C4B\*Q0 hordozás és az ACTH stimulus hatására fokozott mértékben indukálható hormonok (kortizol, aldosteron, kortikoszteron) reaktivitása között fennálló kapcsolat erősségét. Az egyes kortikoszteroidok ACTH indukált és nyugalmi szérumkoncentrációinak hányadosaira vonatkoztatva ROC analízis segítségével megkerestük a magas és az alacsony reaktivitás közti optimális vágópont értékét. A számítások alapján a kortizol esetében 7,7, az aldosteron esetében 12, míg a kortikoszteron esetében 70 feletti értékektől tekintettük magasnak a reaktivitást. Megvizsgáltuk, hogy a C4B\*Q0 hordozók illetve nem-hordozók között hogyan alakul az adott kortikoszteroid hormon tekintetében az ACTH stimulusra magas illetve alacsony reaktivitást mutatók aránya. A kortizol magas reaktivitása szignifikánsan asszociált a C4B\*Q0 hordozással (OR=23,13), míg az aldosteron és a kortikoszteron esetében kevésbé volt erős az összefüggés (21. ábra).

A kortizolra és az aldosteronra vonatkozóan a fenti asszociációk szignifikánsak maradtak még a nemre, korra és tumorméretre való adjusztálás után is; a C4B\*Q0 hordozás és a kortikoszteron ACTH indukcióra adott fokozott reaktivitása közti kapcsolat szignifikanciája azonban eltűnt az adjusztálás hatására (23. táblázat). (A C4B\*Q0 haplotípusok hordozása és a kortizol ACTH stimulusra mutatott magas reaktivitása közötti szignifikáns korreláció akkor is fennállt, ha a nemen, az életkoron és az incidentalóma méretén kívül a nők menopauzális státuszára is adjusztáltunk (OR=32,1;  $p=0,005$ )).



**21. ábra: A C4B\*Q0 haplotípusok hordozása és a különböző kortikoszteroidok ACTH indukcióra mutatott reaktivitásának összefüggése**  
 reaktivitás: az indukált és az alap hormonszintek hányadosa;  
 vágópontok: kortizol: 7,7, aldoszteron: 12, kortikoszteron: 70

**23. táblázat: A C4B géndózis és az egyes kortikoszteroidok ACTH stimulusra mutatott reaktivitása közötti kapcsolat többszörös logisztikus regressziós analízise**

<b>Kortizol index:</b>		
Az ACTH indukció utáni és az alap kortizol koncentrációk hányadosa; magas: >7,7		
<b>Változó</b>	<b>OR (95% konfidencia intervallum)</b>	<b>p érték</b>
<b>0 vagy 1 C4B génkópiát (C4B*Q0) hordozók vs. a többi beteg</b>	25,12 (2,80-225,48)	0,004
<b>Incidentalóma mérete</b>	1,02 (0,98-1,06)	0,280
<b>Kor</b>	0,99 (0,93-1,07)	0,964
<b>Nem</b>	0,22 (0,05-1,03)	0,055
<b>Konstans</b>		0,544
<b>Aldoszteron index:</b>		
Az ACTH indukció utáni és az alap aldoszteron koncentrációk hányadosa; magas: >12		
<b>Változó</b>	<b>OR (95% konfidencia intervallum)</b>	<b>p érték</b>
<b>0 vagy 1 C4B génkópiát (C4B*Q0) hordozók vs. a többi beteg</b>	10,33 (1,49-71,45)	0,018
<b>Incidentalóma mérete</b>	0,95 (0,88-1,03)	0,233
<b>Kor</b>	1,08 (0,97-1,19)	0,154
<b>Nem</b>	0,59 (0,05-7,36)	0,687
<b>Konstans</b>		0,157
<b>Kortikoszteron index:</b>		
Az ACTH indukció utáni és az alap kortikoszteron koncentrációk hányadosa; magas: >70		
<b>Változó</b>	<b>OR (95% konfidencia intervallum)</b>	<b>p érték</b>
<b>0 vagy 1 C4B génkópiát (C4B*Q0) hordozók vs. a többi beteg</b>	3,63 (0,71 – 18,60)	0,122
<b>Incidentalóma mérete</b>	0,98 (0,94 – 1,03)	0,452
<b>Kor</b>	0,93 (0,85 – 1,01)	0,097
<b>Nem</b>	0,83 (0,07 – 9,84)	0,880
<b>Konstans</b>		0,105

#### 4.4.3 Homozigóta C4B\*Q0 hordozók hormonszintjei

A 15 vizsgált, hormonálisan inaktív mellékvese incidentalómás, C4B\*Q0 hordozó egyén közül mindössze hárman voltak olyanok, akik egyetlen C4B génkópiával sem rendelkeztek. Egy ennyire kis létszámú csoporton statisztikai elemzés elvégzése ugyan nem lehetséges, annyi azonban látható, hogy a C4B\*Q0 hordozók és nem C4B\*Q0 hordozók esetében eltérést mutató hormonális paraméterek még kifejezettebbek a homozigóta C4B\*Q0 hordozókban. A C4B gén hiányos egyénekben az alap

ACTH szint mediánja 1,4 pmol/L (25.-75. percentilis: 1,3-1,6) volt, ezzel szemben az egy *C4B* génekkel rendelkezők 3,4 pmol/L (25.-75. percentilis: 1,7-4,4). Az ACTH indukció után és a nyugalomban mért kortizol szérumszintek hányadosának mediánja az előbbi csoportban 13,2-nek (25.-75. percentilis: 7,8-15), míg a heterozigóta *C4B\*Q0* hordozók esetében 10,7-nek adódott (25.-75. percentilis: 8,5-14,1).

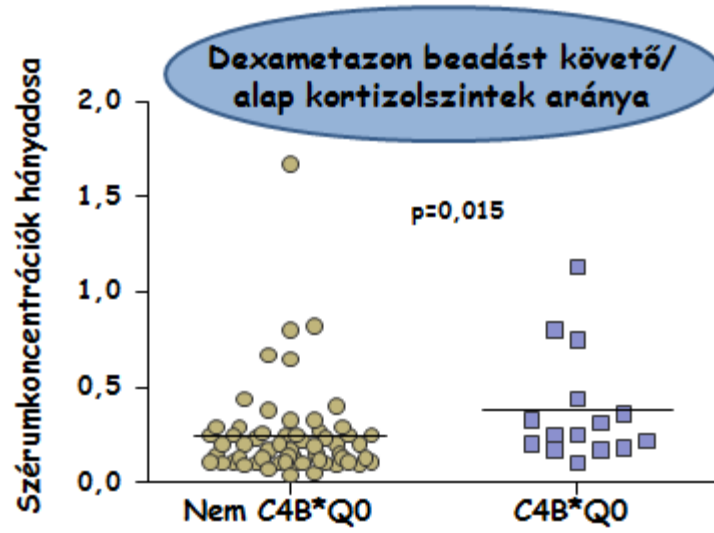
**24. táblázat: Dexametazon hatása a különböző *C4B* géndózisú, nem-hormontermelő mellékvese incidentalómás egyének kortizol szintjére**

	Medián (25.-75. percentilis)		p érték (Mann-Whitney teszt)
	Alacsony (0 vagy 1) <i>C4B</i> géndózisúak	Magas ( $\geq 2$ ) <i>C4B</i> géndózisúak	
Alap kortizolszint (reggel), nmol/L	248,3 (160,0-303,5)	275,9 (193,1-358,7)	0,221
Kortizolszint dexametazon beadása után, nmol/L	55,18 (46,90-110,4)	55,18 (27,59-55,18)	0,074
A dexametazonnal gátolt/ az alap kortizol koncentrációk hányadosa	0,25 (0,18-0,44)	0,17 (0,11-0,25)	0,015

#### 4.4.4 Dexametazon beadást követő kortikoszteroid szintek és a *C4B* géndózis

A dexametazon egy szintetikus szteroid, amely a glükokortikoid receptorokhoz kötődve egyéb hatásai mellett gátolni képes az ACTH szekrécióját és ezáltal végeredményképpen a kortizol bioszintézisét is. Ez a hatás a vizsgált populációban is megnyilvánult; míg az alap kortizolszintek mediánja 248,3 nmol/L-nek adódott (25.-75. percentilis: 193,1-358,7), az 1 mg dexametazon beadását követő kortizolszintek mediánja 55,18 volt (25.-75. percentilis: 27,59-60,70) ( $p=0,001$ ; Wilcoxon-féle párosított teszt).

A dexametazon kortizolszintre gyakorolt hatása mind a *C4B\*Q0* hordozók, mind nem-hordozók körében kimutatható volt; e tekintetben nem tapasztaltunk eltérést a két csoport között (24. táblázat). Ugyanakkor a dexametazon szuppressziós tesztet követő és az alap kortizol szintek hányadosa szignifikánsan magasabb ( $p=0,015$ ) volt a *C4B\*Q0* hordozók esetében a legalább két *C4B* génekkel rendelkezőkhöz viszonyítva (22. ábra).



22. ábra: A nem C4B\*Q0 hordozó és a hordozó mellékvese incidentalómások dexametazon beadást követő és a nyugalmi (ébredéskor mért) kortizolszintjeinek aránya

## 5 MEGBESZÉLÉS

Vizsgálataink elsődleges célja annak körülhatárolása volt, hogy mi okozhatja a C4B\*Q0 hordozók körében megfigyelt fokozott kardiovaszkuláris mortalitást és morbiditást. Vizsgáltuk, hogy a jelenség hátterében állhat-e egy adott, C4B gén hiányos MHC haplotípus vagy egy bizonyos RCCX szerkezeti variáns. Ennek megállapításához egy családvizsgálat keretei között feltérképeztük a hazai kaukázusi populáció körében előforduló MHC haplotípusok gyakoriságát és összetételét, majd az eredményeket összehasonlítottuk egy lényegesen nagyobb elemszámú, egyesült államokbeli kaukázusi populáció adataival. Felmértük továbbá a kaukázusiakban előforduló RCCX szerkezeti variánsokat is és minden eddigi populációs tanulmányhoz képest részletesebben jellemeztük azokat. Emellett vizsgáltuk a C4 gén és a vele közvetlenül szomszédos, a szteroid hormonok bioszintéziséhez nélkülözhetetlen CYP21A2 gén kapcsolatát. Abból kiindulva, hogy a funkcionális CYP21A2 gén többnyire C4B gén után áll, illetve a C4A géneket általában a CYP21A1P pszeudogén követi, összehasonlítottuk a C4A és a C4B gének 35. intronjában található, a CYP21 gének szabályozásában fontos transzkripciós faktor kötőhelyek bázissorrendjét. Végül arra kerestünk választ, hogy a C4B\*Q0 hordozás és a szteroid hormonok szérumszintje között kimutatható-e összefüggés. Ehhez nem hormontermelő, jóindulatú mellékvese incidentalómával diagnosztizált páciensek nyugalmi, ACTH stimulált és dexametazonnal gátolt hormonszintjeit vetettük össze a C4B géndóziással.

### 5.1 MHC HAPLOTÍPUSOK ÉS RCCX STRUKTÚRÁK

#### 5.1.1 Az egészséges kaukázusiak MHC haplotípusai és a C4B\*Q0 hordozás

A hazánkban előforduló ősi MHC haplotípusok gyakoriságának és összetételének feltérképezését egy családvizsgálat keretei között végeztük a családon belüli öröklésment alapján. Ebből kifolyólag néhány kivételtől eltekintve az egyes polimorfizmusokat egyértelműen kromoszómához tudtuk rendelni, ellentétben az egyedi genomok alapján, szoftveresen történő haplotípus összeállítási vizsgálatokkal. Egyedül a két-allelos SNP-k esetében fordult elő, hogy néhány családnál nem lehetett nyomon követni



minden egyes allél utódokba történő átadását. Ilyen esetekben feltételeztük, hogy a családban előforduló ősi haplotípusok a kérdéses SNP tekintetében is a rájuk jellemző variációt tartalmazzák, és ennek megfelelően rendeltük kromoszómához az egyes allélokat.

A nemzetközi irodalom nem egységes az ősi haplotípusok nevezéktanát illetően (pl. az AH8.1 és a [*HLA-A1, B8, DR3, DQ2*] megjelölés ugyanazt a haplotípust takarja), továbbá arra vonatkozóan sincsen konszenzus, hogy a *HLA-B*, *-DRB1* és *-DQB1* allélokon kívül pontosan mely polimorfizmusok számítanak az ősi haplotípusok szerves alkotórészeinek. Ezekben a pontokban az IHWG által leközölt, az ősi haplotípusok felépítéséről szóló, átfogó közleményben foglaltakat tekintettük irányadónak [19]. Ennek megfelelően a *HLA-A* allélban való egyezést nem tartottuk az ősi haplotípusba sorolás kritériumának, viszont figyelembe vettük a *C4A* és *C4B* génszámokat, valamint bizonyos SNP-ket. Az említett tanulmányban vizsgált SNP-k közül hármat (*CFB S>F*, *LTA 252A>G* és *HSPA1B 1267A>G*) határoztunk meg; ami elegendő volt ahhoz, hogy az IHWG által elismert, de egymástól *HLA*-allélban és *C4A/C4B* kópiaszámban sem különböző ősi haplotípusok mindegyikét el tudjuk különíteni. Ezenkívül további három olyan SNP-t (*TNF -308G>A*, *AGER -374T>A* és *AGER -429T>C*) is meghatároztunk, amelyek munkacsoportunk korábbi eredményei szerint jól használhatók haplotípus predikcióra tagSNP-ként [36, 140].

A hazai kaukázusi populációban tizenhat különböző, az IHWG által elismert ősi haplotípust azonosítottunk, emellett tizennégy olyat, amelyek nem szerepelnek ugyan az IHWG tanulmányában, de legalább két független kópiában fordultak elő. A nemzetközi gyakorlat szerint egy adott populációra nézve az egy százalékos előfordulási arányt elérő, nem rokon személyekben is kimutatható MHC haplotípusok ősinek számítanak [141]. A jelen populációra vonatkoztatva ez azt jelenti, hogy minden, már két független kópiában kimutatható haplotípus ősinek tekinthető. Mindent összevetve az ismételt előforduló (ősi) MHC haplotípusok aránya 47,3% volt, ami összhangban áll a régió szorosan kapcsolt voltát hangsúlyozó koncepcióval [142, 143], illetve azon irodalmi megfigyeléssel, miszerint a kaukázusi populációban az ősi MHC haplotípusok és azok fragmentumainak összesített gyakorisága a 73%-ot is elérheti [14]. Ugyanakkor bizonyos tanulmányok lényegesen kisebb mértékű konzerváltságról számolnak be az MHC régiót illetően, vitatva az ősi MHC haplotípus fogalom létjogosultságát [144]. Az

ellentétes eredmények mögött valószínűleg megközelítésbeli eltérések húzódnak. Egyrészt a nem családfaelemzésen alapuló haplotípus összeállítási módszerek eleve nem nyújtanak teljes mértékű precizitást, másrészt több jel is arra utal, hogy lényeges szempont a haplotípust kijelölő markerek megfelelő megválasztása [145, 146]. A molekuláris biológiai módszerek fejlődésének és az emberi genom variabilitásának egyre részletesebb ismeretének köszönhetően egyre gyakoribbak a nagyszámú polimorfizmust figyelembe vevő vizsgálatok. A különböző polimorfizmusokra azonban eltérő erősségű szelekciós nyomás hat, és nem a hosszú kromoszómaszakaszokat érintő rekombináció az egyetlen mechanizmus, ami a DNS szekvencia módosulását képes előidézni. Ebből fakadóan nem meglepő, ha az egyébként hosszan és erősen konzervált haplotípusokban is akadnak eltérések. Az általunk analizált SNP-k közül négynek (*LTA* 252A>G, *TNF* -308G>A, *AGER* -374T>A és *AGER* -429T>C) bizonyítottan génextpressziót befolyásoló szerepe van, de a másik kettőt is több betegség-asszociációs közlemény említi, utalva önmaguk, vagy valamely kapcsolt polimorfizmus funkcionális jelentőségére [132, 147, 148]. (A *CFB* S>F polimorfizmus egyes autoimmun kórképekkel társul, a *HSPA1B* 1267A>G pedig bizonyos alapbetegségek fennállása esetén tovább fokozza a kardiovaszkuláris rizikót [149-153].) Vélhetőleg ez az oka annak, hogy munkacsoportunk az SNP-k szintjén is nagyfokú egyezést tudott kimutatni az egyes ősi haplotípusokon belül. A régió konzervált voltát tükrözi az is, hogy a hazai populációban a 105 vizsgált gyermek közül mindössze négy hordozott rekombináns MHC haplotípust. Ennek megfelelően az átlagos rekombinációs gyakoriság (rekombináns utódkromoszómák száma osztva az összes utódkromoszóma számával) a *HLA-A* és *HLA-DRB1* gének közötti, négy befagyott blokkon átívelő mintegy 2,7 Mb hosszúságú szakaszra nézve 1,9%. Ez 0,7 cM/Mb (centiMorgan/megabázis) rekombinációs rátát jelent, miközben a humán genomban az átlagos rekombinációs rátát 1,3 cM/Mb körüli értéknek becsülik (0,3 cM/Mb alatti illetve a 3 cM/Mb feletti értékek kiemelten alacsony illetve magas rekombinációs rátának számítanak, ezekre külön szakszó létezik az irodalomban) [154].

A fentiek fényében nem elhanyagolható kérdés a betegség-asszociációs analízisek szempontjából, hogy mely ősi MHC haplotípusok vannak jelen viszonylag nagy arányban az adott populációban. Mintáinkban az irodalom alapján vártaknak megfelelően az autoimmun kórképekre hajlamosító és számos egyéb betegség lefolyását módosító AH8.1 bizonyult a leggyakoribb konzervált haplotípusnak 5,8%-os előfordu-

lási arányával [155]. Emellett a 4,2%-os gyakoriságú AH7.1-nek és a 2,6%-os gyakoriságú AH13.1-nek is ismertek klinikai vonatkozásai [26, 28, 156]. Figyelemre méltó, hogy ezekhez hasonló előfordulási gyakoriságot (3,2%) mutatott az általunk 38.var(A)-ként jelölt, idáig mások által nem leírt haplotípus is. Tekintve az MHC régióban elhelyezkedő, immunológiai szempontból releváns gének nagy számát, feltehetőleg ez utóbbi haplotípus is rendelkezik betegségre való hajlamot befolyásoló hatással, ám ennek megállapításához részleteiben kellene ismerni a haplotípus felépítését és a rá nézve karakterisztikus polimorfizmusok fiziológiai és patológiai szerepét. Általánosságban véve megállapítható, hogy MHC régióbeli géneket érintő betegség-asszociációs tanulmányok során mindenképpen érdemes utánajárni, hogy a vizsgált polimorfizmusok nem kapcsolnak-e szorosan egy bizonyos ősi haplotípushoz. A nagyfokú linkage disequilibrium miatt ugyanis könnyen megeshet, hogy tévesen tulajdonítanak funkcionális szerepet egy-egy genetikai variációnak.

Éppen ebből kifolyólag tartottuk célszerűnek megvizsgálni, hogy a C4B\*Q0 hordozók fokozott kardiovaszkuláris rizikójának hátterében esetleg nem egy konzervált MHC haplotípus számos alléljának együttes hatása áll-e. Végeredményül azonban azt találtuk, hogy – a C4A gén hiányával ellentétben – a C4B gén hiánya számos eltérő haplotípusban felbukkan, köztük sok olyanban, amelyek szemlátomást egyedi allélkombinációkat tartalmaznak, de egyetlen olyanban sem, amely kiemelkedően nagy gyakorisággal fordulna elő a többihez képest. Ennek alapján azt a következtetést vontuk le, hogy munkacsoportunk C4B\*Q0 hordozókkal kapcsolatos megfigyeléseinek molekuláris szintű oka nem a C4 génektől távol eső variációkban rejlik.

### ***5.1.2 MHC haplotípusok előfordulása különböző kaukázusi populációkban***

Az MHC haplotípusok gyakoriságának és összetételének feltérképezésére irányuló tanulmányunk gyenge pontja a haplotípusok sokféleségéhez viszonyított alacsony mintaszám, ami nem reprezentatív mintavétel esetében jelentősen torzíthatja az eredmények hitelességét. Mivel egész családokat lényegesen nehezebb bevonni egy vizsgálatba, mint független személyeket, az esetszámot érdemben tovább növelni nem tudtuk. Ugyanakkor az eredményeket összevetettük egy földrajzilag távoli (bostoni) kaukázusi populáció egészséges tagjaira vonatkozó, a munkacsoportunkénál nagyságrendileg több kromoszómát számláló adatbázissal. Ez utóbbi adatbázis több szempont-

ból is eltért a miénktől. A *HLA-A*, sőt a *HLA-DQ* allélok meghatározása sem valósult meg több esetben, emellett az egyes *HLA*-allélok tipizálása nem mindig ugyanolyan felbontóképességű metodikával történt, bonyolítva a két populáció összevetését. Azonban megjegyzendő, hogy még az IHWG által definiált ősi haplotípusok esetében sem egységes, hogy egy-egy szélesen reagáló *HLA*-antigén vagy annak valamely szubtípusa van-e megadva [19]. A centrális MHC régióbeli polimorfizmusok közül a bostoni kutatócsoport egyedül a C4 és a B faktor variációit vizsgálta, de nem genotipizálással, hanem hagyományos, szérumfehérje elektroforézisen alapuló allotipizálási eljárással. Ez bizonyos szempontból részletesebb információt nyújt az általunk alkalmazott technikákhoz képest, ugyanakkor pusztán a fenotípusból a C4 kópia-számot abszolút biztonsággal kikövetkeztetni nem lehet. Természetesen minden egyes allotípushoz külön gén tartozik, ám azt lehetetlen megállapítani, hogy egy adott allotípust egy vagy több génkópia kódol-e, továbbá egyes ritka C4-allélokról egyáltalán nem keletkezik fehérjetermék [157].

Az adatbázisok különbözősége ellenére a két kaukázusi populációban előforduló MHC haplotípusok egymással jól összehasonlíthatók voltak. A Bostonban legalább 1%-os gyakoriságot mutató tizenkét haplotípus közül tizenegyet a hazai populációban is kimutattunk. Ezek összesített aránya a bostoni mintákban 32,3%, a magyarországiakban 27,6% volt, emellett a gyakoriságuk sorrendje is szignifikánsan korrelált ( $R=0,789$ ;  $p=0,0023$ ). Ez egyrészt azt sejteti, hogy még az egymástól távoli, független kaukázusi populációk is alapjában véve egyeznek az ősi MHC haplotípusok tekintetében, másrészt igazolja a hazai mintavételezés reprezentatív jellegét. Ezzel együtt eltérések is adódtak a populációk között, ám ezek a kisebb számban előforduló haplotípusokra korlátozódtak. Mindent összevetve a jelen eredmények is az MHC régió nagyfokú konzerváltságát támasztják alá és rámutatnak arra, hogy egy konkrét kaukázusi populáció tanulmányozása kapcsán született megfigyelések jó eséllyel egyéb, független kaukázusi populációkra is extrapolálhatók.

### **5.1.3 Az *RCCX* szerkezet variációi és a *C4B* gén hiánya**

Habár a kaukázusi populációban előforduló *RCCX* struktúrák variációit több tanulmány is tárgyalja [38, 43, 55], mindezidáig nem született átfogó közlemény az egyes szerkezeteken belüli hosszú és rövid *C4A* és *C4B* gének pontos elrendeződéséről.

Munkacsoportunk eredményei több szempontból is egyedülállóak. Egyrészt a családfelemzésnek köszönhetően – az MHC haplotípusok felmérésére irányuló vizsgálatunkhoz hasonlóan – abszolút megbízhatósággal tudtuk felállítani az egyes haplotípusokat. Emellett különböző, PCR alapú metodikák kombinálása révén pontosan meg tudtuk határozni, hogy az RCCX struktúrák adott pozíciójában melyik izotípust kódoló *C4* gén melyik hossz-variánsa található. Az előző vizsgálatunkhoz hasonlóan elvileg itt is torzított eredményekhez vezethet a relatíve alacsony mintaszám. Ám ugyanerről a populációról már bebizonyosodott, hogy az MHC haplotípusok mintázatát tekintve erősen hasonlít egy lényegesen nagyobb kaukázusi populációhoz, továbbá a *C4* géneket illetve az RCCX hosszúságot érintő variációinak aránya is megfelel egy másik munkacsoport eredményeinek [55]. Így feltételezhetjük, hogy a kapott eredmények általában véve reprezentatívak a kaukázusiakra nézve.

Az irodalom alapján az egyes RCCX struktúrák modulszámát és azok hosszát tekintve hét gyakori és számos ritka szerkezeti variáns létezik [57]. Saját eredményeink összhangban állnak ezzel, de rávilágítottak újdonságokra is. Bebizonyítottuk, hogy az egyes *C4* hossz-variánsokat azonos számban tartalmazó trimoduláris struktúrák is eltérhetnek egymástól, még abban az esetben is, ha ugyanannyi *C4A* és *C4B* kópiát tartalmaznak. Például az az RCCX szerkezet, amely egy *C4A* és két *C4B* gént tartalmaz, melyek közül egy hosszú és kettő rövid, akár A(L)-B(S)-B(S), akár B(L)-A(S)-B(S) elrendeződést is mutathat. Legjobb tudomásunk szerint elsőként azonosítottunk olyan RCCX variánst, amelyben telomerikus *C4B* gént *C4A* gén követ, illetve olyat, amelyben hosszú *C4* változat előtt rövid áll. Ettől eltekintve azt tapasztaltuk, hogy a multimoduláris szerkezetekben a leginkább telomerikus pozícióban többnyire *C4A* gén található, ami megfelel a korábbi, csekély számú szekvencián alapuló következtetéseknek és az MHC Haplotípus Projekt eredményeinek is [43, 158]. Ezenkívül azt a korábbi feltételezést is megerősítettük, hogy a *C4A* gének szinte mindig hosszúak, illetve hogy a *C4B* gének közel azonos hányada hosszú illetve rövid [38].

A különböző sajátságú *C4* gének számán kívül meghatároztuk a *CYP21A2* és a *CYP21A1P* génszámokat is. Az irodalomnak megfelelően a nulla vagy két funkcionális *CYP21A2* génkópiát hordozó haplotípusok az általunk vizsgált populációban is aránylag ritkán fordultak elő [43]. Azonban érdekes módon mindkét, az A(L)-B(S)-B(S) típusú szerkezetektől hagyományos módszerekkel nem elkülöníthető, B(L)-A(S)-B(S) elrende-

ződésű RCCX struktúra két *CYP21A2* kópiát tartalmazott. Ennek funkcionális jelentősége egyelőre nem ismert, illetve az sem, hogy valóban mind a két *CYP21A2* gén kódol-e fehérjeterméket. Az aktív- és a pszeudogén elkülönítése ugyanis kizárólag a pszeudogénre jellemző 8 bázispáros deléció alapján, ám a pszeudogént egyéb defektusok is tönkreteszik [95].

Mindent összevetve egyedül a *C4* géneket érintő variációkat tekintve tizenhárom különböző RCCX szerkezeti variánst azonosítottunk, a *CYP21A2* és *CYP21A1P* kópiaszámokat is figyelembe véve tizenötöt. A tizenöt között három *C4B\*Q0* hordozó haplotípus szerepelt, amelyek mono- vagy bimodulárisak voltak. Az egy *CYP21A2* kópiát tartalmazó szerkezetek közül az egy *C4A* génből állók előfordulási aránya 6,5% volt, ami alig maradt el a két *C4A* génből felépülő RCCX variánsokétól (8,1%). Azaz a *C4B* gén hiánya nem köthető egyetlen, a többihez képest kiemelkedően gyakori RCCX változathoz, amelynek sajátosságai megindokolhatnák a *C4B\*Q0* hordozással kapcsolatos, betegség-asszociációs megfigyeléseiket.

## 5.2 A *C4* ÉS A *CYP21* GÉNEK KAPCSOLATA

### 5.2.1 A *C4* gének 35. intronjában található regulációs szekvenciák vizsgálata

A *C4* gének 35. intronjában három különböző transzkripciós faktor kötőhelyet is leírtak, amelyek a kísérletes eredmények alapján befolyással bírnak a *CYP21A2* gén expressziójára. Ezek az eredmények azonban mind a *C4B* gén vizsgálata kapcsán születtek, a *C4A* génekre vonatkozóan nem található információ az irodalomban. Multimoduláris RCCX szerkezetek esetében a funkcionális *CYP21A2* gén jellemzően a leginkább centromerikus szegmensben található [95], amelyben rendszerint *C4B* gén áll a saját populációs felmérésünk szerint, illetve egyedi DNS-ek szekvenálásán alapuló irodalmi adatok alapján is [20, 158-160]. Ennek megfelelően közvetlenül a *C4A* gének után többnyire *CYP21A1P* pszeudogén áll, amelynek expressziós aktivitása számottevően elmarad az aktív génetől [45]. Kiindulva abból, hogy a *C4B\*Q0* hordozó kromoszómák esetében a *CYP21A2* gén törvényszerűen *C4A* gén után található, célszerűnek tartottuk megvizsgálni, hogy az eltérő izotípusú fehérjét kódoló gének 35. intronjában található szabályozó elemek eltérnek-e egymástól. Amennyiben igen, az a *C4B\*Q0*

hordozók kortikoszteroid bioszintézisére is jelentős kihatással lehet. E hormonok megfelelő mobilizációja viszont nélkülözhetetlen az adaptív stresszválaszhoz, amely folyamat zavarai ismert rizikótényezők a szív- és érrendszeri megbetegedésekben [120].

A *C4A* és *C4B* gének száz százalékos biztonságu elkülönítése érdekében a 35. intron bázissorrendjét homozigóta *C4A* és homozigóta *C4B* gén hiányos személyekben határoztuk meg. Laboratóriumunkban korábban összesen 1505, egymással nem rokon személy DNS-én végeztünk *C4* génekópia-szám meghatározást [82-84, 88, 126, 127]; a jelen vizsgálathoz közülük válogattunk be mintákat. Ebből adódóan a mintaszám viszonylag alacsony, hiszen az egészséges kaukázusiakban a homozigóta *C4A*\*Q0 hordozás előfordulási gyakorisága 0,49%, míg a homozigóta *C4B*\*Q0 hordozásé 2,48% a saját eredményeink szerint. Ezek az arányok az 1505 ismert *C4* kópiaszámú személy alkotta heterogén populációban sem módosultak lényegesen; a homozigóta *C4A* deficiencia 1,00%, míg a homozigóta *C4B* deficiencia 2,26%-os előfordulási arányt mutatott, ami konkrétan 15 *C4A* és 34 *C4B* gén hiányos egyént jelent. Mivel a jelen tanulmány idején már nem mindenkitől állt rendelkezésre elegendő mennyiségű DNS, összesen tíz *C4A* gén hiányos mintát tudtunk szekvenálásra elküldeni. A *C4B* gén hiányos minták számát ehhez igazítottuk, közülük végül tizenkettőt elemeztünk.

A vizsgált regulációs elemeket illetően bázissorrendbeli variációt nem sikerült kimutatnunk sem az azonos, sem az eltérő izotípusú fehérjét kódoló, összesen 55 *C4* gén kapcsán. Ez a megfigyelés megfelel az MHC Haplotípus Projekt eredményeinek is, amely projekt során rokonházasságból született személyekből származó, az MHC régióra nézve homozigóta sejtvonalak MHC haplotípusait szekvenálták meg [20, 158]. A kérdéses kromoszómaszakaszra nézve hat sejtvonala (MCF, PGF, QBL, SSTO, COX, DBB; forrás: [http://vega.sanger.ac.uk/info/data/MHC\\_Homo\\_sapiens.html](http://vega.sanger.ac.uk/info/data/MHC_Homo_sapiens.html)) esetében érhető el értékelhető szekvencia. Ezek összesen négy *C4A* és öt *C4B* gént tartalmaznak, egymással tökéletesen megegyező 35. intronikus bázissorrenddel. Mindez a vizsgált regulációs elemek konzerváltságára utal, kiemelve funkcionális jelentőségüket. Annak lehetőségét azonban elvethetjük, hogy a *C4B*\*Q0 hordozók által mutatott fokozott kardiovaszkuláris rizikó hátterében a *C4* génekből leírt kriptikus *CYP21* regulátor elemek variációja húzódik meg.

### 5.2.2 *A szteroid bioszintézis és a C4B\*Q0 haplotípusok kapcsolata*

A C4B\*Q0 haplotípusok és a 21-hidroxiláz enzim között esetlegesen fennálló kapcsolat vizsgálatára a direkt szekvencia-analízisen túl egyéb lehetőség is kínálkozik. Hipotézisünk szerint a C4B\*Q0 hordozó kromoszómák legalábbis nagy része a *CYP21A2* génnek olyan allélját tartalmazza, amely a vad típusúétól eltérő aktivitású enzimet kódol, vagy pedig az ilyen kromoszómák esetében funkcionális variáció található a *CYP21A2* gén promóter vagy egyéb szabályozó régiójában. Amennyiben a feltevésünk helyes, úgy a C4B\*Q0 hordozókban a kortikoszteroidok bioszintézisének hatékonysága eltér az átlagostól, aminek végső soron meg kell mutatkoznia a reakcióút végtermékeiként keletkező kortizol és aldoszteron szérumszintjében is. Tekintve, hogy a kérdéses hormonok termelődése a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely révén többszörös visszacsatolási körök szabályozása alatt áll, a hipotézis vizsgálatához nem elégséges ezen hormonok nyugalmi szérumszintjének ismerete. Mivel a HPA tengely stimulálása illetve gátlása egészséges egyéneknél etikai megfontolásból nem kivitelezhető, ezért vizsgálandó populációnak mellékvese incidentalómás betegcsoportot választottunk. A mellékvese incidentalómák olyan mellékvese tumorok, amelyek nem eredményeznek jellegzetes hormontútermelési tünetekkel járó klinikai manifesztációt (Cushing-szindróma, Conn-szindróma, pheochromocytoma), és lényegében véletlenül, egyéb indikációból történő képalkotó eljárások során kerülnek diagnosztizálásra. A daganatok szövettani szempontból meglehetősen heterogének; előfordulnak közöttük benignusak és malignusak, primerek és metasztázisosak, lehetnek mellékvesekéreg- vagy mellékvesevelő-adenómák, illetve hormonálisan aktívak vagy inaktívak [161]. Ebből kifolyóan a mellékvese incidentalómás páciensek szükségszerűen átesnek részletes endokrinológiai kivizsgáláson is, hiszen a rosszindulatú és a hormontermelő daganatokat lehetőség szerint el kell távolítani. A vizsgálatoknak a különböző szteroid hormonok és prekursoraik nyugalmi szintjének meghatározásán túl normálisan részét képezik különböző stimulációs és szupressziós tesztek is. Azok a mellékvese incidentalómás egyének, akiknél a tumor jóindulatú és nincs hormonális aktivitása, lényegében egészségesnek tekinthetők. Mindezeket a szempontokat figyelembe véve az ilyen személyek ideális vizsgálati populációt alkotnak a *C4B* génszámok és a szteroid hormontermelés kapcsolatának tanulmányozásához.



Jelen tanulmány során munkacsoportunk egyedül a genomialis, nem pedig a kromoszómánkénti *C4* génszámokat határozta meg. Ebből adódóan a C4B\*Q0 hordozók és a nem-hordozók csoportja teljes megbízhatósággal nem különíthető el. A nulla vagy maximum egy *C4B* génkópiával rendelkező egyének bizonyosan C4B\*Q0 hordozók, de elvileg a két *C4B* génnel rendelkezők is lehetnek azok. Előfordulhat ugyanis, hogy valakinek az egyik kromoszómája két *C4B* gént tartalmaz, míg a másik egyet sem. Ennek az esélye azonban meglehetősen csekély, a saját populációs adataink alapján mindössze 0,13%. Így minden, legalább két *C4B* génkópiával rendelkező egyént nem C4B\*Q0 hordozónak tekintettünk.

Eredményeink alapján a C4B\*Q0 hordozók alap ACTH szintje alacsonyabb a nem C4B\*Q0 hordozókéhoz képest, ugyanakkor a négy vizsgált szteroid hormon tekintetében (17-hidroxiprogoszteron, kortikoszteron, kortizol, aldoszteron) nem találtunk különbséget a két csoport között. Azaz a C4B\*Q0 hordozók esetében a mellékvesekéregben szintetizálódó hormonok adott szérumszintjének eléréséhez az átlagosnál alacsonyabb ACTH koncentráció is elegendő, ami arra utal, hogy esetükben a HPA tengely az átlagosnál kisebb stimulusra aktiválható. Ezt az ACTH indukció után mért mellékvesekéreg hormon szintek is alátámasztják, ugyanis a legfeljebb egy *C4B* génkópiával rendelkező egyéneknél bizonyos kortikoszteroid (kortizol, aldoszteron és kisebb mértékben kortikoszteron) szérumkoncentrációk ACTH hatására kifejezettebben emelkedtek meg a populáció többi tagjához viszonyítva. Ugyanakkor a stimulált 17-hidroxiprogoszteron koncentrációkat illetően nem tapasztaltunk különbséget a két csoport között. A fenti eredmények függetlenek voltak nemtől, kortól és a tumor méretétől is. Mindez arra enged következtetni, hogy a szteroidogenezisnek a 17-hidroxiprogoszteron keletkezését követő lépéseiből fakadnak a C4B\*Q0 hordozók és a nem-hordozók közötti hormonális eltérések. Vélhetőleg a megfigyelések hátterében a 21-hidroxiláz enzim áll, ami adott ACTH koncentráció hatására az átlagosnál nagyobb mennyiségben termelődik, vagy fokozott aktivitást mutat a C4B\*Q0 hordozók esetében. Ennek köszönhetően az ő szervezetükben egységnyi ACTH hatására fokozott mértékben emelkedik egyebek közt a kortizol szérumkoncentrációja, ami viszont negatív visszacsatolással gátolja a HPA tengelyt, viszonylag alacsony szinten tartva a nyugalmi ACTH értékét. Ezt a gondolatmenetet a dexametazon szupressziós teszttel kapcsolatos eredményeink is alátámasztják, hiszen a dexametazon beadását követő és a

nyugalmi kortizol koncentrációk hányadosa szignifikánsan magasabb volt az alacsony *C4B* géndózisúakban a magas *C4B* géndózisúakéhoz képest, a *C4B\*Q0* hordozók kortizol termelésének mérsékeltebb gátolhatóságát jelezve. A *C4B\*Q0* hordozók kapcsán megfigyelt hormonális eltérések a homozigóta *C4B\*Q0* hordozók (vagyis teljes *C4B* gén hiányos) személyek körében még inkább kifejezettek voltak. Ugyan ez utóbbi csoportba túl kevesen tartoztak ahhoz, hogy statisztikailag külön lehessen értékelni őket, a rájuk vonatkozó adatok is megerősítik, hogy valóban a *C4B* gén hiányával függnek össze a hormonszintekkel kapcsolatos észrevételek.

Bár a fenti megfigyelések mellékvese incidentalómás betegcsoport vizsgálata kapcsán születtek, a szigorú beválogatási kritériumok miatt valószínűleg az egészséges populációra is érvényesek. Ebben az esetben a jelen eredmények magyarázatot adnának a munkacsoportunk által korábban leírt jelenségekre, miszerint a *C4B\*Q0* hordozás a szív- és érrendszeri betegségek iránti megnövekedett hajlammal, továbbá a myocardialis infarktuson átesettek rövid távú mortalitásának fokozódásával társul [83, 86, 87, 162]. Stresszhelyzetben a *C4B\*Q0* hordozókban feltételezhetően több kortizol szintetizálódik, mint a nem-hordozókban, így egész életük során nagyobb mértékben vannak kitéve e hormon hatásainak. Irodalmi adatok szerint a HPA tengely fokozott aktivitásából eredő, a glükokortikoidoknak való ismételt és elhúzódó kitettség a legkülönbözőbb kóros tünetek kialakulásához járulhat hozzá, többek között zavart okozhat az anyagcsere, az idegi folyamatok, az immunrendszer és a kardiovaszkuláris rendszer működésében is [163]. A glükokortikoidok magas szérumkoncentrációja például az ún. szteroid indukálta diabéteszre hajlamosít [164], a különböző stresszorok pedig egy másik kardiovaszkuláris rizikófaktor, a szérum koleszterinszint emelkedését váltják ki [165]. A HPA tengely fokozott aktivitása tehát legalábbis egyes esetekben bizonyítottan hozzájárul a szív- és érrendszeri betegségek kialakulásához. Egyes tanulmányok szerint a kardiovaszkuláris betegségekre való hajlam szempontjából nem is annyira a HPA tengely állandó hiperaktivitása, mint a túlzott mértékű aktiválhatósága a lényeges [166, 167].

A HPA tengely aktivitása természetesen a mineralokortikoidok termelődését is érinti. Eredményeink alapján egységnyi ACTH beadására a *C4B\*Q0* hordozók szervezete kifejezettebb aldosteron szekrécióval válaszolt a nem *C4B\*Q0* hordozókhoz viszonyítva. Irodalmi adatok arra utalnak, hogy a stresszválasz során és a kardiovasz-

kuláris betegségek kialakulásában a glükokortikoidok mellett a mineralokortikoidoknak is szerepük lehet [168]. A glükokortikoid receptoroknak kétféle típusa létezik, közülük az I-es típusú vagy más néven mineralokortikoid receptor (MR) a glükokortikoidok mellett az aldosteront is köti [169]. A túlzott MR aktiválódással járó klinikai állapotok, így az aldosteron túltermeléssel járó Conn-szindróma növeli a szív- és érrendszeri kórképek kialakulásának esélyét [170]. Emellett klinikai vizsgálatok folyamán a súlyos szívelégtelenségben szenvedők szokásos terápiájának MR antagonistákkal történő kiegészítése számottevően csökkentette a mortalitást [171, 172].

Míndez arra utal, hogy a C4B\*Q0 haplotípusok a kardiovaszkuláris és cerebrovaszkuláris betegségekre való hajlamot a szervezet kortizol- és aldosteron-szintézisének könnyebb stimulálhatóságán keresztül fokozzák. Munkacsoportunk megfigyelései szerint a C4B\*Q0 hordozás negatív következményei különösképpen a dohányosok körében mutatkoznak meg [88]. A nikotin serkentőleg hat a HPA tengely működésére [173, 174], így ezekben a személyekben feltehetően összeadódnak az örökletes és a környezeti tényezők hatásai.

Mindent összevetve az eredményeink arra utalnak, hogy a *C4B* gén hiányos RCCX szerkezeti variánsokban a funkcionális *CYP21A2* génnek olyan variánsa áll, amely aktiváció hatására fokozott fehérjetermeléssel reagál, vagy amely az átlagosnál hatékonyabb enzimatis aktivitással rendelkezik. Ilyen jellegű *CYP21A2* allélok valóban léteznek, hiszen egy tanulmány szerint a CAH-ot okozó *CYP21A2* mutációkra heterozigóta egyének a nem mutáció hordozókhoz képest erőteljesebb kortizol választ adnak ACTH stimuláció hatására [175]. Hosszú távon a kortizol (és az aldosteron) termelés túlzott mértékű indukálhatósága kardiovaszkuláris betegségek kialakulását, így megnövekedett mortalitási arányt eredményezhet. Mivel a *C4* és a *CYP21* gének egymással közvetlenül szomszédosak, könnyen lehetséges, hogy a *C4B* gén hiánya szorosan kapcsolt valamely *CYP21A2* szabályozó régióbeli variációval vagy egy megváltozott aktivitású enzimet kódoló *CYP21A2* alléllal, megindokolva a C4B\*Q0 hordozók körében tapasztalt, a szív- és érrendszeri betegségek iránti megnövekedett fogékonyságot. Ennek kimutatására laboratóriumunkban megkezdődött a C4B\*Q0 hordozó illetve nem-hordozó kromoszómákon található *CYP21A2* gének, valamint azok promóter régiójának analízise.

## 6 ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK, KÖVETKEZTETÉSEK

Munkánk eredményeit összegezve az alábbi következtetések vonhatók le:

1. Családfaelemzés révén felmértük a kaukázusi populációban előforduló ősi MHC haplotípusok előfordulását. Megfigyeltük, hogy a kromoszómák közel fele ősi vagy ismétlődően előforduló MHC haplotípust hordoz, ami nem elhanyagolható a betegség-asszociációs genetikai vizsgálatok szempontjából.
2. Megállapítottuk, hogy a *C4A* gén hiányával ellentétben a *C4B* gén hiánya számos eltérő, viszonylag ritka MHC haplotípusban figyelhető meg. Ezzel kizártuk annak lehetőségét, hogy a munkacsoportunk *C4B\*Q0* hordozás és kardiovaszkuláris betegségek kapcsolatáról szóló megfigyelései mögött távoli polimorfizmusok együttes hatása húzódná meg.
3. Kimutattuk, hogy a hazaihoz hasonló MHC haplotípus-mintázat jellemző egy független, nagyságrendileg nagyobb elemszámú kaukázusi populációra is. Ez egyrészt valószínűsíti, hogy egy adott kaukázusi populáció MHC haplotípusaival kapcsolatos észrevételek egyéb, földrajzilag távoli kaukázusi populációk esetében is érvényesek, másrészt igazolja a mintavételezés reprezentatív voltát.
4. A kaukázusiakban előforduló MHC haplotípusokban minden korábbi populációs tanulmánynál részletesebben jellemeztük az RCCX szerkezeti variánsokat és eddig ismeretlen változatokat is azonosítottunk. Bebizonyítottuk azon korábbi feltevéseket, hogy míg a *C4A* gének rendszerint hosszúak, a *C4B* gének gyakorlatilag fele-fele arányban hosszúak és rövidek, továbbá kimutattuk, hogy multimoduláris szerkezetek esetében a telomerikus modulban többnyire *C4A* gén található.
5. A 15 azonosított RCCX struktúra között három *C4B* gén hiányosat találtunk. A két gyakoribb típus előfordulási aránya szinte megegyezett, vagyis a *C4B\*Q0* hordozás nem köthető egyetlen jellegzetes RCCX szerkezeti variánshoz.

6. Ötvenöt *C4* gén vizsgálatával kimutattuk, hogy a 35. intronban található *CYP21* regulációs elemek bázissorrendje nem tér el sem az azonos, sem az eltérő izotípusú fehérjét kódoló *C4* gének esetében. Így kizártuk a lehetőséget, hogy a *C4B\*Q0* hordozók körében tapasztalt fokozott kardiovaszkuláris rizikó hátterében a *C4A* illetve a *C4B* génekben található transzkripciós faktor kötőhelyek szekvenciái közötti eltérés állna.
  
7. Megvizsgáltuk a *C4B* géndózis és a *C4* génnel közvetlenül szomszédos *CYP21A2* gén befolyása alatt álló néhány szteroid hormon, valamint az ACTH kapcsolatát nem-hormontermelő, jóindulatú mellékvese incidentalómás betegcsoportban. Szignifikáns különbségeket mutattunk ki a *C4B\*Q0* hordozók és nem hordozók nyugalmi ACTH illetve az indukált kortizol szintjei között, továbbá a kortikoszteron és az aldoszteron indukálhatósága, valamint a kortizol gátlhatósága között is. Az eredmények arra utalnak, hogy a *C4B* gén hiánya valamely *CYP21A2* gént érintő variációval kapcsolt, ami a 21-hidroxiláz enzim expressziójának könnyebb indukálhatóságát, ezáltal a stresszválasz módosulását és a kardiovaszkuláris betegségek iránti fogékonyság növekedését eredményezheti.

## 7 ÖSSZEFOGLALÁS

A kardiovaszkuláris betegségek korunk egyik legfőbb népbetegségének számítanak; a hátterükben meghúzódó okok feltárása intenzív kutatás tárgya. Az elmúlt évtizedek során munkacsoportunk felfedezte, hogy a *C4B* gén hiányos (ún. *C4B\*Q0* hordozó) haplotípusok myocardialis infarktusra, stroke-ra és koronária artéria betegségre is hajlamosítanak, illetve rontják az infarktuson átesettek rövid távú életben maradási esélyeit.

A jelenség molekuláris hátterére azonban a *C4B* fehérje csökkent szérumszintje nem ad kielégítő magyarázatot, így az okot a genetikai kapcsoltságban kerestük. Mivel a *C4* gének a kiterjedt linkage disequilibriumról nevezetes MHC régióban találhatóak, feltérképeztük a kaukázusi populációban előforduló konzervált haplotípusokat, valamint részletesen jellemeztük a kaukázusiakban előforduló, a *C4* géneket is magukba foglaló RCCX szerkezeti variánsokat is és megvizsgáltuk, hogy a *C4B* gén hiánya jellemző-e ezek egyikére. Elemeztük a *C4* géneken belüli, a közvetlenül szomszédos, szteroid bioszintézishez elengedhetetlen *CYP21A2* gén expresszióját szabályozó szekvenciákat. Végezetül összehasonlítottuk az ACTH alap valamint különböző szteroid hormonok alap és indukált szérumkoncentrációit *C4B\*Q0* hordozó és nem hordozó mellékvese incidentalómásokban.

Eredményeink alapján a távoli genetikai régiók szerepét elvethetjük, mivel gyakran előforduló *C4B* gén hiányos MHC haplotípust nem sikerült azonosítanunk. Hasonlóképpen a *C4B\*Q0* hordozó RCCX szerkezetek között sem találtunk olyat, amelyik számottevően gyakrabban fordulna elő a többinél. Adatainkból az is kiderült, hogy a két izotípust kódoló *C4* gének kriptikus *CYP21A2* regulációs szekvenciái nem térnek el egymástól. A *C4B\*Q0* hordozók és a nem hordozók szteroid szintjeivel kapcsolatosan azonban jellegzetes eltéréseket tapasztaltunk. Az eredmények arra utalnak, hogy a *C4B* gén hiányos kromoszómákon található *CYP21A2* gének expressziója az átlagnál hatékonyabban indukálható. Ez minden valószínűség szerint kihat a stresszválásra és hosszú távon megnöveli a szervezet glükokortikoidoknak való kitettségét, ami viszont a kardiovaszkuláris betegségek ismert rizikófaktora, így magyarázatot adhat a munkacsoportunk korábbi, *C4B\*Q0* hordozók kapcsán tett megfigyeléseire.

## 8 SUMMARY

Cardiovascular diseases are considered as a major public health problem of our time; possible factors in their background are intensively studied. During the last decades our workgroup has discovered that haplotypes lacking the *C4B* gene (also called *C4B\*Q0* carriers) increase proneness to myocardial infarction, stroke and coronary artery disease, and they also reduce short-term survival after myocardial infarction.

However, decreased *C4B* serum levels do not give a satisfactory explanation to the molecular background of the phenomenon, thus we sought the reason in genetic linkage. As the *C4* genes are located in the MHC region notable for long-range linkage disequilibrium, we explored ancestral MHC haplotypes occurring in the Caucasian population as well as characterized in detail the *C4* gene-containing RCCX structural variants that occur among Caucasians and examined if the lack of *C4B* genes is characteristic of any of those. We analyzed the regulatory sequences located within the *C4* genes that affect expression of the directly neighboring *CYP21A2* gene indispensable for steroid biosynthesis. Finally, basal ACTH as well as basal and induced serum concentrations of some steroid hormones in *C4B\*Q0* carrier and non-carrier patients with adrenal incidentaloma were compared.

According to our results, the role of distant genetic regions can be excluded as no frequently occurring MHC haplotype lacking *C4B* genes was identified. Similarly, *C4B\*Q0* carrier RCCX structures belonged to different variants, none occurring considerably more frequently than the others. Our data also revealed that there is no difference between the cryptic *CYP21A2* regulatory sequences within *C4A* and *C4B* genes. However, we identified characteristic differences with regard to steroid levels of *C4B\*Q0* carriers and non-carriers. The results indicate that expression of *CYP21A2* genes in chromosomes lacking *C4B* genes can be induced more effectively than average. Most probably this also influences the stress response and increases long-term glucocorticoid exposure of the organism, which is a known risk factor for cardiovascular diseases, thus it may provide an explanation to our workgroup's former observations regarding *C4B\*Q0* carriers.

## 9 HIVATKOZÁSOK

1. Horton, R., et al., *Gene map of the extended human MHC*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(12): p. 889-99.
2. Thorsby, E., *A short history of HLA*. Tissue Antigens, 2009. **74**(2): p. 101-16.
3. Klein, J. and Sato, A., *The HLA system. First of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(10): p. 702-9.
4. Natarajan, K., et al., *MHC class I molecules, structure and function*. Rev Immunogenet, 1999. **1**(1): p. 32-46.
5. Jones, E.Y., et al., *MHC class II proteins and disease: a structural perspective*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(4): p. 271-82.
6. Rajnavölgyi, É. and Gergely, J. *Antigénfelismerés II*. In: Gergely, J. and Erdei, A. (szerk), Immunbiológia. Medicina Könyvkiadó, Budapest, 2000. p. 100-128.
7. Klein, J. and Sato, A., *The HLA system. Second of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(11): p. 782-6.
8. Terasaki, P.I. and McClelland, J.D., *Microdroplet Assay of Human Serum Cytotoxins*. Nature, 1964. **204**: p. 998-1000.
9. Dalva, K. and Beksac, M., *HLA typing with sequence-specific oligonucleotide primed PCR (PCR-SSO) and use of the Luminex technology*. Methods Mol Med, 2007. **134**: p. 61-9.
10. Dalva, K. and Beksac, M., *Sequence-specific primed PCR (PCR-SSP) typing of HLA Class I and Class II alleles*. Methods Mol Med, 2007. **134**: p. 51-60.
11. Allen, R.L., *Non-classical immunology*. Genome Biol, 2001. **2**(2): p. REPORTS4004.
12. Callahan, M.K., et al., *Heat shock up-regulates Imp2 and Imp7 and enhances presentation of immunoproteasome-dependent epitopes*. J Immunol, 2006. **177**(12): p. 8393-9.
13. Alfonso, C. and Karlsson, L., *Nonclassical MHC class II molecules*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 113-42.
14. Degli-Esposti, M.A., et al., *Ancestral haplotypes: conserved population MHC haplotypes*. Hum Immunol, 1992. **34**(4): p. 242-52.
15. Alper, C.A., et al., *The haplotype structure of the human major histocompatibility complex*. Hum Immunol, 2006. **67**(1-2): p. 73-84.
16. Dawkins, R., et al., *Genomics of the major histocompatibility complex: haplotypes, duplication, retroviruses and disease*. Immunol Rev, 1999. **167**: p. 275-304.
17. Yunis, E.J., et al., *Inheritable variable sizes of DNA stretches in the human MHC: conserved extended haplotypes and their fragments or blocks*. Tissue Antigens, 2003. **62**(1): p. 1-20.
18. Romero, V., et al., *Genetic fixity in the human major histocompatibility complex and block size diversity in the class I region including HLA-E*. BMC Genet, 2007. **8**: p. 14.
19. Dorak, M.T., et al., *Conserved extended haplotypes of the major histocompatibility complex: further characterization*. Genes Immun, 2006. **7**(6): p. 450-67.
20. Traherne, J.A., et al., *Genetic analysis of completely sequenced disease-associated MHC haplotypes identifies shuffling of segments in recent human history*. PLoS Genet, 2006. **2**(1): p. e9.
21. Kiszkel, P., et al., *Frequency of carriers of 8.1 ancestral haplotype and its fragments in two Caucasian populations*. Immunol Invest, 2007. **36**(3): p. 307-19.
22. Candore, G., et al., *Pathogenesis of autoimmune diseases associated with 8.1 ancestral haplotype: a genetically determined defect of C4 influences immunological parameters of healthy carriers of the haplotype*. Biomed Pharmacother, 2003. **57**(7): p. 274-7.
23. Candore, G., et al., *Genetic control of immune response in carriers of the 8.1 ancestral haplotype: correlation with levels of IgG subclasses: its relevance in the pathogenesis of autoimmune diseases*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1110**: p. 151-8.



24. Price, P., et al., *The genetic basis for the association of the 8.1 ancestral haplotype (A1, B8, DR3) with multiple immunopathological diseases*. Immunol Rev, 1999. **167**: p. 257-74.
25. Toth, E.K., et al., *The 8.1 ancestral MHC haplotype is strongly associated with colorectal cancer risk*. Int J Cancer, 2007. **121**(8): p. 1744-8.
26. Rubio, J.P., et al., *Extended haplotype analysis in the HLA complex reveals an increased frequency of the HFE-C282Y mutation in individuals with multiple sclerosis*. Hum Genet, 2004. **114**(6): p. 573-80.
27. Santiago, J.L., et al., *Localization of Type 1 Diabetes susceptibility in the ancestral haplotype 18.2 by high density SNP mapping*. Genomics, 2009. **94**(4): p. 228-32.
28. Tay, G.K., et al., *PERB11 (MIC): a polymorphic MHC gene is expressed in skin and single nucleotide polymorphisms are associated with psoriasis*. Clin Exp Immunol, 2000. **119**(3): p. 553-8.
29. Price, P., et al., *Two major histocompatibility complex haplotypes influence susceptibility to sporadic inclusion body myositis: critical evaluation of an association with HLA-DR3*. Tissue Antigens, 2004. **64**(5): p. 575-80.
30. Scott, A.P., et al., *Sporadic inclusion body myositis in Japanese is associated with the MHC ancestral haplotype 52.1*. Neuromuscul Disord, 2006. **16**(5): p. 311-5.
31. Thomson, G., et al., *Relative predispositional effects of HLA class II DRB1-DQB1 haplotypes and genotypes on type 1 diabetes: a meta-analysis*. Tissue Antigens, 2007. **70**(2): p. 110-27.
32. Lambert, A.P., et al., *Absolute risk of childhood-onset type 1 diabetes defined by human leukocyte antigen class II genotype: a population-based study in the United Kingdom*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(8): p. 4037-43.
33. Daniels, W.W., et al., *Increased frequency of the extended or ancestral haplotype B44-SC30-DR4 in autism*. Neuropsychobiology, 1995. **32**(3): p. 120-3.
34. Ayabe, T., et al., *Association of Primary Ovarian Insufficiency with a Specific Human Leukocyte Antigen Haplotype (A\*24:02-C\*03:03-B\*35:01) in Japanese Women*. Sex Dev, 2011.
35. Chapman, J.M., et al., *Detecting disease associations due to linkage disequilibrium using haplotype tags: a class of tests and the determinants of statistical power*. Hum Hered, 2003. **56**(1-3): p. 18-31.
36. Laki, J., et al., *The HLA 8.1 ancestral haplotype is strongly linked to the C allele of -429T>C promoter polymorphism of receptor of the advanced glycation endproduct (RAGE) gene. Haplotype-independent association of the -429C allele with high hemoglobinA1C levels in diabetic patients*. Mol Immunol, 2007. **44**(4): p. 648-55.
37. Chung, E.K., et al., *Genetic sophistication of human complement components C4A and C4B and RP-C4-CYP21-TNX (RCCX) modules in the major histocompatibility complex*. Am J Hum Genet, 2002. **71**(4): p. 823-37.
38. Wu, Y.L., et al., *Phenotypes, genotypes and disease susceptibility associated with gene copy number variations: complement C4 CNVs in European American healthy subjects and those with systemic lupus erythematosus*. Cytogenet Genome Res, 2008. **123**(1-4): p. 131-41.
39. Sargent, C.A., et al., *Characterisation of the novel gene G11 lying adjacent to the complement C4A gene in the human major histocompatibility complex*. Hum Mol Genet, 1994. **3**(3): p. 481-8.
40. Bristow, J., et al., *Tenascin-X: a novel extracellular matrix protein encoded by the human XB gene overlapping P450c21B*. J Cell Biol, 1993. **122**(1): p. 265-78.
41. Shen, L., et al., *Structure and genetics of the partially duplicated gene RP located immediately upstream of the complement C4A and the C4B genes in the HLA class III region. Molecular cloning, exon-intron structure, composite retroposon, and breakpoint of gene duplication*. J Biol Chem, 1994. **269**(11): p. 8466-76.

42. Higashi, Y., et al., *Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(9): p. 2841-5.
43. Blanchong, C.A., et al., *Deficiencies of human complement component C4A and C4B and heterozygosity in length variants of RP-C4-CYP21-TNX (RCCX) modules in caucasians. The load of RCCX genetic diversity on major histocompatibility complex-associated disease*. J Exp Med, 2000. **191**(12): p. 2183-96.
44. Tee, M.K., et al., *Sequences promoting the transcription of the human XA gene overlapping P450c21A correctly predict the presence of a novel, adrenal-specific, truncated form of tenascin-X*. Genomics, 1995. **28**(2): p. 171-8.
45. Bristow, J., et al., *Abundant adrenal-specific transcription of the human P450c21A "pseudogene"*. J Biol Chem, 1993. **268**(17): p. 12919-24.
46. Tee, M.K., et al., *A promoter within intron 35 of the human C4A gene initiates abundant adrenal-specific transcription of a 1 kb RNA: location of a cryptic CYP21 promoter element?* Hum Mol Genet, 1995. **4**(11): p. 2109-16.
47. Brellier, F., Tucker, R.P., and Chiquet-Ehrismann, R., *Tenascins and their implications in diseases and tissue mechanics*. Scand J Med Sci Sports, 2009. **19**(4): p. 511-9.
48. Voermans, N.C., et al., *Neuromuscular involvement in various types of Ehlers-Danlos syndrome*. Ann Neurol, 2009. **65**(6): p. 687-97.
49. Lehner, B., et al., *Analysis of a high-throughput yeast two-hybrid system and its use to predict the function of intracellular proteins encoded within the human MHC class III region*. Genomics, 2004. **83**(1): p. 153-67.
50. Kato, A., et al., *Induction of truncated form of tenascin-X (XB-S) through dissociation of HDAC1 from SP-1/HDAC1 complex in response to hypoxic conditions*. Exp Cell Res, 2008. **314**(14): p. 2661-73.
51. Gitelman, S.E., Bristow, J., and Miller, W.L., *Mechanism and consequences of the duplication of the human C4/P450c21/gene X locus*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(5): p. 2124-34.
52. Goncalves, J., Friaes, A., and Moura, L., *Congenital adrenal hyperplasia: focus on the molecular basis of 21-hydroxylase deficiency*. Expert Rev Mol Med, 2007. **9**(11): p. 1-23.
53. Wilson, R.C., et al., *Ethnic-specific distribution of mutations in 716 patients with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency*. Mol Genet Metab, 2007. **90**(4): p. 414-21.
54. Lee, H.H., *Chimeric CYP21P/CYP21 and TNXA/TNXB genes in the RCCX module*. Mol Genet Metab, 2005. **84**(1): p. 4-8.
55. Yang, Y., et al., *Gene copy-number variation and associated polymorphisms of complement component C4 in human systemic lupus erythematosus (SLE): low copy number is a risk factor for and high copy number is a protective factor against SLE susceptibility in European Americans*. Am J Hum Genet, 2007. **80**(6): p. 1037-54.
56. Chung, E.K., et al., *Determining the one, two, three, or four long and short loci of human complement C4 in a major histocompatibility complex haplotype encoding C4A or C4B proteins*. Am J Hum Genet, 2002. **71**(4): p. 810-22.
57. Saxena, K., et al., *Great genotypic and phenotypic diversities associated with copy-number variations of complement C4 and RP-C4-CYP21-TNX (RCCX) modules: a comparison of Asian-Indian and European American populations*. Mol Immunol, 2009. **46**(7): p. 1289-303.
58. Yu, C.Y., et al., *Dancing with complement C4 and the RP-C4-CYP21-TNX (RCCX) modules of the major histocompatibility complex*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 2003. **75**: p. 217-92.
59. Blanchong, C.A., et al., *Genetic, structural and functional diversities of human complement components C4A and C4B and their mouse homologues, Slp and C4*. Int Immunopharmacol, 2001. **1**(3): p. 365-92.

60. Erdei, A. *Komplementrendszer*. In: Gergely, J. and Erdei, A. (szerk), *Immunbiológia. Medicina Könyvkiadó, Budapest, 2000. p. 249-268.*
61. Ricklin, D., et al., *Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis*. *Nat Immunol*, 2010. **11**(9): p. 785-97.
62. Yang, Y., et al., *Diversity in intrinsic strengths of the human complement system: serum C4 protein concentrations correlate with C4 gene size and polygenic variations, hemolytic activities, and body mass index*. *J Immunol*, 2003. **171**(5): p. 2734-45.
63. Dodds, A.W., et al., *The reaction mechanism of the internal thioester in the human complement component C4*. *Nature*, 1996. **379**(6561): p. 177-9.
64. Yu, C.Y., et al., *Structural basis of the polymorphism of human complement components C4A and C4B: gene size, reactivity and antigenicity*. *EMBO J*, 1986. **5**(11): p. 2873-81.
65. Schneider, P.M., et al., *The endogenous retroviral insertion in the human complement C4 gene modulates the expression of homologous genes by antisense inhibition*. *Immunogenetics*, 2001. **53**(1): p. 1-9.
66. Mack, M., Bender, K., and Schneider, P.M., *Detection of retroviral antisense transcripts and promoter activity of the HERV-K(C4) insertion in the MHC class III region*. *Immunogenetics*, 2004. **56**(5): p. 321-32.
67. Lokki, M.L., et al., *Deficiency of human complement protein C4 due to identical frameshift mutations in the C4A and C4B genes*. *J Immunol*, 1999. **162**(6): p. 3687-93.
68. Lhotta, K., et al., *Membranous nephropathy in a patient with hereditary complete complement C4 deficiency*. *Nephrol Dial Transplant*, 2004. **19**(4): p. 990-3.
69. Rupert, K.L., et al., *The molecular basis of complete complement C4A and C4B deficiencies in a systemic lupus erythematosus patient with homozygous C4A and C4B mutant genes*. *J Immunol*, 2002. **169**(3): p. 1570-8.
70. Skattum, L., et al., *Complement deficiency states and associated infections*. *Mol Immunol*, 2011. **48**(14): p. 1643-55.
71. Kristjansdottir, H., et al., *Association of three systemic lupus erythematosus susceptibility factors, PD-1.3A, C4AQ0, and low levels of mannan-binding lectin, with autoimmune manifestations in Icelandic multicase systemic lupus erythematosus families*. *Arthritis Rheum*, 2008. **58**(12): p. 3865-72.
72. Lhotta, K., et al., *Polymorphism of complement C4 and susceptibility to IDDM and microvascular complications*. *Diabetes Care*, 1996. **19**(1): p. 53-5.
73. Park, M.H., et al., *Association of complement alleles C4AQ0 and C4B5 with rheumatoid arthritis in Koreans*. *Ann Rheum Dis*, 1996. **55**(10): p. 776-8.
74. Arason, G.J., et al., *Deficiency of complement-dependent prevention of immune precipitation in systemic sclerosis*. *Ann Rheum Dis*, 2002. **61**(3): p. 257-60.
75. Scully, L.J., et al., *Early-onset autoimmune hepatitis is associated with a C4A gene deletion*. *Gastroenterology*, 1993. **104**(5): p. 1478-84.
76. Nityanand, S., et al., *Circulating immune complexes and complement C4 null alleles in patients operated on for premature atherosclerotic peripheral vascular disease*. *J Clin Immunol*, 1999. **19**(6): p. 406-13.
77. Stefansson Thors, V., et al., *Increased frequency of C4B\*Q0 alleles in patients with Henoch-Schonlein purpura*. *Scand J Immunol*, 2005. **61**(3): p. 274-8.
78. Odell, D., et al., *Confirmation of the association of the C4B null allele in autism*. *Hum Immunol*, 2005. **66**(2): p. 140-5.
79. Mayilyan, K.R., et al., *Complement C4B protein in schizophrenia*. *World J Biol Psychiatry*, 2008. **9**(3): p. 225-30.
80. Rowe, P.C., et al., *Association of homozygous C4B deficiency with bacterial meningitis*. *J Infect Dis*, 1989. **160**(3): p. 448-51.
81. Jaatinen, T., et al., *Total C4B deficiency due to gene deletion and gene conversion in a patient with severe infections*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2003. **10**(2): p. 195-201.

82. Arason, G.J., et al., *An age-associated decrease in the frequency of C4B\*Q0 indicates that null alleles of complement may affect health or survival.* Ann N Y Acad Sci, 2003. **1010**: p. 496-9.
83. Kramer, J., et al., *A marked drop in the incidence of the null allele of the B gene of the fourth component of complement (C4B\*Q0) in elderly subjects: C4B\*Q0 as a probable negative selection factor for survival.* Hum Genet, 1991. **86**(6): p. 595-8.
84. Kramer, J., et al., *C4B\*Q0 allotype as a risk factor for myocardial infarction.* BMJ, 1994. **309**: p. 313-314.
85. Szalai, C., et al., *Association of polymorphisms and allelic combinations in the tumour necrosis factor-alpha-complement MHC region with coronary artery disease.* J Med Genet, 2002. **39**(1): p. 46-51.
86. Kramer, J., et al., *Frequencies of certain complement protein alleles and serum levels of anti-heat-shock protein antibodies in cerebrovascular diseases.* Stroke, 2000. **31**(11): p. 2648-52.
87. Blasko, B., et al., *Low complement C4B gene copy number predicts short-term mortality after acute myocardial infarction.* Int Immunol, 2008. **20**(1): p. 31-7.
88. Arason, G.J., et al., *Smoking and a complement gene polymorphism interact in promoting cardiovascular disease morbidity and mortality.* Clin Exp Immunol, 2007. **149**(1): p. 132-8.
89. Varga, L., et al., *Decreased inhibition of immune precipitation by sera with the C2 B allotype.* Clin Immunol Immunopathol, 1991. **59**(1): p. 65-71.
90. Makrides, S.C., *Therapeutic inhibition of the complement system.* Pharmacol Rev, 1998. **50**(1): p. 59-87.
91. Bjerre, M., Hansen, T.K., and Flyvbjerg, A., *Complement activation and cardiovascular disease.* Horm Metab Res, 2008. **40**(9): p. 626-34.
92. Szilagyi, A. and Fust, G., *Diseases associated with the low copy number of the C4B gene encoding C4, the fourth component of complement.* Cytogenet Genome Res, 2008. **123**(1-4): p. 118-30.
93. Arason, G.J., et al., *Defective prevention of immune precipitation in autoimmune diseases is independent of C4A\*Q0.* Clin Exp Immunol, 2005. **140**(3): p. 572-9.
94. Sjöholm, A.G., et al., *Complement deficiency and disease: an update.* Mol Immunol, 2006. **43**(1-2): p. 78-85.
95. White, P.C. and Speiser, P.W., *Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency.* Endocr Rev, 2000. **21**(3): p. 245-91.
96. Robins, T., et al., *Molecular model of human CYP21 based on mammalian CYP2C5: structural features correlate with clinical severity of mutations causing congenital adrenal hyperplasia.* Mol Endocrinol, 2006. **20**(11): p. 2946-64.
97. Concolino, P., et al., *Molecular diagnosis of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: an update of new CYP21A2 mutations.* Clin Chem Lab Med, 2010. **48**(8): p. 1057-62.
98. Stenson, P.D., et al., *The Human Gene Mutation Database: 2008 update.* Genome Med, 2009. **1**(1): p. 13.
99. Wijesuriya, S.D., et al., *Transcriptional regulatory elements of the human gene for cytochrome P450c21 (steroid 21-hydroxylase) lie within intron 35 of the linked C4B gene.* J Biol Chem, 1999. **274**(53): p. 38097-106.
100. Chang, S.F. and Chung, B.C., *Difference in transcriptional activity of two homologous CYP21A genes.* Mol Endocrinol, 1995. **9**(10): p. 1330-6.
101. Bonfiglio, J.J., et al., *The corticotropin-releasing hormone network and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: molecular and cellular mechanisms involved.* Neuroendocrinology, 2011. **94**(1): p. 12-20.
102. Girotti, M., Weinberg, M.S., and Spencer, R.L., *Diurnal expression of functional and clock-related genes throughout the rat HPA axis: system-wide shifts in response to a restricted feeding schedule.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **296**(4): p. E888-97.

103. Daikoku, S., et al., *Light stimulation of the hypothalamic neuroendocrine system*. Arch Histol Cytol, 1992. **55**(1): p. 67-76.
104. Habets, P., et al., *Pituitary volume, stress reactivity and genetic risk for psychotic disorder*. Psychol Med, 2011: p. 1-11.
105. Beishuizen, A. and Thijs, L.G., *Endotoxin and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis*. J Endotoxin Res, 2003. **9**(1): p. 3-24.
106. Rogalska, J., *Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in hippocampus: their impact on neurons survival and behavioral impairment after neonatal brain injury*. Vitam Horm, 2010. **82**: p. 391-419.
107. Mitra, R., Ferguson, D., and Sapolsky, R.M., *Mineralocorticoid receptor overexpression in basolateral amygdala reduces corticosterone secretion and anxiety*. Biol Psychiatry, 2009. **66**(7): p. 686-90.
108. Chrousos, G.P., *The stress response and immune function: clinical implications. The 1999 Novera H. Spector Lecture*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **917**: p. 38-67.
109. Kalantaridou, S.N., et al., *Stress and the female reproductive system*. J Reprod Immunol, 2004. **62**(1-2): p. 61-8.
110. Ferrari, E. and Magri, F., *Role of neuroendocrine pathways in cognitive decline during aging*. Ageing Res Rev, 2008. **7**(3): p. 225-33.
111. Fink, G., *Stress controversies: post-traumatic stress disorder, hippocampal volume, gastroduodenal ulceration\**. J Neuroendocrinol, 2011. **23**(2): p. 107-17.
112. Nijm, J. and Jonasson, L., *Inflammation and cortisol response in coronary artery disease*. Ann Med, 2009. **41**(3): p. 224-33.
113. Schneiderman, N., Ironson, G., and Siegel, S.D., *Stress and health: psychological, behavioral, and biological determinants*. Annu Rev Clin Psychol, 2005. **1**: p. 607-28.
114. Sapolsky, R.M., *Stress, the Aging Brain and the Mechanisms of Neuron Death*. 1992, Cambridge: MIT Press. p. 223.
115. Speiser, P.W. and White, P.C., *Congenital adrenal hyperplasia*. N Engl J Med, 2003. **349**(8): p. 776-88.
116. Claahsen-van der Grinten, H.L., et al., *Congenital adrenal hyperplasia--pharmacologic interventions from the prenatal phase to adulthood*. Pharmacol Ther, 2011. **132**(1): p. 1-14.
117. Dolzan, V., et al., *Mutational spectrum of steroid 21-hydroxylase and the genotype-phenotype association in Middle European patients with congenital adrenal hyperplasia*. Eur J Endocrinol, 2005. **153**(1): p. 99-106.
118. Krone, N., et al., *Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(3): p. 1059-65.
119. Napolitano, E., et al., *Correlation between genotype and hormonal levels in heterozygous mutation carriers and non-carriers of 21-hydroxylase deficiency*. J Endocrinol Invest, 2011. **34**(7): p. 498-501.
120. Admoni, O., et al., *Hyperandrogenism in carriers of CYP21 mutations: the role of genotype*. Clin Endocrinol (Oxf), 2006. **64**(6): p. 645-51.
121. Roche, E.F., et al., *Blood pressure in children and adolescents with congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency): a preliminary report*. Clin Endocrinol (Oxf), 2003. **58**(5): p. 589-96.
122. Volkl, T.M., et al., *Obesity among children and adolescents with classic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency*. Pediatrics, 2006. **117**(1): p. e98-105.
123. Falhammar, H., et al., *Metabolic profile and body composition in adult women with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(1): p. 110-6.
124. Sartorato, P., et al., *Cardiovascular risk factors and ultrasound evaluation of intima-media thickness at common carotids, carotid bulbs, and femoral and abdominal aorta*

- arteries in patients with classic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007. **92**(3): p. 1015-8.
125. Aladzsity, I., et al., *Analysis of the 8.1 ancestral MHC haplotype in severe, pneumonia-related sepsis*. *Clin Immunol*, 2011. **139**(3): p. 282-9.
126. Madach, K., et al., *4G/5G polymorphism of PAI-1 gene is associated with multiple organ dysfunction and septic shock in pneumonia induced severe sepsis: prospective, observational, genetic study*. *Crit Care*, 2010. **14**(2): p. R79.
127. Szeplaki, G., et al., *Association of high serum concentration of the third component of complement (C3) with pre-existing severe coronary artery disease and new vascular events in women*. *Atherosclerosis*, 2004. **177**(2): p. 383-9.
128. Miller, S.A., Dykes, D.D., and Polesky, H.F., *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. *Nucleic Acids Res*, 1988. **16**(3): p. 1215.
129. Seidemann, K., et al., *Tumor necrosis factor and lymphotoxin alfa genetic polymorphisms and outcome in pediatric patients with non-Hodgkin's lymphoma: results from Berlin-Frankfurt-Munster Trial NHL-BFM 95*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(33): p. 8414-21.
130. Vargas-Alarcon, G., et al., *Heat shock protein 70 gene polymorphisms in Mexican patients with spondyloarthropathies*. *Ann Rheum Dis*, 2002. **61**(1): p. 48-51.
131. Jahn, I., et al., *Genomic analysis of the F subtypes of human complement factor B*. *Eur J Immunogenet*, 1994. **21**(6): p. 415-23.
132. Hudson, B.I., et al., *Effects of novel polymorphisms in the RAGE gene on transcriptional regulation and their association with diabetic retinopathy*. *Diabetes*, 2001. **50**(6): p. 1505-11.
133. Pozsonyi, E., et al., *HLA-association of serum levels of natural antibodies*. *Mol Immunol*, 2009. **46**(7): p. 1416-23.
134. Szilagyi, A., et al., *Real-time PCR quantification of human complement C4A and C4B genes*. *BMC Genet*, 2006. **7**: p. 1.
135. Wu, Y.L., et al., *Sensitive and specific real-time polymerase chain reaction assays to accurately determine copy number variations (CNVs) of human complement C4A, C4B, C4-long, C4-short, and RCCX modules: elucidation of C4 CNVs in 50 consanguineous subjects with defined HLA genotypes*. *J Immunol*, 2007. **179**(5): p. 3012-25.
136. Patocs, A., et al., *Hormonal evaluation and mutation screening for steroid 21-hydroxylase deficiency in patients with unilateral and bilateral adrenal incidentalomas*. *Eur J Endocrinol*, 2002. **147**(3): p. 349-55.
137. Toth, M., et al., *Comparative analysis of plasma 17-hydroxyprogesterone and cortisol responses to ACTH in patients with various adrenal tumors before and after unilateral adrenalectomy*. *J Endocrinol Invest*, 2000. **23**(5): p. 287-94.
138. Toth, M., et al., *Plasma dehydroepiandrosterone sulfate levels in patients with hyperfunctioning and non-hyperfunctioning adrenal tumors before and after adrenal surgery*. *Eur J Endocrinol*, 1997. **136**(3): p. 290-5.
139. Excoffier, L., Laval, G., and Schneider, S., *Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis*. *Evol Bioinform Online*, 2005. **1**: p. 47-50.
140. Vatay, A., et al., *Relationship between complement components C4A and C4B diversities and two TNFA promoter polymorphisms in two healthy Caucasian populations*. *Hum Immunol*, 2003. **64**(5): p. 543-52.
141. Alper, C.A., Awdeh, Z., and Yunis, E.J., *Conserved, extended MHC haplotypes*. *Exp Clin Immunogenet*, 1992. **9**(2): p. 58-71.
142. Ahmad, T., et al., *Haplotype-specific linkage disequilibrium patterns define the genetic topography of the human MHC*. *Hum Mol Genet*, 2003. **12**(6): p. 647-56.
143. Miretti, M.M., et al., *A high-resolution linkage-disequilibrium map of the human major histocompatibility complex and first generation of tag single-nucleotide polymorphisms*. *Am J Hum Genet*, 2005. **76**(4): p. 634-46.

144. Walsh, E.C., et al., *An integrated haplotype map of the human major histocompatibility complex*. Am J Hum Genet, 2003. **73**(3): p. 580-90.
145. Ide, A., et al., *"Extended" A1, B8, DR3 haplotype shows remarkable linkage disequilibrium but is similar to nonextended haplotypes in terms of diabetes risk*. Diabetes, 2005. **54**(6): p. 1879-83.
146. Hanchard, N., et al., *Implications of inter-population linkage disequilibrium patterns on the approach to a disease association study in the human MHC class III*. Immunogenetics, 2006. **58**(5-6): p. 465-70.
147. Ozaki, K., et al., *Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction*. Nat Genet, 2002. **32**(4): p. 650-4.
148. Wilson, A.G., et al., *Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(7): p. 3195-9.
149. Papiha, S.S., Duggan-Keen, M., and Roberts, D.F., *Factor B (BF) allotypes and multiple sclerosis in north-east England*. Hum Hered, 1991. **41**(6): p. 397-402.
150. da Rosa Utiyama, S.R., da Silva Kotze, L.M., and de Messias Reason, I.T., *Complement factor B allotypes in the susceptibility and severity of coeliac disease in patients and relatives*. Int J Immunogenet, 2005. **32**(5): p. 307-14.
151. Giacconi, R., et al., *1267 HSP70-2 polymorphism as a risk factor for carotid plaque rupture and cerebral ischaemia in old type 2 diabetes-atherosclerotic patients*. Mech Ageing Dev, 2005. **126**(8): p. 866-73.
152. Giacconi, R., et al., *Involvement of -308 TNF-alpha and 1267 Hsp70-2 polymorphisms and zinc status in the susceptibility of coronary artery disease (CAD) in old patients*. Biogerontology, 2006. **7**(5-6): p. 347-56.
153. Gombos, T., et al., *Interaction of serum 70-kDa heat shock protein levels and HspA1B (+1267) gene polymorphism with disease severity in patients with chronic heart failure*. Cell Stress Chaperones, 2008. **13**(2): p. 199-206.
154. Yu, A., et al., *Comparison of human genetic and sequence-based physical maps*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 951-3.
155. Aly, T.A., et al., *Multi-SNP analysis of MHC region: remarkable conservation of HLA-A1-B8-DR3 haplotype*. Diabetes, 2006. **55**(5): p. 1265-9.
156. Nowak, J., et al., *Haplotype-specific pattern of association of human major histocompatibility complex with non-Hodgkin's lymphoma outcome*. Tissue Antigens, 2008. **71**(1): p. 16-26.
157. Mauff, G., et al., *Reference typing report for complement component C4*. Exp Clin Immunogenet, 1998. **15**(4): p. 249-60.
158. Horton, R., et al., *Variation analysis and gene annotation of eight MHC haplotypes: the MHC Haplotype Project*. Immunogenetics, 2008. **60**(1): p. 1-18.
159. Carroll, M.C., et al., *Structure and organization of the C4 genes*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1984. **306**(1129): p. 379-88.
160. Dangel, A.W., et al., *The dichotomous size variation of human complement C4 genes is mediated by a novel family of endogenous retroviruses, which also establishes species-specific genomic patterns among Old World primates*. Immunogenetics, 1994. **40**(6): p. 425-36.
161. Mansmann, G., et al., *The clinically inapparent adrenal mass: update in diagnosis and management*. Endocr Rev, 2004. **25**(2): p. 309-40.
162. Kramer, J., et al., *C4B\*Q0 allotype as risk factor for myocardial infarction*. BMJ, 1994. **309**(6950): p. 313-4.
163. McEwen, B.S., *Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators*. Eur J Pharmacol, 2008. **583**(2-3): p. 174-85.
164. Homo-Delarche, F., et al., *Sex steroids, glucocorticoids, stress and autoimmunity*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1991. **40**(4-6): p. 619-37.

165. Stoney, C.M., et al., *Lipid reactivity to stress: I. Comparison of chronic and acute stress responses in middle-aged airline pilots*. Health Psychol, 1999. **18**(3): p. 241-50.
166. Chandola, T., et al., *Work stress and coronary heart disease: what are the mechanisms?* Eur Heart J, 2008. **29**(5): p. 640-8.
167. Jokinen, J. and Nordstrom, P., *HPA axis hyperactivity and cardiovascular mortality in mood disorder inpatients*. J Affect Disord, 2009. **116**(1-2): p. 88-92.
168. Kubzansky, L.D. and Adler, G.K., *Aldosterone: a forgotten mediator of the relationship between psychological stress and heart disease*. Neurosci Biobehav Rev, 2010. **34**(1): p. 80-6.
169. Funder, J.W., *Reconsidering the roles of the mineralocorticoid receptor*. Hypertension, 2009. **53**(2): p. 286-90.
170. Milliez, P., et al., *Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism*. J Am Coll Cardiol, 2005. **45**(8): p. 1243-8.
171. Pitt, B., et al., *Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction*. N Engl J Med, 2003. **348**(14): p. 1309-21.
172. Pitt, B., et al., *The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators*. N Engl J Med, 1999. **341**(10): p. 709-17.
173. Mendelson, J.H., et al., *Effects of smoking successive low- and high-nicotine cigarettes on hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormones and mood in men*. Neuropsychopharmacology, 2008. **33**(4): p. 749-60.
174. Mendelson, J.H., et al., *Effects of low- and high-nicotine cigarette smoking on mood states and the HPA axis in men*. Neuropsychopharmacology, 2005. **30**(9): p. 1751-63.
175. Witchel, S.F., et al., *Evidence for a heterozygote advantage in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(7): p. 2097-101.



## 10 SAJÁT PUBLIKÁCIÓK

### *Az értekezéshez felhasznált saját közlemények:*

1. Szilagyi A\*, **Banlaki Z\***, Pozsonyi E, Yunis EJ, Awdeh ZL, Hosso A, Rajczy K, Larsen CE, Fici DA, Alper CA, Fust G. *Frequent occurrence of conserved extended haplotypes (CEHs) in two Caucasian populations*. Mol Immunol. 2010 Jun;47(10):1899-904  
\* megosztott első szerzők
2. **Banlaki Z**, Raizer G, Acs B, Majnik J, Doleschall M, Szilagyi A, Racz K, Fust G, Patocs A. *ACTH-induced cortisol release is related to the copy number of the C4B gene encoding the fourth component of complement in patients with adrenal incidentaloma*. Clin Endocrinol (Oxf). 2012 Apr;76(4):478-84

### *Kéziratok:*

3. **Banlaki Z**, Doleschall M, Rajczy K, Fust G, Szilagyi A. *Fine-tuned characterization of RCCX copy number variants and their relation to extended MHC haplotypes*. (Publikálásra elfogadva a Genes & Immunity-ben)

### *Egyéb témában megjelent társszerzős közlemények:*

4. Blasko B, **Banlaki Z**, Gyapay G, Pozsonyi E, Sasvari-Szekely M, Rajczy K, Fust G, Szilagyi A. *Linkage analysis of the C4A/C4B copy number variation and polymorphisms of the adjacent steroid 21-hydroxylase gene in a healthy population*. Mol Immunol. 2009 Aug;46(13):2623-9
5. Pozsonyi E, Gyorgy B, Berki T, **Banlaki Z**, Buzas E, Rajczy K, Hosso A, Prohaszka Z, Szilagyi A, Cervenak L, Fust G. *HLA-association of serum levels of natural antibodies*. Mol Immunol. 2009 Apr;46(7):1416-23

## 11 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

*Szeretnék köszönetet mondani:*

Témavezetőmnek, Füst György Professzor Úrnak, aki kísérleteimet irányította és észrevételeivel, javaslataival elősegítette szakmai fejlődésemet. Köszönöm kedvességét, türelmét és minden támogatását.

Prohászka Zoltánnak, aki lehetőséget nyújtott számomra, hogy a kutatólaboratóriumában dolgozhassak, és mindvégig figyelemmel követte munkámat.

Szilágyi Ágnesnek, munkám közvetlen irányítójának az elméleti és gyakorlati munkában nyújtott segítségéért, biztatásáért és hasznos tanácsaiért.

Blaskó Bernadettnek, Kovács Margitnak és Bíró Adriennek, akik bevezettek a molekuláris biológiai technikák világába, és türelemmel kísérték első lépéseimet.

Sasvári Mária Professzor Asszonynak, hogy a génkópia-szám mérések elvégzéséhez rendelkezésre bocsátotta laboratóriumát.

Chester Alper Professzor Úrnak, hogy megosztotta velünk a bostoni kaukázusi populáció MHC haplotípusai vizsgálata során kapott, korábban nem publikált eredményeit.

Rajczy Katalinnak a családvizsgálatos DNS mintákért.

Patócs Attilának a mellékvese incidentalómás betegcsoport mintáiért és hormonális adataikért.

Mandl József és Gergely Péter Professzor Uraknak, hogy helyet biztosítottak számomra a Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola Elméleti és Klinikai Immunológia programjában.

Michael Kirschfink és Peter Altevogt Professzor Uraknak, hogy németországi laboratóriumukban értékes tapasztalatokat szerezhettem.

Minden társszerzőnek, akik kísérleteikkel, javaslataikkal hozzájárultak az eredmények publikálásához. Köszönöm a Kutatólaboratórium összes dolgozójának, hallgatójának a jó hangulatú közös munkát, tanácsokat, ötleteket.

Családomnak, akik megértő türelmükkel és szeretetükkel mindvégig mellettem álltak.