

Lipid és glükóz metabolizmust befolyásoló polimorfizmusok vizsgálata elhízott gyermek populációs mintákban

Ph.D. értekezés tézisei

Horvatovich Katalin

Témavezető: Prof. Dr. Melegh Béla



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Orvosi Genetikai Intézet
Pécs

2011

1. BEVEZETÉS

Az elhízás és a következményeként fellépő betegségek csírái már a korai életszakaszokban is egyre gyakrabban megfigyelhetők, ezért egyre nagyobb kihívást jelent a gyermekgyógyászok számára is. A WHO (World Health Organization) 2004-ben végzett felmérések alapján az egész világon körülbelül 22 millióra becsüli az öt év alatti túlsúlyos vagy elhízott gyermekek számát. Széleskörű epidemiológiai vizsgálatok azt mutatják, hogy Európában, Amerikában és Ázsiában a gyermekkori túlsúly és elhízás prevalenciája már 10-20% közé tehető. Magyarországon, az iskolás gyermekek között az elhízás prevalenciája az 1980-as és 1990-es évek között elérte a 15%-ot. Irodalmi adatok szerint az elhízott gyermekek 58%-ánál társult kockázati tényezők is jelen lehetnek (magas vérzsír szint, magasabb vérnyomás vagy inzulinrezisztencia). Az elsődleges (exogén) elhízás eseteinek nagy többségére vonatkozóan elmondható, hogy az elhízás egy komplex, heterogén állapot, amelyben környezeti és genetikai tényezők egyaránt szerepet játszanak. Ikervizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy az öröklött tényezők 50-90%-ban játszanak szerepet a zsírszövet kialakulásában. Ma már kb. 200 olyan, 12 különböző kromoszómán elhelyezkedő kandidátus (hajlamosító) gén, lókuszt vagy kromoszómarégiót ismert, melyek kapcsolatba hozhatók az elhízással.

1.1. A gyermekkori elhízás kapcsolata kardiovaszkuláris betegségekkel

Irodalmi adatok igazolják, hogy a gyermekkori elhízás kritikus szerepet játszik az ateroszklerózis és az MS (metabolikus szindróma) korai kialakulásában, amely jelentősen megnöveli a nem-inzulin-dependens diabétesz mellitusz (T2DM) és a kardiovaszkuláris betegségek kockázatát. Irodalmi adatok szerint az elhízott gyermekekben is kimutathatók olyan szív-érrendszeri rizikófaktorok, mint a dyslipidemia (emelkedett koleszterin és triglicerid koncentráció), hipertónia, glükóz intolerancia és 2-es típusú diabétesz. Ezen faktorok együttes előfordulása jellemző a MS fellépése esetén. Epidemiológiai vizsgálatok során Magyarországon a 8-18 év közötti elhízott serdülők 8,9%-ánál detektálták a metabolikus szindrómát. Gyermekkorban az MS fellépése nemcsak kedvezőtlen prognosztikai problémát jelent a szív és érrendszeri megbetegedések kockázatát illetően, hanem jelen idejű kedvezőtlen jelenségekkel is jár, mint a csökkent fizikai terhelhetőség. A T2DM klasszikus példája a környezeti, viselkedési és genetikai hatások közötti kölcsönhatások eredményeképpen létrejött komplex betegségeknek. Az elhízással kapcsolatos kedvezőtlen tendencia a T2DM gyermek- és serdülőkorban való megjelenése is. A betegség érinti a

szénhidrát-, a lipid-, sőt a fehérje és a nukleinsav-anyagcserét is. Az utóbbi években egyes populációkban járványszerű mértékben növekedett a gyermek- és serdülőkori T2DM esetek száma, arányuk megközelíti az új megbetegedések 50%-át.

1.2. Molekuláris genetikai háttér

Különböző vizsgálatok bizonyították, hogy a testsúly variabilitás 30-80%-a genetikailag meghatározott. A genetikai tényezők közül legjelentősebbek a glükóz- és lipidmetabolizmusban résztvevő fehérjéket kódoló gének defektusai, melyek a glükóz- és lipidháztartás zavarát okozzák, és következményesen szív- és érrendszeri károsodást eredményeznek.

1.2.1. Az apolipoprotein A5 gén (*APOA5*)

A 11-es kromoszómán található *APOA1-C3-A4-A5* gén család tartalmaz legalább három olyan gént amely befolyásolja a plazma lipoprotein metabolizmusát. Az apolipoprotein család legújabb tagját, az apolipoprotein A5 (*APOA5*) gént az egér és humán genom összehasonlító szekvenálása során fedezték fel 2001-ben. Számos különböző felnőtt populációt vizsgáló tanulmány bizonyítottan leírta, hogy az *APOA5* gén variánsainak jelenléte [*T-1131C* (rs662799), *IVS3+G476A* (rs2072560), *T1259C* (rs2266788) és a *C56G* (rs3135506)] emelkedett triglicerid koncentrációt eredményez. Az *APOA5* gén vizsgálatai során kiderítették, hogy a gén természetes variánsai által determinált haplocsoportok fontosabb, komplexebb hatással bírnak a lipid paraméterekre.

Egészséges, felnőtt, kaukázusi populációkban végzett haplocsoport analízisek azt mutatták, hogy az *APOA5**2 (*-1131C*, *IVS3+476A* és *I259C*) haplotípus kockázati tényezőt jelent különböző kardiovaszkuláris betegségek kialakulására, ezen felül egy korábbi felnőttpopulációs vizsgálatainkban a haplotípus jelenléte kizárólagos hajlamosító kockázatot mutatott a metabolikus szindróma kialakulására.

1.2.2. A glükokináz regulátor enzim génje (*GCKR*)

A glükokináz regulátor gént (*GCKR*) a 23-as kromoszómán lokalizálták (2p23.3-p23.2), amely 19 exont tartalmaz, és egy 625 aminosavból álló proteint kódol. A glükokináz regulátor protein (*GCKR*) a máj kulcsfontosságú glükokináz (*GCK*) enzimének működését szabályozza. A glükokináz enzim központi szerepet játszik a vér glükóz-homeosztázisában, valamint a májsejtekben, és a hasnyálmirigy β -sejtjeiben a glükóz-foszforilációt végzi. Több irodalmi adat utal rá, hogy a *GCKR* gén inverz hatást gyakorol a glükóz- és triglicerid-szintekre, mely szerint a gén bizonyos polimorfizmusainak közvetett hatására emelkedik a plazma triglicerid-szintje, ezzel egyidejűleg a glükóz koncentráció csökkenése figyelhető meg. A *GCKR* gén két leggyakrabban vizsgált polimorfizmusa az intronikus rs780094 (intron 16) variáns és az exonikus rs1260326 (1337T) (exon 15) variáns. A T2DM-re irányuló genomi asszociációs (GWAS=genom wide association study) vizsgálatok kimutatták, hogy a *GCKR* mindkét polimorfizmusa összefüggést mutat magas triglicerid koncentrációval, alacsony glükóz szinttel és csökkent inzulin rezisztenciával. Ezen felül az rs780094 A és az rs1260326 T allél hordozása kisebb kockázatot mutatott a 2-es típusú diabétesz kialakulására nézve.

2. VIZSGÁLATI CÉLKITŰZÉSEK

Lipid,- és glükóz metabolizmusban szerepet játszó genetikai variánsok analízise, melyek összefüggésbe hozhatóak az elhízással.

1. Elhízott gyermekpopulációban végzett vizsgálataim egyik fő tárgyát a felnőtt MS-sel, hipertrigliceridémiával összefüggésbe hozott *APOA5* gén gyakori természetes variánsainak alléleloszlása (*T-1131C*, *C56G*, *IVS3+G476A*, *T1259C*) és a variánsok által képzett haplocsoportok (*APOA5*1*, *APOA5*2*, *APOA5*3*, *APOA5*4*, *APOA5*5*) prevalenciája képezte.
2. Továbbá vizsgáltam az *APOA5 T-1131C*, *C56G*, *IVS3+G476A*, *T1259C* alléljeinek és a variánsok által képzett haplocsoportoknak az elhízott és normál súlyú, egészséges gyermekek triglicerid- és koleszterin értékeire gyakorolt hatását.

3. Megfigyeléseim egy részét az *APOA5* génben található négy variáns minor alléljeinek, másik részét az általuk képezett haplocsoportoknak a gyermekkori elhízás kialakulásában betöltött esetleges kockázati, hajlamosító szerepének felderítése képezte.
4. Az elhízott gyermekpopulációban végzett vizsgálataim másik fő tárgyát a glükóz metabolizmusban kulcs szerepet játszó glükokináz regulátor (*GCKR*) gén két gyakori, természetes variánsának (rs1260326T, rs780094A) alléleloszlása képezte.
5. További megfigyeléseket végeztem annak kiderítésére, hogy a *GCKR* génben található két eltérés a nemzetközi szakirodalomban leírtakhoz hasonlóan ellentétes hatást gyakorolnak-e a triglicerid és glükóz értékekre.
6. Végül vizsgálataimmal arra kerestem a választ, hogy az rs1260326T és rs780094A variánsok milyen összefüggést mutatnak a gyermekkori elhízás kialakulásával.

3. BETEG ÉS MÓDSZER

3.1. A vizsgált betegpopuláció jellemzői

Az *APOA5* gén vizsgálatában 232 elhízott gyermek (138 fiú, 94 lány, kor: $13,7 \pm 0,16$ év, BMI: $31,8 \pm 0,34$ kg/m²) és 137 egészséges, normál testsúlyú kontroll (58 fiú, 79 lány, kor: $14,8 \pm 0,19$ év, BMI: $20,0 \pm 0,25$ kg/m²) gyermek vett részt; míg a *GCKR* gén esetében 221 elhízott gyermek (122 fiú, 99 lány, kor: $13,5 \pm 0,16$ év, BMI: $31,5 \pm 0,32$ kg/m²) és 115 kontroll egyén (56 fiú, 59 lány, kor: $14,1 \pm 0,21$ év, BMI: $20,2 \pm 0,32$ kg/m²) mintájával dolgoztunk. Munkánk során a rendelkezésünkre álló DNS vizsgálati minták egy része elfogyott, ez magyarázza az egyes polimorfizmusok esetén a különböző mintaszámokat. A vizsgálatból kizártuk azokat az egyéneket, akik bármiféle krónikus megbetegedésben szenvedtek, endokrinológiai, táplálkozási zavart, növekedésbeli és renális problémákat vagy hormonális elhízást mutattak. A vizsgálatban résztvevők közül egyik egyén sem kapott gyógyszerkezelést. A vizsgált alanyok DNS mintái és klinikai adatai egy helyi biobankban lettek elhelyezve. A helyi biobank létrejötté az Egészségügyi Tudományos Tanács és Kutatásértékelési Bizottság engedélye alapján valósult meg.

3.2. Antropológiai mérések és klinikai paraméterek

Az antropológiai méréseket azonos mértékegységben végeztük. A testmagasságot 0.1 cm pontosságú Holtain stadiométerrel, a testsúlyt 0,1 kg pontosságú mérlegkaron végeztük. A BMI (body mass index) értékét a mért testsúly és a magasság négyzetének hányadosával (kg/m^2) kaptuk meg. Egy gyermeket akkor tekintettünk elhízottnak, ha a BMI értéke túllépte a Cole és mtsai. által leközölt határértéket, amely a 18 éves korra nézve 25 (Cole és mtsai). Az éhgyomri vérminták levétele és megfelelő előkészítése után a triglicerid és a totál koleszterin paraméterek mérését Roche Modular automatikus rendszer (Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland) segítségével végeztük.

Azokat a gyermekeket tekintettük hipertrigliceridémiásnak (HTG), akiknek a triglicerid-szintje egyenlő vagy nagyobb értéket mutatott a gyermekeknél leírt határértékkel ($\text{TG} \geq 1.1$ mmol/l, de Ferranti és mtsai).

3.3. Genotípus elemzés

A DNS-izolálást EDTA-val alvadásgátolt vérmintákból rutin kisózásos módszerrel végeztük. A DNS-analízis kiindulópontja a polimeráz lánreakció (PCR) útján végzett amplifikáció volt, mely standard módon az adott szekvenciára specifikus, szintetikus oligonukleotid primerek, Taq polimeráz, dNTP, reakció puffer és az adott genomiális DNS-templát jelenlétében játszódott le. A vizsgált összes variáns esetén a PCR reakció 50 μl végtérfogata 5 μl reakció puffert (500 mM KCl, 14 mM MgCl_2 , 10 mM Tris-HCl, pH 9,0), 1 μl 50 mM MgCl_2 -ot, 0,2 mM dNTP-t, 1 Unit egység Taq polimerázt, 0,2 mM adekvát specifikus primer párt és 1 μg DNS templátot tartalmazott. A vizsgált SNP-ket tartalmazó szekvenciák amplifikációjához MJ Research PTC 200 PCR készüléket (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) alkalmaztunk. A PCR termékek analizálása gélelektroforézis, etidium bromidos festés és UV-megvilágítás segítségével történt. A polimeráz lánreakciót követően a különböző génekben (*APOA5*, *GCKR*) lévő eltérések esetén a mutációk/polimorfizmusok meghatározására RFLP módszert alkalmaztunk. Ennek során a felsokszorozott DNS szakaszokat restrikciós endonukleáz enzimekkel hasítottuk. Mindegyik módszer úgy lett tervezve, hogy a restrikciós enzimek egy obligát hasító hellyel rendelkezzenek, így ellenőrizve az enzimátikus emésztés eredményességét.

3.4. Statisztikai elemzés

A statisztikai analíziseket az SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) szoftver programcsomaggal végeztük. Minden kvantitatív analízis eredménye átlag \pm SEM (standard error of the mean) formájában van feltüntetve. A kvantitatív paraméterek elhízott és kontroll csoport közötti összehasonlítására Mann-Whitney tesztet alkalmaztunk (*APOA5*, *GCKR*). Az allélok (*APOA5* és *GCKR* gén) és a haplotípus-csoportok (*APOA5* gén) frekvenciáit χ^2 -teszt segítségével hasonlítottuk össze a beteg és a kontroll csoportok között. A kvantitatív paraméterek az egyedi polimorfizmusok közötti (*APOA5*, *GCKR*) és a haplotípus-csoportok (*APOA5* gén) közötti összehasonlításait ANOVA tesztel végeztük. Az elhízás és a vizsgált genetikai variánsok, illetve haplotípus-csoportok között fennálló összefüggés feltárására logisztikus regressziós analízist alkalmaztunk. A szignifikancia (p) határértéke $p \leq 0.05$, míg a konfidencia intervallum (CI) 95%-os volt minden egyes számításnál.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az Apolipoprotein A5 vizsgálat eredményei

Az egyes *APOA5* variáns és a triglicerid szintek közötti összefüggések vizsgálata során azt találtuk, hogy *C56G* polimorfizmust kivéve, az összes allélikus variáns (*-1131C*, az *IVS3+476A* és a *I259C*) összefüggést mutatott emelkedett triglicerid szinttel, mind az elhízott és kontroll gyermek csoportban, összehasonlítva a hordozó és a normál genotípusú alanyok triglicerid értékeit. A *-1131C* allélikus variáns prevalenciája szignifikánsan emelkedett értéket mutatott az elhízott csoportban összehasonlítva az egészséges, normál testsúlyú egyénnel. A regressziós analízis eredményei kimutatták, hogy a *-1131C* mutáns allél jelentős független kockázati faktort jelent a gyermekkori elhízás kialakulására.

A haplocsoport analízis eredményei azt mutatták, hogy az *APOA5*2* és *APOA5*4* haplotípus hordozása szignifikáns trigliceridszint emelkedést eredményezett mindkét csoportban. Ezzel ellentétben, az *APOA5*5* haplotípus jelentős trigliceridszint-csökkentő hatást mutatott.

Az elhízott gyermekekben az *APOA5*2* prevalenciája 2.59-szer nagyobb, míg az *APOA5*5* előfordulási gyakorisága 3.88-szor kisebb értéket mutat, mint a kontroll gyermekekben. A logisztikus regressziós analízis eredményei azt mutatták, hogy az *APOA5*2* haplotípus gyermekekben erősen hajlamosít az elhízás kialakulására (OR: 2.87, CI: (1.29-

6.37), $p=0.01$), míg az *APOA5**5 haplotípus védő fakorként hat az elhízással szemben (OR: 0.25, CI: (0.08-0.83), $p=0.02$).

4.2. A glükokináz regulátor gén vizsgálata (*GCKR*)

Korábban felismerték azt a tényt, hogy a *GCKR* variánsok között (rs780094, rs1260326) szoros LD figyelhető meg, amelyet gyermekpopuláción végzett vizsgálataink során mi is megerősítettünk (LD; $r^2=0.94$) (1. Ábra). Az egyedi *GCKR* variánsok laboratóriumi paraméterekre kifejtett hatásainak vizsgálatakor azt tapasztaltam, hogy mindkét SNP esetén (rs1260326T és rs780094A) a hordozó genotípus (CT+TT az rs1260326 és GA+AA az rs780094) szignifikáns összefüggést mutatott emelkedett triglicerid szinttel és csökkent glükóz koncentrációval összehasonlítva a normál genotípussal, mind az elhízott és mind a kontroll csoportban. Az allélfrekvenciákat vizsgálva egyik SNP esetén sem detektáltunk szignifikáns különbséget az elhízott és kontroll gyermekek között. De a két variánst hordozók (CT+TT az rs1260326 és GA+AA az rs780094 esetén) szignifikánsan kisebb prevalenciát mutattak az elhízott gyermekekben az egészséges kontrollokhoz viszonyítva. A logisztikus regressziós analízis eredményei alapján azt detektáltuk, hogy azoknak, akik hordozzák a *GCKR* rs780094 A vagy az rs1260326 T eltérést kisebb a rizikójuk az elhízás kialakulására (rs780094 A esetén: OR: 0.49, CI: (0.28-0.84), $p=0.010$; rs1260326 T esetén: OR: 0.56, CI: (0.34-1.01), $p=0.035$). Amikor az összevont (elhízott és kontroll) és elhízott gyermekcsoportot triglicerid szint (TG) alapján további két alcsoportba soroltuk, azt tapasztaltuk, hogy mindkét *GCKR* variáns minor allélja nagyobb frekvenciát mutatott a hipertrigliceridémiás gyermekek (HTG) körében a normál triglicerid szintet (NTG) mutató gyermekekhez viszonyítva, mind az összevont és mind az elhízott gyermekcsoportban. A regressziós analízis eredményei alapján azt találtuk, hogy a *GCKR* variánst hordozók (CT + TT rs1260326, GA + AA rs780094) erős korrelációt mutatnak a hipertrigliceridémiával (HTG), mind az elhízott és mind az összes vizsgált gyermeket tartalmazó csoportban, de úgy tűnik, hogy az összefüggés erősebb volt az elhízott csoport esetében.



1. ábra. Az LD-blokk a két *GSKR* SNP esetében.

5. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Az egészségügy egyik legfőbb problémájaként ismert metabolikus szindróma kialakulásában (MS) az elhízás és az inzulin rezisztencia központi szerepet játszik. A gyermekkori elhízás növeli a metabolikus szindróma fiatal felnőtt kori megjelenésének kockázatát. Ez a tény magában foglalja a gyermekkori elhízás megelőzésének és kezelésének jelentős szerepét, hogy csökkentsük az MS felnőttkori kialakulásának az esélyét. Az MS fontos kritériumai közé tartozik az emelkedett triglicerid koncentráció. Humán és egér vizsgálatokban kimutatták, hogy az apolipoprotein-kódoló *APOA5* gén jelentős meghatározója a plazma triglicerid szintjének, ezért széleskörűen kezdtek tanulmányozni különböző nemzetiségű felnőtt MS populációkban. Az *APOA5* hajlamosító variánsait eddig csak egy japán tanulmány vizsgálta elhízott gyermekekben. Ezért döntöttünk úgy, hogy magyar gyermekpopulációban megvizsgáljuk az *APOA5* funkcionális variánsainak a frekvenciáját, eloszlását, és megnézzük, hogy milyen hatást gyakorolnak a lipid paraméterekre, illetve milyen kapcsolatban állhatnak a gyermekkori elhízással magyar populációban. Elhízott, magyar kaukázusi gyermekpopulációban végzett vizsgálataink során, Endo és mtsai eredményeihez hasonlóan, összefüggést találtunk az *APOA5* promóter régió *-1131C* polimorfizmusa és az emelkedett triglicerid szint között. Ezenkívül, az eredményeink azt mutatták, hogy a felnőtt populációkban kapott eredményekkel megegyezően az *APOA5*, *IVS3+476A* és *1259C* variánsok elhízott gyermekekben trigliceridszint-növelő hatást mutattak. Néhány felnőttpopulációt vizsgáló tanulmány foglalkozott a főbb természetesen előforduló *APOA5* haplocsoportok megfigyelésével, de elhízott gyermekeknél mi végeztünk el először haplotípus analízist. Eredményeink azt mutatják, hogy mind az elhízott és kontroll csoportban az *APOA5*2* (*-1131C*, *IVS3+476A*, *1259C*) és *APOA5*4* (*-1131C*) haplocsoport emelkedett triglicerid szintet okozott összehasonlítva az *APOA5*1* (*-1131T*, *IVS3+476G*, *1259T*, *56C*) haplotípusok adataival. Ráadásul a logisztikus regressziós analízis kimutatta, hogy gyermekekben az *APOA5*2* haplotípus hordozása hajlamosító kockázatot jelent az elhízás kialakulására. Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a *-1131C* allél csak az *IVS3+476A* és *1259C* allélok együttes jelenlétével tudja kifejtetni hajlamosító szerepét az elhízás kialakulására. Ezenfelül, eredményeink azt mutatták, hogy a ritka *APOA5*5* haplotípus védő faktort jelent az elhízással szemben a gyermekpopulációban. A felnőtt populációban végzett korábbi vizsgálataink során hasonló eredményt kaptunk, ahol ez a haplocsoport az MS-el szemben mutatott védő hatást.

Összefoglalva az eredményeinket azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az *APOA5* - *1131C* allél hajlamosító hatását az *APOA5*2* haplotípus korlátozza (*-1131C*, *IVS3+476A*

és *I259C* eltérést tartalmazó allélok). Az *APOA5*2* és *APOA5*4* haplotípus variánsok összefüggést mutatnak emelkedett triglicerid-szinttel, míg ezzel ellentétben az *APOA5*5* haplotípus trigliceridszint-csökkentő hatást mutatott, és védő szereppel bírt az elhízással szemben. Megfigyeléseink megerősítéséhez azonban további, nagyobb esetszámú gyermekpopulációs vizsgálatra van szükség.

A korábbi években (2007 és 2008) végzett genomi asszociációs vizsgálatok felismerték, hogy a *GCKR* lókuszon található rs780094 és rs1260326 polimorfizmusok összefüggést mutatnak csökkent glükóz és inzulin koncentrációval illetve emelkedett triglicerid szinttel. Emellett a szakirodalomban közölt eredmények azt mutatták, hogy az rs780094 A allél és az rs1260326 T variáns hordozása csökkenti a T2D kialakulásának a kockázatát. A munkám célja az volt, hogy egyrészt megvizsgáljam a lehetséges összefüggéseket a *GCKR* gén variánsai és a triglicerid- illetve éhgyomri vércukorszint között, másrészt, hogy tanulmányozzuk az rs1260326 és az rs780094 polimorfizmus allél eloszlását magyar elhízott és egészséges, normál súlyú gyermekek csoportjában. Jelenlegi gyermekpopuláción végzett vizsgálatunk eredményei megerősítik a szakirodalomban jelenlévő tényt, hogy a *GCKR* gén két funkcionális variánsa (rs780094A és rs1260326T) inverz hatást fejt ki a triglicerid és a glükóz szintre. Mindkét SNP esetén, a hordozók prevalenciája szignifikánsan alacsonyabb értéket mutatott az elhízott gyermekeknél, mint a kontroll, normál súlyú gyermekek esetén, habár az allélfrekvenciában nem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között. Logisztikus regressziós eredményeink azt mutatták, hogy mindkét *GCKR* variáns hordozása kisebb kockázatot jelent az elhízásra ebben a gyermek populációban, hasonlóan egy kínai felnőtt populáción végzett vizsgálat rs780094 polimorfizmusra irányuló eredményeihez. A gyermekkori elhízás és a 2-es típusú diabétesz mellitusz kialakulási kockázata közötti összefüggésre alapozva, eredményeink azt sugallják, hogy a *GCKR* gén funkcionális alléljei védő hatással bírnak a gyermekkori elhízás manifesztációjával szemben, ennek következtében védő hatást jelenthetnek a felnőttkori diabétesz és metabolikus szindróma kifejlődésével szemben. *GCKR* gént érintő vizsgálatunk eredményeinek alátámasztásához további, nagyobb létszámú gyermekpopulációt érintő vizsgálatokra van szükség.

6. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Megállapítottuk, hogy a vizsgált obese (elhízott) gyermek populációban az *APOA5* variánsok közül a *C56G* polimorfizmust kivéve, az összes allélikus variáns (*-1131C*, az *IVS3+476A* és a *1259C*) összefüggést mutatott az emelkedett triglicerid szinttel, mindkét gyermekcsoportban.
2. Ugyanazon populáció *APOA5* analízise során felismertük, hogy a *-1131C* variánst tartalmazó allél önmagában jelentős független szuszeptibilitási ágenst jelent a gyermekkori elhízás kialakulására.
3. A haplocsoport-vizsgálat eredményei alapján elmondhatjuk, hogy az *APOA5* haplocsoportok közül az *APOA5*2* és *APOA5*4* haplotípus variáns hordozása szignifikáns trigliceridszint emelkedést eredményez mindkét csoportban.
4. A haplocsoportok és az elhízás közötti asszociációs analízis után kijelenthetjük, hogy egy korábbi felnőtt metabolikus szindrómás populációs vizsgálatunk eredményeihez hasonlóan az *APOA5*2* haplotípus jelentős hajlamosító faktorként viselkedett az elhízás kialakulására nézve gyermekkorban, míg a kis előfordulási gyakoriságú *APOA5*5* haplocsoport védő hatást mutatott az elhízás kifejlődésével szemben.
5. A *GCKR* gén variánsainak vizsgálata során, megállapítottuk, hogy a rs780094 és rs1260326 polimorfizmus ellentétes hatást fejt ki a triglicerid és a glükóz szintre. Azok a gyermekek, akik hordozták akár az rs780094A, akár az rs1260326T variánst, emelkedett triglicerid és csökkent glükóz értéket mutattak.
6. A *GCKR* variánsok és az elhízás közötti kapcsolat vizsgálata során detektált eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy mindkét variáns hordozása csökkenti az elhízás kialakulásának kockázatát, annak ellenére, hogy ezek a variánsok emelkedett triglicerid szinttel járnak együtt.

7. PUBLIKÁCIÓS LISTA

7.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Horvatovich K**, Bokor Sz, Barath A, Maasz A, Kisfali P, Jaromi L, Polgar N, Toth D, Repasy J Endreffy E, Molnar D, Melegh D, Haplotype analysis of the apolipoprotein A5 gene in obese pediatric patients. *Int J Pediatr Obes.* 2010 septembere 30.IF: 3.53
2. **Horvatovich K**, Bokor Sz, Polgar N, Kisfali P, Hadarits F, Jaromi L, Csongei V, Repasy J, Molnar D, Melegh B, Functional GCKR gene variants have inverse effects on triglyceride and glucose levels and decreases the risk of obesity in children. *Diab Met.* 2011 IF: 2.43 (Közlésre elfogadva).

7.2. Egyéb közlemények

1. Maász A, **Horvatovich K**, Magyar L, Talián C G, Bokor S, Laczy B, Tamaskó M, Molnár D, Wittmann I, Melegh B. Search for mitochondrial DNA T4291C mutation in Hungarian patients with metabolic syndrome. *Orv Hetil.* 2006;147(15):693-696.
2. Szolnoki Z, Maasz A, Magyar L, **Horvatovich K**, Farago B, Somogyvari F, Kondacs A, Szabo M, Fodor L, Bodor A, Hadarits F, Melegh B. Coexistence of angiotensin II type-1 receptor A1166C and angiotensin-converting enzyme D/D polymorphism suggests susceptibility for small-vessel-associated ischemic stroke. *Neuromolecular Med.* 2006;8(3):353-60. IF: 2.631
3. Szolnoki Z, Maasz A, Magyar L, **Horvatovich K**, Farago B, Somogyvari F, Kondacs A, Szabo M, Bodor A, Hadarits F, Melegh B., The combination of homozygous MTHFR 677T and angiotensin II type-1 receptor 1166C variants confers the risk of small-vessel-associated ischemic stroke. *J Mol Neurosci.* 2007;31(3):201-7. IF: 2.061.
4. Magyar L, Farago B, Bene J, **Horvatovich K**, Lakner L, Varga M, Figler M, Gasztonyi B, Mozsik G, Melegh B. No association of the cytotoxic T-lymphocyte associated gene CTLA4 +49A/G polymorphisms with Crohn's disease and ulcerative colitis in Hungarian population samples. *World J Gastroenterol.* 2007;13(15):2205-8. IF: 2.081.

5. Farago B, Talian G, Maasz A, Magyar L, **Horvatovich K**, Kovacs B, Cserep V, Kisfali P, Kiss G C, Czirjak L, Melegh B Prevalence of functional haplotypes of the peptidylarginine deiminase citrullinating enzyme gene in patients with rheumatoid arthritis: no influence of the presence of anti-citrullinated peptide antibodies. *Clin Exp Rheumatol.* 2007;25(4):523-8. IF:2.189
6. Maász, A., Kisfali, P., **Horvatovich, K.**, Mohás, M., Markó, L., Csöngéi, V., Faragó, B., Járomi, L. Magyar L., Sáfrány, E., Sipeky, Cs., Wittman, I., Melegh, B., Apolipoprotein A5 T-1131C variant confers risk for metabolic syndrome, *Journal of Pathology Oncology Research*, . 2007, 13(3):243-7. IF: 1.272
7. Kisfali P, Mohás M, Maasz A, Hadarits F, Markó L, **Horvatovich K**, Oroszlán T, Bagosi Z, Bujtor Z, Gasztonyi B, Wittmann I, Melegh B., Apolipoprotein A5 IVS3+476A allelic variant associates with increased triglyceride levels and confers risk for development of metabolic syndrome in Hungarians.*Circ J.* 2008 Jan;72(1):40-3. 2.387.
8. **Horvatovich, K.**, Orkenyi, M., Bíró, E., Pongrácz, K., Kisfali, P., Talián, G., Csöngéi, V., Járomi L., Sáfrány, E., Harangi, F., Sulyok, E., Melegh, B., Pseudo-Bartter syndrome in a case of cystic fibrosis caused by C1529G and G3978A compound heterozygosity, *Hungarian Medical Journal (Orvosi Hetilap)*, 2008, 149(7):325-8.
9. Faragó, B., Magyar L., Sáfrány, E., Csöngéi, V., Járomi, L., **Horvatovich, K.**, Sipeky, Cs., Maász, A., Radics, J., Gyetvai, Á., Szekanecz Z., Czirják, L., Melegh, B., Functional variants of interleukin-23 receptor gene confer risk for rheumatoid arthritis but not for systemic sclerosis, *Ann Rheum Dis* Published, doi:10.1136/ard.2007.072819; 2008 Feb;67(2):248-50. IF: 6.411
10. Maasz, A., Kisfali, P., Járomi L., **Horvatovich, K.**, Szolnoki, Z., Csöngéi, V., Sáfrány, E., Sipeky, C., Hadarits, F., Melegh, B., Apolipoprotein A5 gene IVS3+G476A allelic variant confers susceptibility for development of ischemic stroke, *Circulation Journal*, 2008, 72(7):1065-70. IF: 2.373
11. Szolnoki Z, Maasz A., Magyar L., **Horvatovich K.**, Farago B., Kondacs A., Bodor A.,Hadarits F., Orosz P., Ille A., and Melegh B., Galectin-2 3279TT variant protects

against the lymphotoxin-alpha 252GG genotype associated ischaemic stroke. *Clinical neurology and neurosurgery* 111(3):227-30, 2009 Apr IF: 1.32.

12. Kisfali P, Mohás M, Maász A, Polgár N, Hadarits F, Markó L, Brasnyó P, **Horvatovich K**, Oroszlán T, Bagosi Z, Bujtor Z, Gasztonyi B, Rinfel J, Wittmann I, Melegh B. Haplotype analysis of the apolipoprotein A5 gene in patients with the metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2009 Aug 17. IF: 3.565
13. Járomi L, Csöngéi V, Polgár N, Szolnoki Z, Maász A, **Horvatovich K**, Faragó B, Sipeky C, Sáfrány E, Magyar L, Kisfali P, Mohás M, Janicsek I, Lakner L, Melegh B. Functional variants of glucokinase regulatory protein and apolipoprotein A5 genes in ischemic stroke. *J Mol Neurosci.* 2010 May;41(1):121-8. IF: 1

7.3. Idézhető absztraktok (konferencia szereplések)

1. **Horvatovich KZ**, Magyari L, Maasz A, Talian C G, Tamasko M, Laczy B, Wittmann I, Melegh B. Search for mitochondrial DNA T4,291C mutation in Hungarian metabolic syndrome patients. *Eur J Hum Genet.* 2005;13 Suppl. 1, 279.
2. Magyari L, **Horvatovich K**, Bene J, Komlosi K, Nemes E, Melegh B. Novel phenotypic ariant of the OCTN2 V295X mutation. *Eur J Hum Genet.* 2006;14 Suppl. 1, 268
3. **Horvatovich K**, Magyari L, Maasz A, Farago B, Laczy B, Marko L, Wittmann I, Melegh . Association between APOA5-T1131C mutation and triglyceride level in Hungarian patients with metabolic syndrome and diabetes mellitus. *Eur J Hum Genet.* 2006;14 Suppl. 1,236.
4. Farago B, Talian G, Maasz A, Magyari L, **Horvatovich K**, Kovacs B, Cserep V, Kisfali P, Kiss C, Melegh B. Padi4_89*G/A, padi4_90*T/C and padi4_92*G/C SNPs in the gene of the peptidylarginine deiminase citrullinating enzyme type 4 (PADI4) are not associated with rheumatoid arthritis in Hungarian patients. *Eur J Hum Genet.* 2006;14 Suppl. 1, 326.
5. Talian C G, **Horvatovich K**, Maasz A, Magyari L, Illes T, Melegh B. New polymorphisms n the filaminB gene: novel candidates for causing disease? *Eur J Hum Genet.* 2006;14 Suppl. , 250.
6. Faragó B, Talián CsG, Maász A, Magyari L, **Horvatovich K**, Kovács B, Cserép V, Kisfali P, Kiss Cs, Czirják L, Melegh B. A peptidilarginin deimináz enzimet ódoló gén funkcionális haplotípusainak gyakorisága rheumatoid arthritis betegekben. *Klin Kísérl Lab Med* 2006;(S32):101.
7. **Horvatovich K**, Magyari L, Maász A, Faragó B, Laczy B, Markó L, Wittmann I, Melegh B. APOA5 T-1131C mutáció és trigliceridszint közötti összefüggés vizsgálata metabolikus szindrómában és II. típusú diabetes mellitusban szenvedő betegcsoportban. *Klin Kísérl Lab Med* 2006;(S32):69.

8. Magyari L, Farago B, Safrany E, Csongei V, **Horvatovich K**, Jaromi L, Sipeky C, Melegh B. IL-23 receptor 3'UTR C2370A variant in inflammatory bowel disease: differential profile in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Eur J Hum Genet.* 2007;15 Suppl. 1, 255.
9. Farago B, Magyari L, Csongei V, Jaromi L, Safrany E, **Horvatovich K**, Sipeky C, Maasz A, adics J, Czirjak L, Melegh B. Interleukin 23 receptor 3'-UTR C2370A SNP confers risk for rheumatoid arthritis. *Eur J Hum Genet.* 2007;15 Suppl. 1, 256.
10. **Horvatovich K**, Magyari L, Maasz A, Kisfali P, Bokor S, Farago B, Csongei V, Jaromi L, Safrany E, Sipeky C, Molnar D, Melegh B. Apolipoprotein A5 T-1131C alleles in pediatric patients with obesity and metabolic syndrome. *Eur J Hum Genetics*, 2007;15(S1):178.
11. Járomi, L., Maász, A., Szolnoki, Z., Kiszfali, P., **Horvatovich, K.**, Csöngéi, V., Sáfrány, E., Sipeky, Cs., Melegh, B., Apolipoprotein A5 gene T1259C polymorphism associated with elevated circulating triglyceride levels but does not confer susceptibility for ischaemic stroke, *European Human Genetics Conference*, Nice (France), 16th -19th June 2007.
12. Csöngéi, V., Járomi, L., Sáfrány, E., Sipeky, Cs., Maász, A., Magyari, L., **Horvatovich, K.**, Faragó, B., Takács, I., Melegh, B., Polymorphisms of the MDR1 gene in Hungarian Roma population samples, *European Human Genetics Conference*, Nice (France), 16th - 19th June 2007.
13. Maász, A., **Horvatovich, K.**, Kiszfali, P., Mohás, M., Markó, L., Csöngéi, V., Faragó, B., Járomi, L., Magyari, L., Sáfrány, E., Sipeky, Cs., Wittman, I., Melegh, B., Apolipoprotein A5 T-1131C variant confers risk for metabolic syndrome, *European Human Genetics Conference*, Nice (France), 16th -19th June 2007.
14. Sipeky, Cs., Csöngéi, V., Faragó, B., **Horvatovich, K.**, Járomi, L., Magyari, L., Sáfrány, E., Takács, I., Melegh, B., Polymorphisms of CYP2C9 and VKORC1 genes associated with the warfarin metabolism in Hungarian Roma population, *European Human Genetics Conference*, Nice (France), 16th -19th June 2007.

15. Sáfrány, E., Faragó, B., Csöngéi, V., Magyari, L., Maász, A., Sipeky, Cs., Járomi, L., **Horvatovich, K.**, Radics, J., Czirják, L., Melegh, B., Interleukin-23 receptor (IL23R) gene C2370A polymorphism in scleroderma patients, *European Human Genetics Conference*, Nice (France), 16th -19th June 2007.
16. Faragó, B., Magyari, L., Csöngéi, V., Járomi, L., Sáfrány, E., **Horvatovich, K.**, Sipeky, Cs., Maász, A., Radics, J., Czirják, L., Melegh, B., Interleukin-23 receptor 3'-UTR C2370A SNP confers risk for rheumatoid arthritis, *European Human Genetics Conference*, Nice (France), 16th -19th June 2007.
17. Magyari, L., Faragó, B., Sáfrány, E., Csöngéi, V., **Horvatovich, K.**, Járomi, L., Sipeky, Cs., Melegh, B., Interleukin-23 receptor 3'-UTR C2370A variant in inflammatory disease: differential profile in Crohn's disease and ulcerative colitis, *European Human Genetics Conference*, Nice (France), 16th -19th June 2007.
18. Kisfali, P., Mohás, M., **Horvatovich, K.**, Maász, A., Markó, L., Csöngéi, V., Faragó, B., Járomi, L., Magyari, L., Sáfrány, E., Sipeky, cs., Wittman, I., Melegh, B., Common allelic variants of APOA5 gene in the metabolic syndrome, *European Human Genetics Conference*, Nice (France), 16th-19th June 2007.
19. Sipeky, Cs., Csöngéi, V., Faragó, B., **Horvatovich, K.**, Járomi, L., Kisfali, P., Maász, A., Magyari, L., Sáfrány, E., Takács, I., Melegh, B., Haplotype profile of vitamin K epoxide reductase (VKORC1) as determinant of warfarin sensitivity in Roma population, *European Human Genetics Conference*, Barcelona (Spain), 31st May - 4th June 2008.
20. Járomi, L., Csöngéi, V., Sáfrány, E., Faragó, B., Magyari, L., **Horvatovich, K.**, Maász, A., Sipeky, Cs., Melegh, B., Analysis of GCKR and ApoA5 genes in Hungarian patients with ischemic stroke, *European Human Genetics Conference*, Vienna (Austria), 23rd - 26th May 2009.

Összesített impakt faktor (citálható absztraktok nélkül): 32.34

Genetic variants affecting lipid and glucose metabolism in obese pediatric population

Ph.D. thesis

Katalin Horvatovich

Supervisor: Bela Melegh M.D., Ph.D., D.Sc.



Department of Medical Genetics
Faculty of Medicine
University of Pécs

2011

1. INTRODUCTION

As a consequence of obesity the disease germs occur in the early stages of life is increasingly being observed, therefore, it means a growing challenge to pediatricians as well. The WHO (World Health Organization) based on surveys conducted in 2004 throughout the world, estimates that about 22 million children in five years are overweight or obese. Extensive epidemiological studies have shown that in Europe, America and Asia, the prevalence of childhood overweight and obesity is estimated from 10 to 20%. In Hungary, the prevalence of obesity among school children between the 1980s and 1990s, reached 15%. According to the literature, associated risk factors may be present at the 58% of obese children (high blood lipid levels, high blood pressure or insulin resistance). For the majority of cases of primary (exogenous) obesity can be said that obesity is a complex, heterogeneous condition in which both environmental and genetic factors play an important role. Twin studies show that 50-90% of the inherited factors play a role in the development of adipose tissue. Recently, approximately 200 candidate (susceptibility) gene locus or chromosome region, located on 12 different chromosomes, were found to be in relation with obesity.

1.1. The association of the pediatric obesity with cardiovascular diseases (CVD)

Data in literature show that pediatric obesity plays a critical role in early development of atherosclerosis and metabolic syndrome (MS), which significantly increases the risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus and cardiovascular diseases. In several studies cardiovascular risk factors can be also detected in obese children such as dyslipidaemia (elevated triglycerides and cholesterol concentrations), hypertension, glucose intolerance and type 2 diabetes (T2DM). The co-occurrence of these factors is characterized at the onset of MS. In Hungarian epidemiological studies the disease was detected in 8.9% of the obese adolescents at 8-18. The onset of MS in childhood is not only a problem of adverse prognostic for cardiovascular disease risk, but it generates adverse symptoms for present, such as reduced exercise capacity. T2DM is a classic example of a complex disease as environmental and genetic factors as well as interactions among these factors all contribute to disease development. The appearance of T2DM in children and adolescents is the negative trend of obesity. The disease affects carbohydrate, lipid and even protein and nucleic acid metabolism as well. In recent years, in some child and adolescent populations cases of T2DM have epidemically increased, the proportion of new cases is close to 50%.

1.2. Molecular Genetic Background

Various studies have shown that 30-80% of the variability of body weight is genetically determined. The most important genetic factors are the gene defects coding proteins involved in lipid and glucose metabolism, which cause an abnormal metabolism and consequential resulted in cardiovascular disease.

1.2.1. The apolipoprotein A5 gene (*APOA5*)

The *APOA1-C3-A4-A5* gene cluster located on 11 chromosome contains at least three genes affecting the plasma lipoprotein metabolism. Newest member of the apolipoprotein cluster, the apolipoprotein A5 (*APOA5*) gene was reported in 2001 by comparative sequencing of mouse and human genome. Several studies analyzed the naturally occurring variants of the *APOA5* gene [*T-1131C* (rs662799), *IVS3+G476A* (rs2072560), *T1259C* (rs2266788) and *C56G* (rs3135506)], and their association with increased triglyceride concentrations in different normal and pathologic adult populations has already been established. The investigations of the *APOA5* gene revealed that the haplogroups determined by the natural variants in gene have more important and complex implications for the lipid parameters. Haplotype analysis in a healthy, adult Caucasian population showed, that the *APOA5**2 (containing the minor allele of *T-1131C*, *IVS3+G476A* and *T1259C* SNPs) confers risk for different cardiovascular diseases. In addition, in our previous study of adult MS the *APOA5**2 haplotype was found to exclusively confer risk for metabolic syndrome.

1.2.2. The gene of glucokinase regulator enzyme (*GCKR*)

The *GCKR* gene is located on chromosome 2p23.3-p23.2, consists of 19 exons, and encodes a protein of 625 amino acids. The glucokinase regulator protein (*GCKR*) regulates the function of glucokinase (*GCK*), the key enzyme of liver. The glucokinase enzyme has a central role in maintaining blood glucose homeostasis and catalyze the phosphorylation of glucose in hepatocytes and pancreatic cells. More data in the literature show that the *GCKR* gene has inverse effect on the glucose and triglyceride levels, according to which the indirect effect of certain polymorphisms in the gene causes elevated triglyceride levels and reduced glucose concentrations. The two most commonly studied *GCKR* gene polymorphisms are the intronic rs780094 (intron 16) and the rs1260326 exonic (1337) (exon 15) variant. Genome-

wide association studies (GWAS) directed to T2DM revealed that two polymorphisms in *GCKR* gene are associated with elevated triglyceride levels, lower fasting glucose rates and decreased insulin resistance. In addition, the rs780094 A and rs1260326 T alleles were shown to be associated with a decreased risk for T2DM.

2. AIMS

Analyze of genetic variants affecting lipid and glucose metabolism that have association with obesity.

1. One of the main subject of my study was the analysis of *APOA5* gene that is in association with MS and hypertriglyceridemia. My goal was to investigate the distribution of the naturally occurring variants of this gene (*T-1131C*, *C56G*, *IVS3+G476A*, *T1259C*) and the prevalence of haplogroups determined by these variants (*APOA5*1*, *APOA5*2*, *APOA5*3*, *APOA5*4*, *APOA5*5*) in Hungarian obese and healthy, lean children.
2. Furthermore I examined the effects of alleles (*T-1131C*, *C56G*, *IVS3+G476A*, *T1259C*) and haplogroups in *APOA5* gene for triglyceride- and cholesterol parameters in the patients and controls.
3. My observations were focused on the possible susceptibility risk effect of minor alleles and of haplogroups in *APOA5* gene for development of obesity in pediatric population.
4. The other main object of my study was the investigation of two natural occurring variants in the gene of glucokinase regulatory protein (*GCKR*), as an important key in glucose metabolism, directed to their allele frequencies (rs1260326, rs780094).
5. Further observations were carried out to ascertain if the two variants in *GCKR* gene have inverse effect on triglyceride and glucose parameters in obese children similar to results of adult studies.
6. Finally, the aim of the study was to detect if the rs1260326 and rs780094 variants have any relationship with the development of obesity in children.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. Study population

For the *APOA5* gene, the investigations were carried out in 232 obese children (138 boys, 94 girls, age: 13.7 ± 0.16 years, BMI: 31.8 ± 0.34 kg/m²), and in 137 healthy children with normal weight as controls (58 boys, 79 girls, age: 14.8 ± 0.19 years, BMI: 20.0 ± 0.25 kg/m²). For the *GCKR* gene, 221 obese children (122 boys, 99 girls, age: 13.5 ± 0.16 years, body mass index (BMI): 31.5 ± 0.32 kg/m²), and 115 healthy children with normal weight as controls (56 boys, 59 girls, age: 14.1 ± 0.21 years, BMI: 20.2 ± 0.32 kg/m²) were examined. During the study some of DNA samples ran out, which explains the different sample sizes in the cases of the two polymorphisms studied. The subjects were included in the study after the exclusion of chronic diseases, endocrinological, nutritional, growth and renal diseases, or obesity syndromes. None of them were taking any kind of medication either in the obese or control groups. The DNA with the clinical dataset from the patients was deposited into the local biobank. The local biobank was established with the authorization of National Ethics Committee.

3.2. Anthropometric measurements and clinical parameters

Anthropometric measurements were carried out by the same investigator in the survey unit. Body height was measured to the nearest 0.1 cm by a Holtain stadiometer, while weight was obtained to the nearest 0.1 kg on a standard beam scale. BMI was calculated according to the formula: real weight (kg) divided by squared height (m²). We considered children to be obese if their BMI exceeded the value corresponding to 25 at the age of 18 years as suggested by Cole et al. The triglycerides and total cholesterol parameters were measured by Roche Modular automatic system (Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland). The hypertriglyceridemia (HTG) in patients and controls was defined at TG level ≥ 1.1 mmol/l (de Ferranti et al).

3.3. Genetic analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples anticoagulated by EDTA with a routine salting out method. The starting point for DNA analysis was the amplification performed by polymerase chain reaction (PCR) which needs sequence-specific, synthetic oligonucleotide primers, Taq polymerase, dNTP, reaction buffer, and the genomic DNA template. The amplification was in a final volume of 50 μ l including 5 μ l reaction buffer (500 mM KCl, 14 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0), 1 μ l 50 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 1 U of Taq polymerase, 0.2 mM of the adequate specific primer pairs and 1 μ g DNA sample. The amplifications were executed using an MJ Research PTC-200 thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The analysis of PCR products was performed by gel-electrophoresis, etidium-bromid dyeing and was visualized by UV transillumination. After the amplification we used RFLP method to analyze the polymorphisms in different genes (*APOA5*, *GCKR*). During this method the PCR products were digested with restriction endonuclease enzymes. All methods were designed to have an obligatory cleavage site for the restriction enzyme to control the efficacy of the enzymatic digestion.

3.4. Statistical analysis

All statistical calculations were executed using the SPSS 15.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). All data are represented as means \pm SEM. Mann-Whitney U-test was used to compare quantitative data between obese patients and the controls (*APOA5*, *GCKR*). The chi-square test was employed to compare the allele and haplotype frequencies. To compare metabolites data between individual polymorphisms (*APOA5*, *GCKR*) and haplotype cohorts (*APOA5*) we applied one-way ANOVA test. Odds ratios were calculated by multivariate logistic regression analysis to estimate the possible risk influence of polymorphisms (*APOA5*, *GCKR*) and haplotypes (*APOA5*) on the development of obesity in children. The p value \leq 0.05 was considered statistically significant.

4. RESULTS

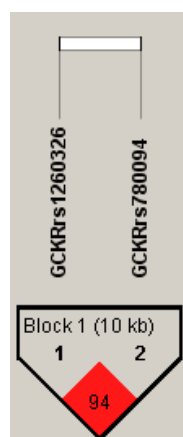
4.1. The analysis of apolipoprotein A5 gene (*APOA5*)

During the investigation of association between *APOA5* variants and triglyceride levels I revealed that with except of the *C56G* polymorphism, all the minor alleles (*-1131C*, *IVS3+476A*, *1259C*) were associated with increased triglyceride levels both in obese children, and in controls comparing individuals with normal and carrier genotypes. For BMI and total serum cholesterol levels, no variant-dependent changes could be detected. The prevalence of *-1131C* allelic variant was significantly elevated in obese pediatric patients as compared to healthy, normal weight children. The regression analysis revealed, that the *-1131C* minor allele alone confers an independent risk for development of pediatric obesity. Results of haplotype analysis on lipid parameters showed that, carrying *APOA5*2* and *APOA5*4* haplotype variants resulted in a significant increase in serum triglyceride levels in both cohorts. In contrast, the *APOA5*5* haplotype had a serum triglyceride level-decreasing effect. Besides, no haplotype-dependent changes were detected in BMI and total serum cholesterol levels concerning all studied haplogroups. The prevalence of the *APOA5*2* was about 2.59-fold increased in obese children, while the accumulation of the *APOA5*5* displayed 3.88-fold decrease in obese subjects compared to healthy, normal weight children. The logistic regression model showed, that the *APOA5*2* haplotype confers significant risk for the development of obesity in pediatric patients (OR: 2.87, CI: (1.29-6.37), $p=0.01$), in contrary, the *APOA5*5* haplotype can behave as a protective factor against obesity in pediatric patients (OR: 0.25, CI: (0.08-0.83), $p=0.02$).

4.2. The examination of glucokinase regulator gene (*GCKR*)

Previously, the rs780094 was demonstrated to be in strong linkage disequilibrium (LD) with the other non-synonymous *GCKR* variant, rs1260326, a finding we could also confirm in our examined pediatric population (LD; $r^2=0.94$) (Figure 1.). During the examination of individual *GCKR* variants, the minor allele carriers of both SNPs (rs1260326T and rs780094A) showed elevated triglyceride, and lowered fasting plasma glucose concentrations compared to the non-carriers in obese patients and in controls as well. We did not observe difference in allele frequencies between obese patients and controls, but the prevalence of carriers (heterozygous and homozygous subjects together) of each variants were significantly decreased in obese children compared to the healthy, lean children. The results of logistic regression models revealed that carriership for both of the *GCKR* rs780094 (GA+AA) and rs1260326 (CT+TT) minor alleles can protect against obesity in children (rs780094 A: OR: 0.49, CI: (0.28-0.84), $p=0.010$; rs1260326 T: OR: 0.56, CI: (0.34-1.01), $p=0.035$).

When the all study subjects and obese children were analyzed separately for HTG, we observed a higher frequency of the minor allele and increased prevalence of carriers of two *GCKR* variants in HTG groups comparing to NTG groups both in all subjects and in obese children. The results of logistic regression analysis showed a strong correlation of carriers (CT+TT rs1260326, GA+AA rs780094) with HTG both in obese group and in all study subjects compared to samples with NTG; but it seems that the correlation was stronger in the obese group.



1. Figure. The LD-block of two *GCKR* SNPs.

5. DISCUSSION

Obesity and insulin resistance play a central role in development of MS, one of the major public-health problems worldwide. Childhood obesity increases the risk of metabolic syndrome development in adulthood, which implies a significant role of prevention and treatment of childhood obesity in reducing risk of MS in adulthood. Elevated blood triglyceride levels also included to the criteria of MS. Therefore, the apolipoprotein-coding *APOA5* gene, which was identified as a significant determinant of plasma triglyceride levels both in human and mice, has been extensively studied in adult MS patients. The *APOA5* susceptibility variants have not been evaluated in obese children but by one Japanese study. Therefore we chose to investigate the frequencies and distributions of *APOA5* functional variants, their effect on lipid parameters and their correlation with childhood obesity in a group of pediatric patients. In agreement with results of Endo and colleagues we found an association between the *APOA5* promoter region polymorphism *-1131C* and elevated triglyceride levels in obese Hungarian Caucasian children. In addition, our results show that the triglyceride-increasing effect of *APOA5*, *IVS3+476A* and *1259C* minor variants are also present in obese children in agreement with results of adult studies reported. Limited data are also available about the major naturally occurring *APOA5* haplogroups in adults due to some recent studies, but we were the first who performed haplotype analysis in obese children. Our data presented here show, that both in obese children and in the control cohorts the *APOA5*2* (*-1131C*, *IVS3+476A*, *1259C*) and *APOA5*4* (*T-1131C* alone) haplogroups are associated with elevated triglyceride levels compared to the cohort having *APOA5*1* haplotype. Additionally, multivariate logistic regression analysis revealed a susceptibility nature of the *APOA5*2* haplotype for the development of obesity in children. Consequently, our results suggest, that contrary to the current belief, the *-1131C* minor allele can contribute to disease susceptibility only in combination with *IVS3+476A* and *1259C* alleles. Moreover, our results also suggested a protective effect of the rare *APOA5*5* haplotype against obesity in pediatric groups similarly to findings reported for an adult MS population. Summarizing our results we conclude, that the risk effect of *T-1131C* allele of *APOA5* is restricted to the *APOA5*2* haplotype (*-1131C*, *IVS3+476A* and *1259C* minor alleles). The *APOA5*2* and *APOA5*4* haplotype variants were found to be in association with elevated triglycerides, by contrast, the *APOA5*5* haplotype had a serum triglyceride level-decreasing effect and was found to have a protective role against obesity. However further examinations in other independent population samples are needed to replicate our findings.

Genome-wide association studies executed in recent years (2007, 2008) revealed that rs780094 and rs1260326 polymorphisms at the *GCKR* locus are associated with decreased fasting glucose and insulin concentrations and with elevated triglyceride levels. In addition, results of several studies in literature showed that rs780094 A and rs1260326 T alleles were shown to be associated with a decreased risk for T2DM. The aim of my work was to investigate the possible associations of *GCKR* gene variants rs780094 and rs1260326 with triglyceride and fasting glucose levels, and to study their allele distributions in Hungarian obese pediatric patients and controls. My results of present study carried out in pediatric population confirmed the inverse effect of both rs780094 and rs1260326 functional *GCKR* gene variants on serum triglyceride and plasma glucose levels similar to data in the literature. The prevalence of carriers for both SNPs were significantly decreased in obese pediatric patients compared to the healthy, lean children, although, the minor allele frequencies did not show significant differences between the patient and control groups. In my study, using logistic regression model, I detected that the carrier form of both *GCKR* variants confer lower risk for development of obesity in this population, partly in agreement with results of a Chinese study evaluating the rs780094 polymorphism in adults. Based on the association of pediatric obesity and risk for development of T2D, our findings suggest that the functional minor alleles of the *GCKR* gene protect against the development of pediatric obesity, and as a consequence show a protective effect against development of T2D and metabolic syndrome in adults. Further examinations in other large pediatric population samples are needed to confirm our findings of *GCKR* gene study.

6. CONCLUSION

1. We conclude that with except of the *C56G* polymorphism, all the minor alleles (*-1131C*, *IVS3+476A*, *1259C*) of *APOA5* variants were associated with increased triglyceride levels both in obese children and in controls as well.
2. During the analysis of the same population, we revealed that the *-1131C* minor allele alone confers an independent risk for development of pediatric obesity.
3. Based on results of haplotype-analysis, we can conclude that carrying of *APOA5*2* and *APOA5*4* haplogroup variants results in elevated triglycerid levels in both patients and controls.
4. After association-analysis between haplogroups and obesity we revealed a susceptibility nature of the *APOA5*2* haplotype for the development of obesity in children, by contrast, the *APOA5*5* haplotype with low prevalence was found to have a protective role against obesity similar to results in our previous adult study with MS.
5. During the investigation of *GCKR* functional variants we detected that both of rs780094 and rs1260326 SNPs have inverse effect on serum triglyceride and plasma glucose levels. Children carrying rs780094A, or rs1260326T variants showed elevated triglycerid and decreased glucose-concentrations.
6. Results detected from analysis of relationship between *GCKR* functional variants and obesity revealed that carrying of each variants reduce risk for obesity despite the elevated triglyceride levels.

7. LIST OF PUBLICATIONS

7.1. The thesis is based on the following publications

1. **Horvatovich K**, Bokor Sz, Barath A, Maasz A, Kisfali P, Jaromi L, Polgar N, Toth D, Repasy J, Endreffy E, Molnar D, Melegh D, Haplotype analysis of the apolipoprotein A5 gene in obese pediatric patients. *Int J Pediatr Obes.* 2010 septembre 30. IF: 3.53
2. **Horvatovich K**, Bokor Sz, Polgar N, Kisfali P, Hadarits F, Jaromi L, Csongei V, Repasy J, Molnar D, Melegh B, Functional GCKR gene variants have inverse effects on triglyceride and glucose levels and decreases the risk of obesity in children. *Diab Met.* 2011 IF: 2.43 (accepted for publishing).

7.2. Other publications

1. Maász A, **Horvatovich K**, Magyar L, Talián C G, Bokor S, Laczy B, Tamaskó M, Molnár D, Wittmann I, Melegh B. Search for mitochondrial DNA T4291C mutation in Hungarian patients with metabolic syndrome. *Orv Hetil.* 2006;147(15):693-696.
2. Szolnoki Z, Maasz A, Magyar L, **Horvatovich K**, Farago B, Somogyvari F, Kondacs A, Szabo M, Fodor L, Bodor A, Hadarits F, Melegh B. Coexistence of angiotensin II type-1 receptor A1166C and angiotensin-converting enzyme D/D polymorphism suggests susceptibility for small-vessel-associated ischemic stroke. *Neuromolecular Med.* 2006;8(3):353-60. IF: 2.631
3. Szolnoki Z, Maasz A, Magyar L, **Horvatovich K**, Farago B, Somogyvari F, Kondacs A, Szabo M, Bodor A, Hadarits F, Melegh B., The combination of homozygous MTHFR 677T and angiotensin II type-1 receptor 1166C variants confers the risk of small-vessel-associated ischemic stroke. *J Mol Neurosci.* 2007;31(3):201-7. IF: 2.061.
4. Magyar L, Farago B, Bene J, **Horvatovich K**, Lakner L, Varga M, Figler M, Gasztonyi B, Mozsik G, Melegh B. No association of the cytotoxic T-lymphocyte associated gene CTLA4

+49A/G polymorphisms with Crohn's disease and ulcerative colitis in Hungarian population samples. *World J Gastroenterol.* 2007;13(15):2205-8. IF: 2.081.

5. Farago B, Talian G, Maasz A, Magyar L, **Horvatovich K**, Kovacs B, Cserep V, Kisfali P, Kiss G C, Czirjak L, Melegh B Prevalence of functional haplotypes of the peptidylarginine deiminase citrullinating enzyme gene in patients with rheumatoid arthritis: no influence of the presence of anti-citrullinated peptide antibodies. *Clin Exp Rheumatol.* 2007;25(4):523-8. IF:2.189
6. Maász, A., Kisfali, P., **Horvatovich, K.**, Mohás, M., Markó, L., Csöngéi, V., Faragó, B., Járomi, L. Magyar, L., Sáfrány, E., Sipeky, Cs., Wittman, I., Melegh, B., Apolipoprotein A5 T-1131C variant confers risk for metabolic syndrome, *Journal of Pathology Oncology Research,* . 2007, 13(3):243-7. IF: 1.272
7. Kisfali P, Mohás M, Maasz A, Hadarits F, Markó L, **Horvatovich K**, Oroszlán T, Bagosi Z, Bujtor Z, Gasztonyi B, Wittmann I, Melegh B., Apolipoprotein A5 IVS3+476A allelic variant associates with increased triglyceride levels and confers risk for development of metabolic syndrome in Hungarians.*Circ J.* 2008 Jan;72(1):40-3. 2.387.
8. **Horvatovich, K.**, Orkenyi, M., Bíró, E., Pongrácz, K., Kisfali, P., Talián, G., Csöngéi, V., Járomi L., Sáfrány, E., Harangi, F., Sulyok, E., Melegh, B., Pseudo-Bartter syndrome in a case of cystic fibrosis caused by C1529G and G3978A compound heterozygosity, *Hungarian Medical Journal (Orvosi Hetilap)*, 2008, 149(7):325-8.
9. Faragó, B., Magyar, L., Sáfrány, E., Csöngéi, V., Járomi, L., **Horvatovich, K.**, Sipeky, Cs., Maász, A., Radics, J., Gyetvai, Á., Szekanecz Z., Czirják, L., Melegh, B., Functional variants of interleukin-23 receptor gene confer risk for rheumatoid arthritis but not for systemic sclerosis, *Ann Rheum Dis* Published, doi:10.1136/ard.2007.072819; 2008 Feb;67(2):248-50. IF: 6.411
10. Maasz, A., Kisfali, P., Járomi L., **Horvatovich, K.**, Szolnoki, Z., Csöngéi, V., Sáfrány, E., Sipeky, C., Hadarits, F., Melegh, B., Apolipoprotein A5 gene IVS3+G476A allelic variant

confers susceptibility for development of ischemic stroke, *Circulation Journal*, 2008, 72(7):1065-70. IF: 2.373

11. Szolnoki Z, Maasz A., Magyari L., **Horvatovich K.**, Farago B., Kondacs A., Bodor A.,Hadarits F., Orosz P., Ille A., and Melegh B., Galectin-2 3279TT variant protects against the lymphotoxin-alpha 252GG genotype associated ischaemic stroke. *Clinical neurology and neurosurgery* 111(3):227-30, 2009 Apr IF: 1.32.

12. Kisfali P, Mohás M, Maász A, Polgár N, Hadarits F, Markó L, Brasnyó P, **Horvatovich K**, Oroszlán T, Bagosi Z, Bujtor Z, Gasztonyi B, Rinfel J, Wittmann I, Melegh B. Haplotype analysis of the apolipoprotein A5 gene in patients with the metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2009 Aug 17. IF: 3.565

13. Járomi L, Csöngéi V, Polgár N, Szolnoki Z, Maász A, **Horvatovich K**, Faragó B, Sipeky C, Sáfrány E, Magyari L, Kisfali P, Mohás M, Janicsek I, Lakner L, Melegh B. Functional variants of glucokinase regulatory protein and apolipoprotein A5 genes in ischemic stroke. *J Mol Neurosci.* 2010 May;41(1):121-8. IF: 1

7.3. Abstracts

1. **Horvatovich KZ**, Magyari L, Maasz A, Talian C G, Tamasko M, Laczy B, Wittmann I, Melegh B. Search for mitochondrial DNA T4,291C mutation in Hungarian metabolic syndrome patients. *Eur J Hum Genet.* 2005;13 Suppl. 1, 279.
2. Magyari L, **Horvatovich K**, Bene J, Komlosi K, Nemes E, Melegh B. Novel phenotypic ariant of the OCTN2 V295X mutation. *Eur J Hum Genet.* 2006;14 Suppl. 1, 268
3. **Horvatovich K**, Magyari L, Maasz A, Farago B, Laczy B, Marko L, Wittmann I, Melegh . Association between APOA5-T1131C mutation and triglyceride level in Hungarian patients with metabolic syndrome and diabetes mellitus. *Eur J Hum Genet.* 2006;14 Suppl. 1,236.
4. Farago B, Talian G, Maasz A, Magyari L, **Horvatovich K**, Kovacs B, Cserep V, Kisfali P, Kiss C, Melegh B. Padi4_89*G/A, padi4_90*T/C and padi4_92*G/C SNPs in the gene of the peptidylarginine deiminase citrullinating enzyme type 4 (PADI4) are not associated with rheumatoid arthritis in Hungarian patients. *Eur J Hum Genet.* 2006;14 Suppl. 1, 326.
5. Talian C G, **Horvatovich K**, Maasz A, Magyari L, Illes T, Melegh B. New polymorphisms n the filaminB gene: novel candidates for causing disease? *Eur J Hum Genet.* 2006;14 Suppl. , 250.
6. Faragó B, Talián CsG, Maász A, Magyari L, **Horvatovich K**, Kovács B, Cserép V, Kisfali P, Kiss Cs, Czirják L, Melegh B. The prevalence of haplotypes of peptidylarginine deiminase citrullinating enzyme gene in Hungarian patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Lab Med* 2006;(S32):101.
7. **Horvatovich K**, Magyari L, Maász A, Faragó B, Laczy B, Markó L, Wittmann I, Melegh B. The examination of association between APOA5 T-1131C variant and triglycerid levels in Hungarian patients with metabolic syndrome and type II. diabetes mellitusban. *Clin Exp Lab Med* 2006;(S32):69.

8. *Magyari L, Farago B, Safrany E, Csongei V, **Horvatovich K**, Jaromi L, Sipeky C, Melegh B.* IL-23 receptor 3'UTR C2370A variant in inflammatory bowel disease: differential profile in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Eur J Hum Genet.* 2007;15 Suppl. 1, 255.
9. *Farago B, Magyari L, Csongei V, Jaromi L, Safrany E, **Horvatovich K**, Sipeky C, Maasz A, adics J, Czirjak L, Melegh B.* Interleukin 23 receptor 3'-UTR C2370A SNP confers risk for rheumatoid arthritis. *Eur J Hum Genet.* 2007;15 Suppl. 1, 256.
10. ***Horvatovich K**, Magyari L, Maasz A, Kisfali P, Bokor S, Farago B, Csongei V, Jaromi L, Safrany E, Sipeky C, Molnar D, Melegh B.* Apolipoprotein A5 T-1131C alleles in pediatric patients with obesity and metabolic syndrome. *Eur J Hum Genetics*, 2007;15(S1):178.
11. *Járomi, L., Maász, A., Szolnoki, Z., Kisfali, P., **Horvatovich, K.**, Csöngéi, V., Sáfrány, E., Sipeky, Cs., Melegh, B.,* Apolipoprotein A5 gene T1259C polymorphism associated with elevated circulating triglyceride levels but does not confer susceptibility for ischaemic stroke, *European Human Genetics Conference*, Nice (France), 16th -19th June 2007.
12. *Csöngéi, V., Járomi, L., Sáfrány, E., Sipeky, Cs., Maász, A., Magyari, L., **Horvatovich, K.**, Faragó, B., Takács, I., Melegh, B.,* Polymorphisms of the MDR1 gene in Hungarian Roma population samples, *European Human Genetics Conference*, Nice (France), 16th - 19th June 2007.
13. *Maász, A., **Horvatovich, K.**, Kisfali, P., Mohás, M., Markó, L., Csöngéi, V., Faragó, B., Járomi, L., Magyari, L., Sáfrány, E., Sipeky, Cs., Wittman, I., Melegh, B.,* Apolipoprotein A5 T-1131C variant confers risk for metabolic syndrome, *European Human Genetics Conference*, Nice (France), 16th -19th June 2007.
14. *Sipeky, Cs., Csöngéi, V., Faragó, B., **Horvatovich, K.**, Járomi, L., Magyari, L., Sáfrány, E., Takács, I., Melegh, B.,* Polymorphisms of CYP2C9 and VKORC1 genes associated with the warfarin metabolism in Hungarian Roma population, *European Human Genetics Conference*, Nice (France), 16th -19th June 2007.

15. Sáfrány, E., Faragó, B., Csöngéi, V., Magyari, L., Maász, A., Sipeky, Cs., Járomi, L., **Horvatovich, K.**, Radics, J., Czirják, L., Melegh, B., Interleukin-23 receptor (IL23R) gene C2370A polymorphism in scleroderma patients, *European Human Genetics Conference*, Nice (France), 16th -19th June 2007.
16. Faragó, B., Magyari, L., Csöngéi, V., Járomi, L., Sáfrány, E., **Horvatovich, K.**, Sipeky, Cs., Maász, A., Radics, J., Czirják, L., Melegh, B., Interleukin-23 receptor 3'-UTR C2370A SNP confers risk for rheumatoid arthritis, *European Human Genetics Conference*, Nice (France), 16th -19th June 2007.
17. Magyari, L., Faragó, B., Sáfrány, E., Csöngéi, V., **Horvatovich, K.**, Járomi, L., Sipeky, Cs., Melegh, B., Interleukin-23 receptor 3'-UTR C2370A variant in inflammatory disease: differential profile in Crohn's disease and ulcerative colitis, *European Human Genetics Conference*, Nice (France), 16th -19th June 2007.
18. Kisfali, P., Mohás, M., **Horvatovich, K.**, Maász, A., Markó, L., Csöngéi, V., Faragó, B., Járomi, L., Magyari, L., Sáfrány, E., Sipeky, cs., Wittman, I., Melegh, B., Common allelic variants of APOA5 gene in the metabolic syndrome, *European Human Genetics Conference*, Nice (France), 16th-19th June 2007.
19. Sipeky, Cs., Csöngéi, V., Faragó, B., **Horvatovich, K.**, Járomi, L., Kisfali, P., Maász, A., Magyari, L., Sáfrány, E., Takács, I., Melegh, B., Haplotype profile of vitamin K epoxide reductase (VKORC1) as determinant of warfarin sensitivity in Roma population, *European Human Genetics Conference*, Barcelona (Spain), 31st May - 4th June 2008.
20. Járomi, L., Csöngéi, V., Sáfrány, E., Faragó, B., Magyari, L., **Horvatovich, K.**, Maász, A., Sipeky, Cs., Melegh, B., Analysis of GCKR and ApoA5 genes in Hungarian patients with ischemic stroke, *European Human Genetics Conference*, Vienna (Austria), 23rd - 26th May 2009.

Cumulative impact factor (without cited abstracts): 32.34