

Hajlamosító gének vizsgálata magyar morbus Crohnos és colitis ulcerosás betegpopulációban

PhD értekezés tézisei

Magyari Lili

PTE ÁOK Orvosi Genetikai és Gyermekfejlődéstani Intézet

Témavezető: Dr. Melegh Béla

2007

1. BEVEZETÉS

1.1. Gyulladásos bélbetegségek jellemzői

A gyulladásos bélbetegségek, angolszász nomenklatúra szerint IBD (Inflammatory bowel disease) közé soroljuk a Crohn-betegséget (Crohn's disease, CD) és a colitis ulcerosát (ulcerative colitis, UC). Hazánkban a betegek száma 20-25 ezerre tehető, a tünetek 20-40 éves kor között jelentkeznek. Mindkét nemből előfordul, nőkben gyakoribb. Környezeti és genetikai faktorok is befolyásolhatják a betegség kifejlődését. Kiváltó okok között szerepelnek külső tényezők, fertőzések, gyógyszerek, mérgek, mérgező anyagok, dohányzás, drogok, alkohol, bélbaktériumok. Nagy jelentőséget tulajdonítanak a genetikai háttérnek, ugyanis fennáll bizonyos genetikai hajlam, mely megnyilvánulhat a bélnyálkahártya csökkent ellenálló képességében és az immunrendszer működési zavarában. Mindez környezeti tényezőkkel társulva gyulladásos folyamatot indít be. A normál bélflórának is szerepe lehet a gyulladás kifejlődésében. A mikrobiális flórát kb. 300-400 különböző baktériumtörzs alkotja. Ezek egyensúlyban vannak a nyálkahártya immunrendszerével. Ez az arány krónikus bélgyulladás esetén felborul, megnövekszik a gyulladásképző baktériumok pl. *Bacteroides* törzsek koncentrációja. Különböző kívülről a szervezetbe bekerült baktériumoknak és vírusoknak is szerepe lehet az IBD kialakulásában (*Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Yersinia enterocolitica*, *cytomegalovírus*, *rotavírus*). Gyakran szövődmények lépnek fel, mint szemtünetek, szájgyulladás, bőrtünetek, epeúti gyulladás, epekő, vesekő, hasnyálmirigy gyulladás, ízületi problémák.

1.1.1. Crohn betegség

Ismeretlen eredetű, idült gyulladásos gasztrointestinális kórkép, mely nevét Burill Crohn amerikai belgyógyásztól kapta. Leggyakrabban a vékony- és a vastagbelet, ritkábban a tápcsatorna felsőbb szakaszait (nyelőcső, gyomor) érintheti. A betegség korlátozódhat csak a vékonybélre (ileitis), érintett lehet a vékonybél és a vastagbél egy része (ileocolitis), előfordul, hogy csupán a vastagbelet érinti (granulomatosis colitis). Az esetek nagy részében a terminális vékonybélre lokalizálódik a gyulladás (terminális ileitis). Esetenként a vékonybél több szakasza (regionális enteritis), illetve a vastagbél több szakasza (Crohn-colitis) vesz részt a betegség kialakulásában. Tünetei: hasi fájdalom, haspuffadás, hasmenés, véres széklet, sipolyképződés, fisztulák, láz, étvágytalanság, hányás, fogyás, növekedésbeli elmaradás, rossz közérzet, pubertás késése.

1.1.2. Colitis ulcerosa

A fekélyes vastagbélgyulladás a vastagbél ismeretlen eredetű, krónikus, gyulladásos betegsége, mely kizárólag a vastagbélre lokalizálódik. A gyulladás a bélfal rétegei közül csak a nyálkahártyát érinti. A gyulladás a végbél felől indul, és fokozatosan terjed proximális irányba. A betegség korlátozódhat a végbélre (proctitis) vagy a teljes vastagbélre (pancolitis). A szigmabél és a végbél együttes érintettsége (proctosigmoiditis), illetve a leszálló vastagbél, a szigmabél és a végbél egyidejű gyulladása (bal oldali colitis) is jellemző. Tünetei: hasi fájdalom, görcsök, véres hasmenés, székrekedés, láz, víz- és sóvesztés, vérszegénység, fehérjehiány, vashiány.

1.1.3. A két betegség összehasonlítása

Lényeges különbség, hogy a betegség a tápcsatorna mely szakaszán jelentkezik. Colitis ulcerosában kizárólag a vastagbél érintett, míg a Crohn-betegség a vékonybélre és a vastagbéltre is kiterjedhet, gyakran érintett lehet a tápcsatorna felsőbb szakasza is, mint nyelőcső, gyomor. A colitis ulcerosa mivel csak a vastagbélben fordul elő, így ha szükségessé válik a vastagbél eltávolítása, végleges gyógyulás következik be. Ezzel szemben a Crohn betegség az emésztőrendszer egészét érintheti a szájtól a végbélig, ezért a gyulladt szakasz eltávolítása nem hoz gyógyulást, a betegség bárhol visszatérhet. A másik fontos különbség a bélfal érintettségén alapul. Colitis ulcerosában a gyulladásos jelenségek csak a bél nyálkahártyájára és a submucosára korlátozódnak, míg Crohn-betegség esetén a bélfal minden rétege érintett a mucosától a serosáig. Míg a colitis ulcerosa összefüggő gyulladást hoz létre, a Crohn betegség szegmentális, gyulladt és ép bélszakaszok váltakoznak egymással. Crohn-betegség esetén tehát a gyulladás mélyebb rétegekbe terjed, olyannyira, hogy elérve a bél külső felszínét összetapadhat a szomszédos vékony- vagy vastagbélszakaszokkal, hasi szervekkel (hólyag, méh, hüvely). Ilyenkor az összetapadt szervek között rendellenes járat, ún. belső sipoly alakul ki. A baktériumokat tartalmazó béltartalom a sipolyon átjuthat a steril szervekbe, vagy kikerülhet a szabad hasüregbe és további betegségeket okozhat (pl. tályog). Jellemző az ún. külső sipoly is, mely a végbél körüli bőrfelületen alakul ki. Colitis ulcerosában ezek a szövődmények nem fordulnak elő. Amikor a bél gyulladt, beteg, a bélfal nem képes megfelelően működni, felszívni a tápanyagokat. Ez az egyik oka, hogy a gyulladásos bélbetegek gyakran alultápláltak, étvágytalanok. A Crohn-betegség jellemző tünete a fogyás. Ha a betegség a vékonybelet érinti, felszívódási zavar, tápanyaghiány tünetei alakulhatnak ki. Ezzel ellentétben colitis ulcerosára, mivel a vastagbelet érinti sem fogyás, sem felszívódási zavar nem jellemző.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Genetikai variánsok keresése, melyek összefüggésbe hozhatók a gyulladásos bélbetegségekkel.

2.1. CARD15 gén R702W, G908R, 1007finsC

Elsőként azonosították CD génként, mely a monocytákban a murmaril-dipeptidet (MDP) és a bakteriális lipopoliszacharidokat érzékelő citoszolreceptorban lévő NOD2 fehérjét kódolja. A 16-os kromoszóma pericentromerikus régiójában helyezkedik el. Kaukázusi populációban elvégzett vizsgálatok kimutatták, hogy ennek a génnek 3 kódoló variánsa független rizikó faktort jelent CD kialakulására, ezek a 4-exonban elhelyezkedő Arg702Trp és a 8-as exonban található Gly908Arg misszensz mutációk, illetve a 11-es exonban lévő 1007finsC inszerció. Ázsiai populáción elvégzett egyes vizsgálatok viszont arra irányították a figyelmet, hogy ennek a három variánsnak a hordozása nem minden népcsoport esetén jelent kockázati tényezőt Crohn betegségre. A célunk az volt, hogy ezt az összefüggést megvizsgáljuk magyar felnőtt Crohnos betegmintáinkon a jobb karakterizálás érdekében. Vizsgálatokat végeztek amerikai, német, izraeli zsidó, és olasz gyerek Crohnos mintákon, az eredmények megerősítették a CARD15 gén 3 variánsának hajlamosító voltát Crohn betegségre.

Kíváncsiak voltunk, hogy magyar gyerek Crohnos populációban hajlamosító tényezőnek bizonyul-e e három variáns.

2.2. SLC22A4 gén C1672T, SLC22A5 gén G-207C

A karnitin és más organikus kationok kétirányú membrántranszportjáért felelős OCTN kation transzporter két variánsa, az SLC22A4 gén 9-es exonjában elhelyezkedő C1672T szubsztitúció és az SLC22A5 gén promóter régiójában található G-207C transzverzió együttesen hajlamosítanak Crohn betegség kialakulására, meghatározva az ún. TC haplotípust. Ezt Peltekova írta le, majd számos kutató megerősítette, különböző populációk vizsgálata esetén - német, görög, kanadai, olasz, skót, spanyol, svéd. Ez a haplotípus azonban nem jelent minden esetben szuszeptibilitási ágenst egyes népcsoportok esetén. Vermeire és munkatársai flamandokat vizsgálva azt tapasztalták, hogy az OCTN kation transzporter nem játszik szerepet a gyulladásoos bélbetegségek kialakításában. Kevés publikációban vizsgálták a TC haplotípus UC-re való hajlamosítottságát. Palmieri és munkatársai azt találták, hogy a haplotípus frekvencia emelkedett mind CD, mind UC esetén, és a TC haplotípus a gyulladásoos bélbetegségek számos klinikai tünetét befolyásolja. Waller és munkatársai szerint az OCTN variánsok mindkét betegséggel kapcsolatban vannak. Tosa és munkatársai japán Crohnos és colitis ulcerosás betegeket vizsgálva azt tapasztalták, hogy a TC haplotípus nem hajlamosít egyik betegség kialakulására sem. Számos cikket tanulmányozva elmondható, hogy különböző populációktól függ, hogy a TC haplotípus hajlamosító tényező-e az adott népcsoportokban előforduló gyulladásoos bélbetegségekre. Felmerül a kérdés, hogy magyar felnőtt IBD-s és gyerek Crohnos populációban hajlamosít-e e két eltérés a két betegség valamelyikére, vizsgálataink ennek kiderítésére irányultak.

2.3. CTLA4 gén A+49G

A T sejt receptorként funkcionáló CTLA4 gén 1-es exonjában lévő A+49G eltérés Thr Ala szubsztitúciót okoz a fehérjeszekvencia 17-es pozíciójában, melyet Nistico fedezett fel. Ez összefüggésbe hozható IBD-vel, celiaciával, I-es típusú diabétesszel, Graves-betegséggel, rheumatoid arthritisszel, sclerosis multiplexszel. Machida és mts. japán populációban hajlamosító tényezőként determinálták ezt a variánst CD-re és UC-re, ugyanakkor Xia és mts. nem találtak összefüggést IBD-vel. Vizsgálataink arra irányultak, hogy kiderítsük, magyar populációban hajlamosít-e ez az eltérés IBD-re.

2.4. IL23R gén rs10889677 C/A, rs2201841 T/C, rs1884444 G/T

Az érdeklődés középpontjába került Oppmann által felfedezett IL-23 citokin és annak receptora. Az IL-23 fontos szerepet játszik a veleszületett és T-sejt mediálta béllal kapcsolatos gyulladásoos folyamatokban. Duerr és mts. az IL23R-t mint IBD gént azonosították, 12 SNP-t vizsgálva a gén régiójában, melyek közül egyesek hajlamosítanak IBD-re (rs10889677, rs2201841, rs1004819, rs11209032, rs1495965), mások védenek ellene (rs11209026, rs10489629, rs11465804, rs7517847, rs1343151), míg egyesek közömbösnek bizonyultak (rs7530511, rs1884444). Mi 3 eltérést emeltünk ki, az egyik a gén 3'UTR régiójában elhelyezkedő rs10889677 C/A és az rs2201841 T/C, melyek hajlamosítanak a betegség kialakulására, a másik az

rs1884444 G/T, mely nem mutat összefüggést IBD-vel az általuk vizsgált zsidó és nem zsidó populációkban.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Vizsgált betegpopuláció

A minták gyűjtése 2003 óta zajlik az ország különböző területeiről (Békéscsaba, Budapest, Pécs, Szombathely, Zalaegerszeg). Biobankunk az országos biobank része (www.biobank.hu), mely részére eddig 201 felnőtt Crohnos, 241 felnőtt colitis ulcerosás, valamint 19 gyerek Crohnos beteg vérmintáját gyűjtöttük össze, ez a szám azóta is folyamatosan növekszik. Vizsgálatainkhoz 235 felnőtt kontroll és 49 gyerek kontroll személytől vettünk vért, ők korban, nemben különböző, klinikailag egészséges egyének.

3.2. Genotípus elemzés

A DNS-izolálást EDTA-val alvadásgátolt vérmintákból végeztük kisózásos módszerrel. A DNS-analízis kiindulópontja a polimeráz láncreakció (PCR) útján végzett amplifikáció, mely standard módon az adott szekvenciára specifikus, szintetikus oligonukleotid primerek, Taq polimeráz, dNTP, puffer és genomiális DNS-templát jelenlétében zajlott. A PCR termék analizálása gélelektroforézissel, etidium bromidos festéssel és UV-megvilágítással történt. A különböző génekben (CARD15, SLC22A4, SLC22A5, CTLA4, IL23R) lévő eltérések esetén a mutációk/polimorfizmusok meghatározására RFLP módszert vagy direkt szekvenálást alkalmaztunk. Az analízisekre etikai bizottsági engedély birtokában került sor. A vizsgálatok a Pécsi Orvostudományi és Egészségtudományi Központ Regionális Kutatásetikai Bizottsága 2000. július 10-én, 2003. február 4-én és az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományi és Kutatásetikai Bizottsága 2004. március 9-én kiadott engedélyei alapján történtek.

3.2.1. CARD15 gén R702W, G908R, 1007finsC

A PCR amplifikáció után szekvenálást alkalmaztunk a következő primerpárokkal: R702W esetén a forward primer: 5'-GAG CCG CAC AAC CTT CAG ATC-3', a reverse primer: 5'-ACT TGA GGT GCC CAA CAT TCA G-3'; G908R esetén a forward primer: 5'-GTT CAT GTC TAG AAC ACA TAT CAG G-3', a reverse primer: 5'-GTT CAA AGA CCT TCA GAA CTG G-3'; míg 1007finsC esetén a forward primer: 5'-CCT TGA AGC TCA CCA TTG TAT C-3', a reverse primer: 5'-GAT CCT CAA AAT TCT GCC ATT C-3'. A DNS szekvenálás kivitelezése ABI 3100 automata szekvenálóval történt.

3.2.2. SLC22A4 gén C1672T, SLC22A5 gén G-207C

Genotipizálásra PCR/RFLP módszert és direkt szekvenálást alkalmaztunk. Szekvenálás esetén a következő primereket terveztük: SLC22A4 C1672T esetén a forward primer 5'-AGA GAG TCC TCC TAT CTG ATT G-3', míg a reverse primer 5'-TCC TAG CTA TTC TTC CAT GC-3'; SLC22A5 G-207C esetén a forward primer 5'-AGT CCC GCT GCC TTC CTA AG-3', míg a reverse primer 5'-GTC ACC TCG TCG TAG TCC CG-3'. PCR/RFLP módszernél az amplifikálásra a következő primereket terveztük: SLC22A4 C1672T esetén a forward primer 5'-TGA CAG GAA

AGA ATG AAA AGC C-3', a reverse primer 5'-TTT CAC TTT CTG CAT CTG CTC T-3'. SLC22A5 G-207C esetén a forward primer 5'-GCC GCT CTG CCT GCC AGC-3', a reverse primer 5'-GGT CGC TAT CAG GAA CAC GGA GGA-3'. A felsokszorozott DNS szakaszok allélspecifikus restrikciós endonukleázzal lettek megemésztve, SLC22A4 C1672T *MnII*-gyel, SLC22A5 G-207C *HpaII*-vel. A restrikciós fragmenteket 3%-os agaróz gélen futtattuk és UV-val világítottuk.

3.2.3. CTLA4 gén A+49G

A CTLA4 A+49G eltérés detektálásához PCR/RFLP módszert alkalmaztunk. A PCR reakcióhoz a következő primereket használtuk: forward primer 5'-CTT GAG GTT GTC TTT TCG AG-3', reverse primer 5'-TAC TAA ATA CCT GGC GCT CT-3'. Az amplifikátum emésztése *BseXI* allélspecifikus restrikciós endonukleázzal történt.

3.2.4. IL23R gén rs10889677 C/A, rs2201841 T/C, rs1884444 G/T

A célszekvencia amplifikálására a következő primereket terveztük: rs10889677 SNP esetén 5'-ATC GTG AAT GAG GAG TTG CC-3' forward primer 5'-TGT GCC TGT ATG TGT GAC CA-3' reverse primer; rs2201841 variáns esetén 5'-GGC AAA AGG GAA TTG AGA GG-3' forward primer, 5'-GGC CTA TGA TTA TGC TTT TTC CTG-3', reverse primer; rs1884444 variáns esetén 5'-CAG TCT TTT CCT GCT TCC AGA CAT GAA TC-3' forward primer és 5'-AAT AAA ATC ATA CTC TTG CCA ATG GCC C-3' reverse primer. A PCR termékek emésztése allélspecifikus restrikciós endonukleázzal történt, *MnII* alkalmazása rs10889677 SNP-nél, *HpyF3I* rs2201841 variánsnál, *PscI* 1884444 eltérésnél. A restrikciós fargmenteket 2.5%-os agaróz gélen futtatuk és UV-transzilluminációval tettük láthatóvá.

3.3. Statisztikai analízis

SPSS 11.5 programcsalád segítségével, χ^2 -tesztet és regressziós analízist alkalmaztunk a betegség és a vizsgált genetikai variáns között fenálló összefüggés feltárására.

4. EREDMÉNYEK

4.1. CARD15 gén R702W, G908R, 1007finsC

Megvizsgáltunk 100 felnőtt Crohnos beteget (47 férfi, 53 nő, átlag életkor: 37.3 év) és 94 klinikailag egészséges kontrollt (47 férfi, 47 nő, átlag életkor: 45.6 év). CARD15 gén 1007finsC esetén a mutáns allélfrekvencia szignifikánsan emelkedett volt összehasonlítva a felnőtt Crohnos betegpopulációt a felnőtt kontrollokkal, mely megmutatkozik a heterozigóták és homozigóták szintjén is, a felnőtt Crohnos betegpopuláció 17%-a hordozza mindkettő vagy egyik mutáns allélt, szemben a kontrollokkal 4.3% (1. táblázat). CARD15 gén R702W és G908R mutációit vizsgálva felnőtt Crohnos populációban nem tapasztaltunk eltérést a felnőtt kontrollokhöz képest sem a homozigóták szintjén, sem az allélfrekvenciát tekintve (1. táblázat).

Megvizsgáltunk 19 gyerek Crohnos beteget (14 fiú, 5 lány, átlag életkor: 13.4 év), és 49 gyerek kontroll mintát (28 fiú, 21 lány, átlag életkor: 14.4 év). G908R variáns során a CC homozigóta és C allél frekvencia szignifikánsan emelkedett volt a gyerek Crohnos populációban a gyerek kontrollokhöz képest (2. táblázat). Ugyanez

mondható el az 1007finsC variáns esetén is, ahol szintén szignifikánsan emelkedett insCinsC homozigóta és Cins allél frekvenciát találtunk a gyerek Crohnos mintákat tekintve (2. táblázat). Az allélfrekvenciákat összehasonlítva elmondható, hogy az R702W mutáció esetén nem volt szignifikáns különbség a T allél frekvenciáját tekintve a gyerek Crohnos minták és a gyerek kontrollok között (2. táblázat).

4.2. SLC22A4 gén C1672T, SLC22A5 gén G-207C

Vizsgálatunk tárgya 100 felnőtt Crohnos beteg (47 férfi, 53 nő, átlag életkor: 37.3 év) és 94 klinikailag egészséges kontroll (47 férfi, 47 nő, átlag életkor: 45.6 év) volt. SLC22A4 C1672T nem mutatott szignifikáns eltérést TT homozigóták és T allél frekvencia szinten, összehasonlítva a felnőtt Crohnos betegcsoportot a felnőtt kontrollal (3. táblázat). SLC22A5 G-207C esetén sem a CC homozigóták, sem a C allél frekvencia nem különbözött szignifikánsan a két csoport között (3. táblázat). A TC haplotípus gyakorisága sem mutatott összefüggést a felnőtt Crohnos betegcsoport és a felnőtt kontrollok között (3. táblázat).

E két eltérést megvizsgáltuk 121 colitis ulcerosás betegben (47 férfi, 74 nő, átlag életkor: 47.8 év) és 110 kontrollban (59 férfi, 51 nő, átlag életkor: 46.7 év). SLC22A4 C1672T esetén a T allél frekvencia és az SLC22A5 G-207C esetén a C allél frekvencia nem különbözött szignifikánsan a kontrolloktól (4. táblázat). A TC haplotípus frekvenciában sem találtunk szignifikáns különbséget összehasonlítva a két csoportot (4. táblázat).

Megvizsgáltunk 19 gyerek Crohnos beteget (14 fiú, 5 lány, átlag életkor: 13.4 év), és 49 kontroll gyerek mintát (28 fiú, 21 lány, átlag életkor: 14.4 év). Nem tudtunk kimutatni különbséget sem C1672T, sem G-207C variáns allélfrekvenciáit, sem a haplotípust tekintve a gyerek Crohnos betegpopuláció és a gyerek kontrollok között (5. táblázat).

4.3. CTLA4 gén A+49G

Az allélfrekvenciák Hardy-Weinberg szabály szerint alakultak mind a betegpopulációban, mind a kontrollokban. 130 Crohnos (55 férfi, 75 nő, átlag életkor: 43.0 év) és 150 colitis ulcerosás beteget (63 férfi, 87 nő, átlag életkor: 46.1 év) vizsgáltunk. A vizsgálatához 170 kontroll mintát gyűjtöttünk (49 férfi, 121 nő, átlag életkor: 57.7 év). A G allél jelenléte önmagában nem jelent rizikótényezőt Crohn betegségre és colitis ulcerosára, sem GG homozigóta, sem AG heterozigóta genotípus esetén, sem a G allél frekvencia szintjén a kontrollokhoz viszonyítva (6. táblázat).

4.4. IL23R gén rs10889677 C/A, rs2201841 T/C, rs1884444 G/T

Az IL23 gén vizsgálatát végeztük 190 Crohnos betegben (88 férfi, 102 nő, átlag életkor: 39.6 év) és 220 kontrollban (115 férfi, 105 nő, átlag életkor: 41.7 év). Rs10889677 AA genotípus szignifikánsan emelkedett volt Crohn betegekben összehasonlítva az egészséges kontrollokkal (7. táblázat). Logisztikus regressziós analízis kimutatta, hogy ennek a genotípusnak a hordozása 2.19-szer hajlamosít jobban Crohn betegség kialakulására. A másik hajlamosító variáns (rs2201840) esetén is szignifikánsan emelkedett CC homozigóta, illetve C allél frekvenciát találtunk (7. táblázat). Logisztikus regressziós analízis kimutatta, hogy aki hordozza a CC genotípust, annak 2.41-szer nagyobb a rizikófaktora Crohn betegség kialakulására. Ugyanakkor a közömbös variáns (rs1884444) nálunk is annak bizonyult (7. táblázat).

1. táblázat: CARD15 gén variánsainak allélfrekvencia eloszlása felnőtt Crohn betegekben és felnőtt kontrollokban.

		Felnőtt Crohn betegek n=100	Felnőtt kontrollok n=94
CARD15 genotípus			
R702W	CC	87 (87.0%)	87 (92.6%)
	CT	12 (12.0%)	5 (5.3%)
	TT	1 (1.0%)	2 (2.1%)
	T allél frekvencia	7.00%	4.79%
G908R	GG	94 (94.0%)	93 (98.9%)
	GC	6 (6.0%)	1 (1.16%)
	CC	-	-
	C allél frekvencia	3.00%	0.53%
1007finsC	--	83 (83.0%)	90 (95.7%)
	- insC	15 (15.0%)	4 (4.3%)
	insC insC	2 (2.0%)	-
	Cins allél frekvencia	9.50%*	2.13%

*P<0.05

2. táblázat: CARD15 gén variánsainak allélfrekvencia eloszlása gyerek Crohn betegekben és gyerek kontrollokban.

		Gyerek Crohn betegek n=19	Gyerek kontrollok n=49
CARD15 genotípus			
R702W	CC	18 (94.7 %)	46 (93.9 %)
	CT	1 (5.3 %)	2 (4.1 %)
	TT	-	1 (2.0 %)
	T allél frekvencia	2.63 %	4.08 %
G908R	GG	14 (73.7 %)	48 (98.0 %)
	GC	3 (15.8 %)	1 (2.0 %)
	CC	2 (10.5 %)*	-
	C allél frekvencia	18.4 %*	1.02 %
1007finsC	--	13 (68.5 %)	46 (93.9 %)
	- insC	4 (21.0 %)	3 (6.1 %)
	insC insC	2 (10.5 %)*	-
	Cins allél frekvencia	21.1 %*	3.06 %

*P<0.05

3. táblázat: SLC22A4 és SLC22A5 gének eltérései által meghatározott TC haplotípus és az allélok megoszlási gyakorisága felnőtt Crohnos betegcsoport és felnőtt kontroll populáció esetén.

		Felnőtt Crohn betegek n=100	Felnőtt kontrollok n=94
SLC22A4 genotípus			
C1672T	CC	37 (37.0%)	28 (29.8%)
	CT	54 (54.0%)	45 (47.9%)
	TT	9 (9.0%)	21 (22.3%)
T allél frekvencia		36.0%	46.3%
SLC22A5 genotípus			
G-207C	GG	31 (31.0%)	19 (20.2%)
	GC	54 (54.0%)	51 (54.3%)
	CC	15 (15.0%)	24 (25.5%)
C allél frekvencia		42.0%	52.7%
TC haplotípus		9 (9.0%)	19 (20.2%)

*P<0.05

4. táblázat: SLC22A4 és SLC22A5 gének eltérései által meghatározott TC haplotípus és az allélok megoszlási gyakorisága felnőtt colitis ulcerosás betegcsoport és felnőtt kontroll populáció esetén.

		Felnőtt colitis ulcerosás betegek n=121	Felnőtt kontrollok n=110
SLC22A4 genotípus			
C1672T	CC	38 (31.4%)	35 (31.8%)
	CT	53 (43.8%)	48 (43.6%)
	TT	30 (24.8%)	27 (24.5%)
	T allél frekvencia	46.7%	46.4%
SLC22A5 genotípus			
G-207C	GG	33 (27.3%)	25 (22.7%)
	GC	58 (47.9%)	57 (51.8%)
	CC	30 (24.8%)	28 (25.5%)
	C allél frekvencia	48.8%	51.4%
	TC haplotípus	23 (19.0%)	25 (22.7%)

*P<0.05

5. táblázat: SLC22A4 és SLC22A5 gén variánsainak allélfrekvencia gyakorisága gyerek Crohnos betegcsoport és gyerek kontroll populáció esetén.

		Gyerek Crohn betegek n=19	Gyerek kontrollok n=49
SLC22A4 genotípus			
C1672T	CC	4 (21.0 %)	12 (24.5 %)
	CT	11 (58.0 %)	25 (51.0 %)
	TT	4 (21.0 %)	12 (24.5 %)
T allél frekvencia		50.0 %	50.0 %
SLC22A5 genotípus			
G-207C	GG	3 (15.8 %)	10 (20.4 %)
	GC	7 (36.8 %)	26 (53.1 %)
	CC	9 (47.4%)	13 (26.5 %)
C allél frekvencia		65.8 %	53.1 %

*P<0.05

6. táblázat: CTLA4 A+49G allélfrekvencia eloszlása Crohn betegekben és kontrollokban.

		Crohn betegek n=130	Colitis ulcerosás betegek n=150	Kontrollok n=170
CTLA4 genotípus				
+49A/G	AA	47 (36.2 %)	56 (37.3 %)	70 (41.2 %)
	AG	67 (51.5 %)	66 (44.0 %)	73 (42.9 %)
	GG	16 (12.3 %)	28 (18.6 %)	27 (15.9 %)
G allél frekvencia		38.1 %	40.6 %	37.4 %

*P<0.05

7. táblázat: Az IL23R gén eltérései és azok által meghatározott allélfrekvenciák Crohn betegekben és kontrollokban.

		Crohn betegek n=190	Kontrollok n=220
IL23R genotípus			
rs10889677	CC	75 (39.5%)	96 (43.6%)
	CA	92 (48.4%)	111 (50.5%)
	AA	23 (12.1%)*	13 (5.91%)
	A allél frekvencia	36.3%	31.1%
rs2201841	TT	75 (39.5%)	101 (45.9%)
	CT	90 (47.4%)	106 (48.2%)
	CC	25 (13.2%)*	13 (5.91%)
	C allél frekvencia	36.8%*	30.0%
rs1884444	GG	57 (30.0%)	55 (25.0%)
	GT	132 (69.5%)	162 (73.6%)
	TT	1 (0.53%)	3 (1.36%)
	T allél frekvencia	35.3%	38.2%

*P<0.05

5. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A gyulladássos bélbetegségek ismeretlen eredetű, visszatérő, sajátos krónikus lefolyást mutató, változatos intesztinális és extraintesztinális tünetekkel járó kórképek, melyek az emésztőrendszer nem-specifikus gyulladásához vezetnek, genetikai, környezeti és immunológiai tényezők komplex együtthatása eredményeként alakulnak ki. A kutatómunka célja annak megállapítása volt, hogy magyarországi felnőtt- és gyermek populációkban az 5 gen 9 locusának eltérései hajlamosítanak-e IBD kialakulására magyar populációban. A genetikai eredmények meghatározására PCR-t, majd ezt követően RFLP-t vagy direkt szekvenálást alkalmaztunk.

Ismert CARD15 mutációkat vizsgáltunk magyar felnőtt és elsőként magyar gyerek Crohnos populációban. A CARD15 gén mutációi közül az 1007finsC emelkedett mutáns allélfrekvenciát mutatott a felnőtt Crohnos betegcsoportban a felnőtt kontrollokhoz képest, mely megmutatkozott az egy vagy két mutáns allélt hordozó heterozigóták, illetve homozigóták esetén is, míg az R702W és a G908R nem mutatott szignifikáns eltérést a felnőtt Crohnos és a felnőtt kontroll csoport összehasonlítása során. Megerősítettük, hogy magyar felnőtt Crohnos populációban az 1007finsC kockázati tényezőt jelent Crohn betegség kialakulására. Gyerek Crohnos mintákat vizsgálva a G908R és az 1007finsC esetén szignifikáns mutáns homozigóta és mutáns allélfrekvencia szintet kaptunk a gyerek kontrollokkal való összevetés során, ezen variánsok hajlamosítanak a betegségre, míg az R702W esetén nem találtunk összefüggést összehasonlítva a két csoportot. Megállapíthatjuk, hogy magyaroknál a gyerek Crohnos profil különbözik a felnőtt Crohnos profiltól. Különböző populációktól függ, hogy a három variáns közül mindhárom, vagy csak egyesek, vagy egyik sem jelent rizikótényezőt a betegség kialakulása szempontjából.

Az SLC22A4 gén C1672T és az SLC22A5 gén G-207C eltérései által meghatározott TC haplotípus vizsgálatát végeztük először magyar felnőtt Crohn, colitis ulcerosás és az irodalomban először gyerek Crohn mintákon. Azt tapasztaltuk, hogy ez a haplotípus nem jelent rizikótényezőt gyulladássos bélbetegségre sem felnőtt IBD-s, sem gyerek Crohnos betegpopulációban. Bizonyos populációk esetén a TC haplotípus hajlamosít gyulladássos bélbetegség kialakulására, míg más populációkban nem. A mi eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a magyarok a flamand és japán populációkhoz állnak közel.

Megvizsgáltuk a CTLA4 A+49G eltérést magyar IBD populációban, és azt tapasztaltuk, hogy ez a variáns nem hajlamosít erre a betegségre magyaroknál. Az eredmények azt mutatják, hogy a CTLA4 A+49G SNP heterozigóta vagy homozigóta formája nem jelent kockázati tényezőt magyar IBD populációban. Itt is elmondható, hogy különböző populációk esetén rizikótényező ez a variáns gyulladássos bélbetegségre, például japán populációban hajlamosít, míg kínai és holland populációkban nincs összefüggés ezen variáns és a kialakult betegség között. A magyar populációban az általunk kapott eredmények a negatív hatást támasztják alá.

Elsőként vizsgáltuk magyar populációban az IL23R eltéréseit, melyet Duerr és mts. írtak le 2006-ban. Az IL23R esetén a legszembetűnőbb a rizikótényező rs10889677 és rs2201841 esetén, ugyanis ott mind a homozigóták, mind az allélfrekvencia szintjén szignifikáns eltérést találtunk, így magyar populáció esetén ezeknek a variánsoknak a hordozása jelentős kockázatot jelent Crohn betegség

kialakulására, míg az rs1884444 variáns közömbösnek bizonyult. Az IL23R 2 hajlamosító variánsa (rs10889677 és rs2201841) magyar populációban hajlamosítónak bizonyult a zsidó és nem zsidó populációkhoz hasonlóan.

Az értekezésben bemutatott eredményeknek elsősorban a gyulladáshoz vezető bélbetegségek genetikai hátterének megismerésében és megértésében van jelentősége. Az újabb genetikai variánsok felderítése, genotípus-fenotípus összefüggések megállapítása elősegítheti a kockázati tényezők pontosabb megismerését, a korai diagnózist, a hatékonyabb megelőzést és kezelést.

6. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

I. Megállapíthatjuk, hogy az általunk vizsgált magyar felnőtt Crohnos populációban a CARD15 gén mutációi közül az 1007finsC hajlamosítónak bizonyult.

II. Gyerek Crohn betegeket vizsgálva kijelenthetjük, hogy magyar populációban a CARD15 gén eltérései közül a G908R és az 1007finsC is szuszceptibilitási ágenst jelentenek.

III. SLC22A4 gén C1672T és az SLC22A5 gén G-207C által meghatározott TC haplotípus nem mutat összefüggést magyar felnőtt populációban kialakult IBD-vel.

IV. Ugyanezt megvizsgálva gyerekekben felismertük, hogy a TC haplotípus szintén nem jelent hajlamosító tényezőt magyar gyermek Crohnos populációban.

V. CTLA4 A+49G eltérését analizálva magyar felnőtt Crohn és colitis ulcerosás betegpopulációban, megállapíthatjuk, hogy nincs konkrét összefüggés a vizsgált genetikai eltérés és az IBD között.

VI. IL23R gén variánsai tekintve az rs10889677 és az rs2201841 hajlamosítónak bizonyult magyar felnőtt Crohnos betegpopulációban.

7. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

7.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Magyari L**, Bene J, Komlosi K, Talian G, Farago B, Csongei V, Jaromi L, Safrany E, Sipeky C, Lakner L, Varga M, Gasztonyi B, Melegh B. Prevalence of SLC22A4 1672T and SLC22A5 -207C Combination Defined TC Haplotype in Hungarian Ulcerative Colitis Patients. *Pathol Oncol Res.* 2007;13(1):53-6. IF:1.241

2. **Magyari 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.

3. Bene J, **Magyari L**, Talian G, Komlosi K, Gasztonyi B, Tari B, Varkonyi A, Mozsik G, Melegh B. Prevalence of SLC22A4, SLC22A5 and CARD15 gene

mutations in Hungarian pediatric patients with Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* 2006;12(34):5550-3.

4. Bene J, Komlosi K, **Magyari L**, Talian G, Horvath K, Gasztonyi B, Miheller P, Figler M, Mozsik G, Tulassay Z, Melegh B. Plasma carnitine ester profiles in Crohn's disease patients characterized for SLC22A4 C1672T and SLC22A5 G-207C genotypes. *Br J Nutr.* 2007;98(2):345-50. IF:2.708

5. Farago B, **Magyari L**, Safrany E, Csongei V, Jaromi L, Horvatovich K, Sipeky C, Maasz A, Radics J, Gyetvai A, Szekanecz Z, Czirjak L, Melegh B. Functional variants of interleukin-23 receptor gene confer risk for rheumatoid arthritis but not for systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2008 Feb;67(2):248-50. Epub 2007 Jul 2. IF:5.767

7.2. Csatlakozó közlemények

1. Illes Z, Safrany E, Peterfalvi A, **Magyari L**, Farago B, Pozsonyi E, Rozsa C, Komoly S, Melegh B. 3'UTR C2370A allele of the IL-23 receptor gene is associated with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurosci Lett.* 2007 Nov 17; (Epub ahead of print) IF:2.092

2. Maasz A, Kisfali P, Horvatovich K, Mohas M, Marko L, Csongei V, Farago B, Jaromi L, **Magyari L**, Safrany E, Sipeky C, Wittmann I, Melegh B. Apolipoprotein A5 T-1131C variant confers risk for metabolic syndrome. *Pathol Oncol Res.* IF:1.241

3. Farago B, Talian G, Maasz A, **Magyari 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

4. Szolnoki Z, Maasz A, **Magyari 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:2.965

5. Safrany E, Csongei V, Jaromi L, Maasz A, **Magyari L**, Sipeky C, Melegh B. Mitochondrial DNA and its mutations: novel fields in a new era. *Orv Hetil.* 2007;27;148(21):971-8. Hungarian.

6. Banyai K, Jiang B, Bogdan A, Horvath B, Jakab F, Meleg E, Martella V, **Magyari L**, Melegh B, Szucs G. Prevalence and molecular characterization of human group C rotaviruses in Hungary. *J Clin Virol.* 2006 Dec;37(4):317-22. Epub 2006 Sep 25. IF:2.630

7. Szolnoki Z, Maasz A, **Magyari 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:3.396

8. Maasz A, Horvatovich K, **Magyari L**, Talian Csaba G, Bokor S, Laczy B, Tamasko M, Molnar D, Wittmann I, Melegh B. Search for mitochondrial DNA T4291C mutation in Hungarian patients with metabolic syndrome. *Orv Hetil.* 2006;16;147(15):693-6. Hungarian.

9. Komlosi K, Talian C G, Farago B, **Magyari L**, Cserep V, Kovacs B, Bene J, Havasi V, Kiss G C, Czirjak L, Melegh B. No influence of SLC22A4 C6607T and RUNX1 G24658C genotypic variants on the circulating carnitine ester profile in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2008;26; (elfogadva, közlés alatt) IF:2.189

7.3. Idézhető absztraktok

1. Horvatovich K, **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 variant 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 B. 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 in the filaminB gene: novel candidates for causing disease? *Eur J Hum Genet.* 2006;14 Suppl. 1, 250.

6. **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.

7. Farago B, **Magyari L**, Csongei V, Jaromi L, Safrany E, Horvatovich K, Sipeky C, Maasz A, Radics 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.

8. Horvatovich K, **Magyari L**, Maasz A, Kisfali P, Farago B, Bokor S, Mohas M, Molnar D, Melegh B. Apolipoprotein A5 T-1131C alleles in pediatric patients with obesity and metabolic syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2007;15 Suppl. 1, 178.
9. Talian C G, Komlosi K, **Magyari L**, Nemes E, Kaposzta R, Mogyorosy G, Mehes K, Melegh B. Investigation of plasma carnitine ester profiles in a family with homozygous and heterozygous OCTN2 deficiency. *Eur J Hum Genet.* 2007;15 Suppl. 1, 216.
10. Safrany E, Farago B, Csongei V, **Magyari L**, Maasz A, Sipeky C, Jaromi L, Horvatovich K, Czirjak L, Radics J, Melegh B. Interleukin-23 receptor (IL23R) gene C2370A polymorphism in scleroderma patients. *Eur J Hum Genet.* 2007;15 Suppl. 1, 256.
11. Maasz A, Horvatovich K, Kisfali P, Mohas M, Marko L, Csongei V, Farago B, Jaromi L, **Magyari L**, Safrany E, Sipeky C, Wittman I, Melegh B. Apolipoprotein A5 T-1131C variant confers risk for metabolic syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2007;15 Suppl. 1, 178.
12. Csongei V, Jaromi L, Safrany E, Sipeky C, Maasz A, **Magyari L**, Horvatovich K, Farago B, Takacs I, Melegh B. Polymorphisms of the MDR1 gene in Hungarian Roma population samples. *Eur J Hum Genet.* 2007;15 Suppl. 1, 260.
13. Kisfali P, Mohas M, Horvatovich K, Maasz A, Marko L, Csongei V, Farago B, Jaromi L, **Magyari L**, Safrany E, Sipeky C, Wittman I, Melegh B. Common allelic variants of APOA5 gene in the metabolic syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2007;15 Suppl. 1, 210.
14. Sipeky C, Csongei V, Farago B, Horvatovich K, Jaromi L, **Magyari L**, Safrany E, Takacs I, Melegh B. Polymorphisms of CYP2C9 and VKORC1 genes associated with the warfarin metabolism in Hungarian Roma population. *Eur J Hum Genet.* 2007;15 Suppl. 1, 282.
15. Jaromi L, Maasz A, Szolnoki Z, Kisfali P, Horvatovich K, Csongei V, **Magyari L**, Safrany E, Sipeky C, Melegh B. Apolipoprotein A5 gene T1259C polymorphism associated with elevated circulating triglyceride levels but does not confer susceptibility for ischaemic stroke. *Eur J Hum Genet.* 2007;15 Suppl. 1, 235.
16. Illes Z, Farago B, Peterfalvi A, **Magyari L**, Pozsonyi E, Rozsa C, Komoly S, Melegh B. 3'UTR C2370A allele of the IL-23 receptor gene is associated with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2007;13 Suppl. 2, S202.

Összesített impakt faktor (cítálható absztraktok nélkül): 26.418

Susceptibility genetic variants in Hungarian morbus Crohn and ulcerative colitis patients

PhD thesis

Lili Magyar

Department of Medical Genetics and Child Development, Faculty of Medicine,
University of Pécs

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

2007

1. INTRODUCTION

1.1. Description of inflammatory bowel disease

There are two main types of inflammatory bowel disease (IBD), Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). 20-25.000 people in Hungary have IBD. The disease may occur in persons adults between ages 20 and 40 in both sex, although women are more frequently affected. The pathogenesis of IBD is very complex and both environmental and genetic factors contribute to its etiology. Environmental factors may be infectious agents, drugs, poisons, smoking, alcohol, and bowel bacteria as well. The genetic background has a particular importance, people may have genetic susceptibility and show reduced resistance of the mucosa or abnormal activation of the immune system in the intestines. These together with environmental factors cause inflammation. IBD may develop in a susceptible individual when the normal host-microbial interactions are dysregulated. The normal host-microbial flora consists of 300-400 different strains of bacteria. This balance can overturn, when people have chronic inflammatory bowel disease. This time the concentration of certain bacteria, such as *Bacteroides* increases causing inflammation. External bacteria can be also responsible for IBD (*Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Yersinia enterocolitica*, *cytomegalovirus*, *rotavirus*). There are many extraintestinal manifestations associated with inflammatory bowel disease, for instance eye and mouth inflammation, skin rash, gallstones, kidney stones, pancreatitis and joint pain.

1.1.1. Crohn's disease

The disease is named after Burrill Crohn. CD is a chronic inflammation of uncertain etiology that can affect any portion of the digestive tract from mouth to anus. Inflammation occurs primarily in the ileum and colon, although any portion of the intestinal tract can be affected (oesophagus, gaster). Ileocolitis is the most common form affecting the ileum and the colon. Ileitis only affects the ileum, while granulomatous colitis only affects the colon. The intestinal inflammation can appear in the terminal ileum (terminal ileitis) or might occur in some parts of the ileum (regional enteritis) or the colon (Crohn-colitis). Symptoms include abdominal pain, diarrhea, bloody stools, fistulas, fever, loss of appetite, vomiting, weight loss, growth retardation, indisposition and late of puberty.

1.1.2. Ulcerative colitis

Ulcerative colitis is a disease that causes inflammation and ulcers in the lining of the rectum and colon. When the inflammation occurs in the rectum it is called proctitis. If the entire colon is affected it is called pancolitis. Proctosigmoiditis involves inflammation of the rectum and the sigmoid colon, while left-sided colitis involves inflammation that starts at the rectum and extends up the left colon (sigmoid colon and the descending colon). Symptoms range from abdominal pain, cramps, bloody diarrhea, tenesmus, fever, anemia, loss of body fluids and nutrients, to decreased level of protein and iron.

1.1.3. Comparison of the two diseases

The main difference between CD and UC is the area of the digestive tract they affect. CD can occur along the entire digestive tract and spread deep into the bowel wall (mucosa, submucosa, serosa). In contrast, UC usually only affects the top layer of the colon and rectum (mucosa, submucosa). Crohn's disease is often segmental and the rectum is frequently spared, while ulcerative colitis results in connected inflammation. In Crohn's disease the inflammation penetrates into deeper layers to such an extent that it can reach the external layer of the intestines and might stick to another part of the ileum and the colon or other organs. Fistulas are common in Crohn's disease and either occur in the perianal region or are internal forming between the intestinal structures or between the intestine and other organs. In rare instances the intestinal wall may rupture, allowing bacteria from the intestine to infect other organs causing illness. When the intestine has inflammation, the system can not function normally, this ultimately leads to loss of appetite and weight loss. It is characteristic of Crohn's disease, as the inflammation spreads to the ileum that has an important role in absorbing the nutrients.

2. AIMS

Searching for genetic variants that have an association to IBD.

2.1. CARD15 R702W, G908R, 1007finsC

The first identified susceptibility gene for CD was the CARD15 (NOD2) gene on chromosome 16. Studies conducted on Caucasian populations showed that three independent mutations were associated with CD within the NOD2/CARD15 gene: two missense mutations, the Arg702Trp in exon 4 and the Gly908Arg in exon 8; and one insertion, 1007finsC in exon 11. Interestingly, these mutations have not been found at all in Asian patients. Our aim was to analyse the possible connection between these three variants of the CARD15 gene and Crohn's disease to characterize our Hungarian adult samples. Several studies on pediatric CD population have reported an association between CARD15 mutations and CD in North America, in Germany, in Israeli Jewish patients and in an Italian cohort. Our objective was to investigate the prevalence of the three CARD15 mutations in Hungarian pediatric population with CD.

2.2. SLC22A4 C1672T, SLC22A5 G-207C

Peltekova reported on two novel functional Crohn's disease (CD) associated single nucleotide polymorphisms: the C1672T substitution in exon 9 in the SLC22A4 gene and the G-207C transversion in the promoter region in the SLC22A5 gene, these two SNPs together define the so called TC haplotype. Several studies on different populations such as German, Greek, Canadian, Italian, Scottish, Spanish, Swedish and other Caucasians showed that this haplotype is associated with Crohn's disease. Vermeire et al. examined Flemish population and found that OCTN does not play a role in the susceptibility to IBD. In the limited number of publications on UC, Palmieri et al. found that the TC haplotype frequency was increased in both CD and UC and the TC haplotype may influence some clinical features of IBD. Waller et al. reported that the OCTN variants were as strongly associated with UC as they were with CD. Tosa et al. examined patients with UC and CD in a Japanese population, and they found that the TC haplotype is not associated with IBD. Our aim was to examine the association

between these two functional variants of the OCTN cation transporter genes and IBD in adult and pediatric patients.

2.3. CTLA4 A+49G

The cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene is a T cell receptor. Nistico identified a novel polymorphism +49A/G in exon 1, which associates with a Thr to Ala substitution at position 17 of the amino acid sequence. Several studies have reported controversial results on the association of the +49A/G SNP in the CTLA4 gene with type I diabetes, Grave's disease, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and celiac disease. CTLA4 is also a susceptibility gene for two main types of inflammatory bowel disease: Crohn's disease and ulcerative colitis as well. Machida and colleagues found that in Japanese population CTLA4 is one of the determinants of UC, and confers risk for the development of CD associated with fistula formation. Xia and colleagues found no association of the CTLA4 +49G SNP either with IBD in Dutch Caucasian patients or with UC in Chinese patients.

2.4. IL23R rs10889677 C/A, rs2201841 T/C, rs1884444 G/T

Oppmann discovered the IL-23 molecule in 2000 as a novel member of the IL-12 heterodimeric cytokine family. IL-23 plays a key role in the innate and T cell-mediated intestinal inflammation. Genetic studies in humans and mice uncovered a strong association of signaling pathways of IL-23 with IBD and other autoimmune and chronic inflammatory diseases. As an extension, Duerr and colleagues very recently have identified IL23 receptor gene as an inflammatory bowel disease-associated gene in a genome-wide association study. They examined series of SNPs in this gene region and found sets of variants (rs1004819, rs7517847, rs10489629, rs2201841, rs11465804, rs11209026, rs1343151, rs10889677, rs11209032, rs1495965, rs7530511, rs 1884444) that had association with the development of the disease in Jewish and non-Jewish populations. Our aim was to investigate the distribution of the IL23R gene rs10889677 C/A, rs2201841 T/C, and rs1884444 G/T in Hungarian IBD population.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. Patients

We have collected 442 adult IBD blood samples (201 CD, 241 UC) and 19 pediatric CD blood samples for our biobank (www.biobank.hu) from several regions of the country (Békéscsaba, Budapest, Pécs, Szombathely, Zalaegerszeg) since 2003. As controls 235 adult and 49 pediatric blood samples were collected. All control subjects were age- and sex-matched clinically healthy subjects.

3.2. Genetic analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes with a routine salting out method. We used polymerase chain reaction (PCR) with primers, Taq polimerase, dNTP, buffer and DNA to be amplified. We analysed the PCR product by electrophoresis visualized by UV transillumination. To identify the different genetic variants (CARD15, SLC22A4, SLC22A5, CTLA4, IL23R) we used RFLP method or direct sequencing. During the entire study period the guidelines and regulations

approved by the local Research-Ethical Committee of the Medical and Healthscience College of Pecs in 10.07.2000., 04.02.2003., and 09.03.2004. were followed.

3.2.1. CARD15 R702W, G908R, 1007finsC

For the PCR amplification as well as for the sequencing the following primers were used: for R702W the forward primer was: 5'-GAG CCG CAC AAC CTT CAG ATC-3', and the reverse primer was: 5'-ACT TGA GGT GCC CAA CAT TCA G-3'; for G908R the forward primer was: 5'-GTT CAT GTC TAG AAC ACA TAT CAG G-3', and the reverse primer was: 5'-GTT CAA AGA CCT TCA GAA CTG G-3'; for 1007finsC the forward primer was: 5'-CCT TGA AGC TCA CCA TTG TAT C-3', the reverse primer was: 5'-GAT CCT CAA AAT TCT GCC ATT C-3'. Sequencing was performed in an ABI 3100 automatic sequencer.

3.2.2. SLC22A4 C1672T, SLC22A5 G-207C

For genotyping we used a simple PCR/RFLP assay and direct sequencing. For the PCR amplification as well as for the sequencing the following primers were used: for SLC22A4 C1672T the forward primer was: 5'-AGA GAG TCC TCC TAT CTG ATT G-3', and the reverse primer was: 5'-TCC TAG CTA TTC TTC CAT GC-3'; for SLC22A5 G-207C the forward primer was: 5'-AGT CCC GCT GCC TTC CTA AG-3', and the reverse primer was: 5'-GTC ACC TCG TCG TAG TCC CG-3'. For PCR/RFLP methods the following primers were designed and used: for SLC22A4 C1672T the forward primer was: 5'-TGA CAG GAA AGA ATG AAA AGC C-3', and the reverse primer was: 5'-TTT CAC TTT CTG CAT CTG CTC T-3'. For SLC22A5 G-207C the forward primer was: 5'-GCC GCT CTG CCT GCC AGC-3', and the reverse primer was: 5'-GGT CGC TAT CAG GAA CAC GGA GGA-3'. The amplicons were digested by allele-specific restriction endonucleases, *MnlI* for SLC22A4 C1672T and *HpaII* for SLC22A5 G-207C. The restriction fragments were separated by electrophoresis on 3% agarose gels containing ethidium bromide and visualized by UV transillumination.

3.2.3. CTLA4 A+49G

For genotyping we used PCR/RFLP methods. For the amplification of the target sequence the following primers were designed and used: 5'-CTT GAG GTT GTC TTT TCG AG-3' as the sense and 5'-TAC TAA ATA CCT GGC GCT CT-3' as the antisense primer. The amplicons were digested by allele-specific restriction endonuclease, *Bse XI*.

3.2.4. IL23R rs10889677 C/A, rs2201841 T/C, rs1884444 G/T

PCR-RFLP methods were applied to test the alleles of the IL-23 receptor gene using the following primers: for rs10889677 the forward was 5'-ATC GTG AAT GAG GAG TTG CC-3' and the reverse primer was 5'-TGT GCC TGT ATG TGT GAC CA-3', for rs2201841 the forward primer was 5'-GGC AAA AGG GAA TTG AGA GG-3' and the reverse primer was 5'-GGC CTA TGA TTA TGC TTT TTC CTG-3', for rs1884444 the forward primer was 5'-CAG TCT TTT CCT GCT TCC AGA CAT GAA TC-3' and the reverse primer was 5'-AAT AAA ATC ATA CTC TTG CCA ATG GCC C-3'. The amplicons were digested by allele-specific restriction endonucleases, *MnlI* for rs10889677, *HpyF3I* for rs2201841 and *PscI* for rs1884444.

3.3. Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using SPSS 11.5. for Windows. For statistics the χ^2 method (cross-table analyses) and regression analysis were used to investigate the possible associations between the diseases and the polymorphisms studied.

4. RESULTS

4.1. CARD15 R702W, G908R, 1007finsC

We examined 100 patients with CD (47 males, 53 females, mean age: 37.3 years), and 94 clinically healthy control subjects (47 males, 47 females, mean age: 45.6 years). For 1007finsC we found significantly increased mutant allele frequency in the adult Crohn group compared to the adult controls (Table 1). 17% of the Crohn's disease patients were either heterozygous or homozygous for the mutation compared to 4.3% of controls (Table 1). There were no differences in the allele frequencies of R702W and G908R variants between the adult CD populations and the controls (Table 1).

We examined 19 pediatric patients with CD (14 males, 5 females, mean age: 13.4 years). This cohort was compared with 49 pediatric healthy control subjects (28 males, 21 females, mean age: 14.4 years). We found significantly increased homozygous genotype and mutant allele frequency for G908R and 1007finsC in pediatric patients compared to the pediatric controls (Table 2). For R702W no significant difference was found between the genotype- and allele-distribution of the the pediatric CD group compared to the healthy controls (Table 2).

4.2. SLC22A4 C1672T, SLC22A5 G-207C

We examined 100 patients with CD (47 males, 53 females, mean age: 37.3 years), and 94 healthy control subjects (47 males, 47 females, mean age: 45.6 years). There were no differences in the allele frequencies of SLC22A4 C1672T and SLC22A5 G-207C mutations as compared the results of the adult CD populations to the controls (Table 3). There was no statistically significant difference in the prevalence of TC haplotype between the CD patients and controls (Table 3).

We examined 121 UC patients with typical symptoms and diagnosis of ulcerative colitis (47 males, 74 females; mean age 47.8 years) and 110 clinically healthy controls (59 males, 51 females; mean age 46.7 years). We found that in SLC22A4 C1672T the T allele frequency was not significantly different from healthy controls (Table 4). The SLC22A5 G-207C the C allele frequency was also not significantly different in the UC population compared to the control group (Table 4). We could not detect accumulation of SLC22A4 and SLC22A5 susceptibility variants nor the TC haplotype (Table 4).

We examined 19 pediatric patients with CD (14 males, 5 females, mean age: 13.4 years). This cohort was compared with 49 pediatric healthy control subjects (28 males, 21 females, mean age: 14.4 years). There were no significant differences in the allele frequencies either for SLC22A4 1672T or SLC22A5 -207C SNPs (Table 5).

4.3. CTLA4 A+49G

We examined 130 patients with CD (55 males, 75 females, mean age: 43.0) and 150 patients with UC (63 males, 87 females, mean age: 46.1). A total of 170 selected controls (49 males, 121 females, mean age: 57.7) were analyzed as well. We found no increased prevalence rate of the homozygous GG genotype, and no accumulation of the G allele alone, neither expressed as AG heterozygous genotype, nor as the G allele frequency, in any IBD type compared to the healthy, IBD free controls (Table 6).

4.4. IL23R rs10889677 C/A, rs2201841 T/C, rs1884444 G/T

The Crohn's disease group consisted of 190 subjects (88 males, 102 females, mean age: 39.6 years). A total of 220 subjects (115 males, 105 females, mean age: 41.7 years) served as controls. The rs10889677 AA homozygous genotype was significantly increased in patients with Crohn's disease, compared to the healthy controls (Table 7). Logistic regression analysis revealed that the AA genotype represented a 2.19 times higher risk for the development of CD. For rs2201840 the CC homozygous genotype and the C mutant allele frequency were significantly increased in the CD group compared to the controls (Table 7). Logistic regression analysis revealed that the CC genotype represented a 2.41 higher times risk for the development of CD. The prevalence of any allelic variants of the rs1884444 did not significantly differ in the CD group as compared with controls (Table 7).

Table 1: Comparison of the alleles of CARD15 genes in adult Crohn's disease patients and adult controls.

		Adult CD patients n=100	Adult controls n=94
CARD15 genotype			
R702W	CC	87 (87.0%)	87 (92.6%)
	CT	12 (12.0%)	5 (5.3%)
	TT	1 (1.0%)	2 (2.1%)
	T allele frequency	7.00%	4.79%
G908R	GG	94 (94.0%)	93 (98.9%)
	GC	6 (6.0%)	1 (1.16%)
	CC	-	-
	C allele frequency	3.00%	0.53%
1007finsC	--	83 (83.0%)	90 (95.7%)
	- insC	15 (15.0%)	4 (4.3%)
	insC insC	2 (2.0%)	-
	Cins allele frequency	9.50%*	2.13%

*P<0.05

Table 2: Comparison of the alleles of CARD15 genes in pediatric Crohn's disease patients with pediatric controls.

		Pediatric CD patients n=19	Pediatric controls n=49
CARD15 genotype			
R702W	CC	18 (94.7 %)	46 (93.9 %)
	CT	1 (5.3 %)	2 (4.1 %)
	TT	-	1 (2.0 %)
	T allele frequency	2.63 %	4.08 %
G908R	GG	14 (73.7 %)	48 (98.0 %)
	GC	3 (15.8 %)	1 (2.0 %)
	CC	2 (10.5 %)*	-
	C allele frequency	18.4 %*	1.02 %
1007finsC	--	13 (68.5 %)	46 (93.9 %)
	- insC	4 (21.0 %)	3 (6.1 %)
	insC insC	2 (10.5 %)*	-
	Cins allele frequency	21.1 %*	3.06 %

*P<0.05

Table 3: Comparison of the alleles of SLC22A4 and SLC22A5 cation transporter genes and the TC haplotype distribution in adult CD patients and adult controls.

		Adult CD patients n=100	Adult controls n=94
SLC22A4 genotype			
C1672T	CC	37 (37.0%)	28 (29.8%)
	CT	54 (54.0%)	45 (47.9%)
	TT	9 (9.0%)	21 (22.3%)
	T allele frequency	36.0%	46.3%
SLC22A5 genotype			
G-207C	GG	31 (31.0%)	19 (20.2%)
	GC	54 (54.0%)	51 (54.3%)
	CC	15 (15.0%)	24 (25.5%)
	C allele frequency	42.0%	52.7%
	TC haplotype	9 (9.0%)	19 (20.2%)

*P<0.05

Table 4: Comparison of the alleles of SLC22A4 and SLC22A5 cation transporter genes and the TC haplotype distribution in adult UC patients and adult controls.

		Adult UC patients n=121	Adult controls n=110
SLC22A4 genotype			
C1672T	CC	38 (31.4%)	35 (31.8%)
	CT	53 (43.8%)	48 (43.6%)
	TT	30 (24.8%)	27 (24.5%)
	T allele frequency	46.7%	46.4%
SLC22A5 genotype			
G-207C	GG	33 (27.3%)	25 (22.7%)
	GC	58 (47.9%)	57 (51.8%)
	CC	30 (24.8%)	28 (25.5%)
	C allele frequency	48.8%	51.4%
	TC haplotype	23 (19.0%)	25 (22.7%)

*P<0.05

Table 5: Comparison of the alleles of SLC22A4 and SLC22A5 cation transporter genes and the TC haplotype distribution in pediatric CD patients and pediatric controls.

		Pediatric CD patients n=19	Pediatric controls n=49
SLC22A4 genotype			
C1672T	CC	4 (21.0 %)	12 (24.5 %)
	CT	11 (58.0 %)	25 (51.0 %)
	TT	4 (21.0 %)	12 (24.5 %)
	T allele frequency	50.0 %	50.0 %
SLC22A5 genotype			
G-207C	GG	3 (15.8 %)	10 (20.4 %)
	GC	7 (36.8 %)	26 (53.1 %)
	CC	9 (47.4%)	13 (26.5 %)
	C allele frequency	65.8 %	53.1 %

*P<0.05

Table 6: Prevalence of the alleles of CTLA4 gene in patients with Crohn's disease, ulcerative colitis and controls.

		CD patients	UC patients	Controls
		n=130	n=150	n=170
CTLA4 genotype				
+49A/G	AA	47 (36.2 %)	56 (37.3 %)	70 (41.2 %)
	AG	67 (51.5 %)	66 (44.0 %)	73 (42.9 %)
	GG	16 (12.3 %)	28 (18.6 %)	27 (15.9 %)
G allele frequency		38.1 %	40.6 %	37.4 %

*P<0.05

Table 7: Interleukin-23 receptor rs10889677, rs2201841 and rs1884444 genotype and allele frequencies in CD patients and controls.

		CD patients n=190	Controls n=220
IL23R genotype			
rs10889677	CC	75 (39.5%)	96 (43.6%)
	CA	92 (48.4%)	111 (50.5%)
	AA	23 (12.1%)*	13 (5.91%)
	A allele frequency	36.3%	31.1%
rs2201841	TT	75 (39.5%)	101 (45.9%)
	CT	90 (47.4%)	106 (48.2%)
	CC	25 (13.2%)*	13 (5.91%)
	C allele frequency	36.8%*	30.0%
rs1884444	GG	57 (30.0%)	55 (25.0%)
	GT	132 (69.5%)	162 (73.6%)
	TT	1 (0.53%)	3 (1.36%)
	T allele frequency	35.3%	38.2%

*P<0.05

5. DISCUSSION

Inflammatory bowel disease is a multifactorial disorder characterized by non-specific inflammation of the digestive tract with several intestinal and extraintestinal manifestations. The development of these diseases are known to be influenced by both environmental factors and complex genetic predisposition. Our goal was to analyse the possible influence of 9 variants of 5 genes on Hungarian IBD population. PCR/RFLP method or direct sequencing were used for detecting the different genotypes.

We examined previously described CARD15 mutations in Hungarian adult and, for the first time in the literature, in Hungarian pediatric CD population. In the adult CD group the 1007finsC showed significantly increased heterozygous and homozygous genotype distribution and mutant allele frequency compared to the adult controls. The R702W and the G908R showed no significant difference in distribution between the adult CD population and the healthy controls. We confirmed that the 1007finsC is a risk factor for CD in the Hungarian population. Examining the pediatric CD group, the G908R and the 1007finsC were significantly more frequent in the pediatric CD group compared to the controls. We observed an association between these two CARD15 mutations and pediatric cases. The R702W variant showed no disease association. We concluded from these results, that in the Hungarian population the adult Crohn's profile differs from the pediatric Crohn's profile. It depends on the different populations studied, whether CARD15 mutations are susceptibility factors for Crohn's disease or not.

We examined the SLC22A4 1672T and the SLC22A5 -207C combination defined TC haplotype in Hungarian adult IBD and first in the literature in pediatric population. We found that the TC haplotype was not associated with IBD in the Hungarian population either in the adult or in the pediatric cohort. We concluded that these SNPs do not necessarily indicate susceptibility to IBD. Our findings show that it might depend on the population if this haplotype confers susceptibility to IBD.

We examined the CTLA4 gene +49A/G polymorphism and we found that the G variant does not represent an obligatory susceptibility factor for Crohn's disease or for ulcerative colitis. We could not demonstrate an association between this variant and the development of the disease in the Hungarian population. It most likely depends on the population studied, whether this variant is a risk factor for IBD or not.

For the first time we examined in Hungarian population the variants of IL23R, that Duerr and colleagues described in 2006. The rs10889677 and rs2201841 showed significant increased homozygous genotype and mutant allele frequency in the CD group compared to the controls. These variants are in strong association with Crohn's disease in the Hungarian population, while the neutral variant rs 1884444 showed no disease association. Our results support the data of Duerr and colleagues, as they have found that the rs10889677 and the rs2201841 are susceptibility factors for CD in Jewish and non-Jewish populations.

The results of this dissertation help us to understand the genetic background of inflammatory bowel disease. Identification of novel genetic variants and determination of genotype-phenotype associations might contribute to recognition of risk factors, to early diagnosis and efficient prevention of the disease.

6. CONCLUSION

I. We ascertained, that in our examined adult Crohn's disease patients, one of the CARD15 mutations, the 1007finsC was significantly associated with an increased risk for CD.

II. Examining the pediatric Crohn's disease patients, we concluded that two of the CARD15 mutations, the G908R and the 1007finsC confer risk for the development of CD.

III. SLC22A4/A5-TC haplotype showed no disease association comparing the results of the adult IBD populations to the controls.

IV. We concluded also the same in the pediatric group, the TC haplotype showed no disease association, when we compared the result of the pediatric CD cohort to the controls.

V. The A+49G variant of the CTLA4 gene was not an independent determinant to IBD.

VI. We found that the IL-23 receptor gene variants, rs10889677 and rs2201841 appear to increase susceptibility to CD in our Hungarian adult Crohn's disease population.

7. LIST OF PUBLICATIONS

7.1. The thesis is based on the following publications

1. **Magyari L**, Bene J, Komlosi K, Talian G, Farago B, Csongei V, Jaromi L, Safrany E, Sipeky C, Lakner L, Varga M, Gasztonyi B, Melegh B. Prevalence of SLC22A4 1672T and SLC22A5 -207C Combination Defined TC Haplotype in Hungarian Ulcerative Colitis Patients. *Pathol Oncol Res.* 2007;13(1):53-6. IF:1.241

2. **Magyari 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.

3. Bene J, **Magyari L**, Talian G, Komlosi K, Gasztonyi B, Tari B, Varkonyi A, Mozsik G, Melegh B. Prevalence of SLC22A4, SLC22A5 and CARD15 gene mutations in Hungarian pediatric patients with Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* 2006;12(34):5550-3.

4. Bene J, Komlosi K, **Magyari L**, Talian G, Horvath K, Gasztonyi B, Miheller P, Figler M, Mozsik G, Tulassay Z, Melegh B. Plasma carnitine ester profiles in Crohn's disease patients characterized for SLC22A4 C1672T and SLC22A5 G-207C genotypes. *Br J Nutr.* 2007;98(2):345-50. IF:2.708

5. Farago B, **Magyari L**, Safrany E, Csongei V, Jaromi L, Horvatovich K, Sipeky C, Maasz A, Radics J, Gyetvai A, Szekanecz Z, Czirjak L, Melegh B. Functional variants of interleukin-23 receptor gene confer risk for rheumatoid arthritis but not for systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2008 Feb;67(2):248-50. Epub 2007 Jul 2. IF:5.767

7.2. Other articles

1. Illes Z, Safrany E, Peterfalvi A, **Magyari L**, Farago B, Pozsonyi E, Rozsa C, Komoly S, Melegh B. 3'UTR C2370A allele of the IL-23 receptor gene is associated with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurosci Lett*. 2007 Nov 17; (Epub ahead of print) IF:2.092

2. Maasz A, Kisfali P, Horvatovich K, Mohas M, Marko L, Csongei V, Farago B, Jaromi L, **Magyari L**, Safrany E, Sipeky C, Wittmann I, Melegh B. Apolipoprotein A5 T-1131C variant confers risk for metabolic syndrome. *Pathol Oncol Res*. IF:1.241

3. Farago B, Talian G, Maasz A, **Magyari 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

4. Szolnoki Z, Maasz A, **Magyari 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:2.965

5. Safrany E, Csongei V, Jaromi L, Maasz A, **Magyari L**, Sipeky C, Melegh B. Mitochondrial DNA and its mutations: novel fields in a new era. *Orv Hetil*. 2007;27;148(21):971-8. Hungarian.

6. Banyai K, Jiang B, Bogdan A, Horvath B, Jakab F, Meleg E, Martella V, **Magyari L**, Melegh B, Szucs G. Prevalence and molecular characterization of human group C rotaviruses in Hungary. *J Clin Virol*. 2006 Dec;37(4):317-22. Epub 2006 Sep 25. IF:2.630

7. Szolnoki Z, Maasz A, **Magyari 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:3.396

8. Maasz A, Horvatovich K, **Magyari L**, Talian Csaba G, Bokor S, Laczy B, Tamasko M, Molnar D, Wittmann I, Melegh B. Search for mitochondrial DNA T4291C mutation in Hungarian patients with metabolic syndrome. *Orv Hetil*. 2006;16;147(15):693-6. Hungarian.

9. Komlosi K, Talian C G, Farago B, **Magyari L**, Cserep V, Kovacs B, Bene J, Havasi V, Kiss G C, Czirjak L, Melegh B. No influence of SLC22A4 C6607T and RUNX1 G24658C genotypic variants on the circulating carnitine ester profile in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2008;26; (elfogadva, közlés alatt) IF:2.189

7.3. Congress abstracts and posters

1. Horvatovich K, **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 variant 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 B. 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 in the filaminB gene: novel candidates for causing disease? *Eur J Hum Genet*. 2006;14 Suppl. 1, 250.

6. **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.

7. Farago B, **Magyari L**, Csongei V, Jaromi L, Safrany E, Horvatovich K, Sipeky C, Maasz A, Radics 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.

8. Horvatovich K, **Magyari L**, Maasz A, Kisfali P, Farago B, Bokor S, Mohas M, Molnar D, Melegh B. Apolipoprotein A5 T-1131C alleles in pediatric patients with obesity and metabolic syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2007;15 Suppl. 1, 178.

9. Talian C G, Komlosi K, **Magyari L**, Nemes E, Kaposzta R, Mogyorosy G, Mehes K, Melegh B. Investigation of plasma carnitine ester profiles in a family with homozygous and heterozygous OCTN2 deficiency. *Eur J Hum Genet*. 2007;15 Suppl. 1, 216.

10. Safrany E, Farago B, Csongei V, **Magyari L**, Maasz A, Sipeky C, Jaromi L, Horvatovich K, Czirjak L, Radics J, Melegh B. Interleukin-23 receptor (IL23R) gene C2370A polymorphism in scleroderma patients. *Eur J Hum Genet.* 2007;15 Suppl. 1, 256.
11. Maasz A, Horvatovich K, Kisfali P, Mohas M, Marko L, Csongei V, Farago B, Jaromi L, **Magyari L**, Safrany E, Sipeky C, Wittman I, Melegh B. Apolipoprotein A5 T-1131C variant confers risk for metabolic syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2007;15 Suppl. 1, 178.
12. Csongei V, Jaromi L, Safrany E, Sipeky C, Maasz A, **Magyari L**, Horvatovich K, Farago B, Takacs I, Melegh B. Polymorphisms of the MDR1 gene in Hungarian Roma population samples. *Eur J Hum Genet.* 2007;15 Suppl. 1, 260.
13. Kisfali P, Mohas M, Horvatovich K, Maasz A, Marko L, Csongei V, Farago B, Jaromi L, **Magyari L**, Safrany E, Sipeky C, Wittman I, Melegh B. Common allelic variants of APOA5 gene in the metabolic syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2007;15 Suppl. 1, 210.
14. Sipeky C, Csongei V, Farago B, Horvatovich K, Jaromi L, **Magyari L**, Safrany E, Takacs I, Melegh B. Polymorphisms of CYP2C9 and VKORC1 genes associated with the warfarin metabolism in Hungarian Roma population. *Eur J Hum Genet.* 2007;15 Suppl. 1, 282.
15. Jaromi L, Maasz A, Szolnoki Z, Kisfali P, Horvatovich K, Csongei V, **Magyari L**, Safrany E, Sipeky C, Melegh B. Apolipoprotein A5 gene T1259C polymorphism associated with elevated circulating triglyceride levels but does not confer susceptibility for ischaemic stroke. *Eur J Hum Genet.* 2007;15 Suppl. 1, 235.
16. Illes Z, Farago B, Peterfalvi A, **Magyari L**, Pozsonyi E, Rozsa C, Komoly S, Melegh B. 3'UTR C2370A allele of the IL-23 receptor gene is associated with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2007;13 Suppl. 2, S202.

Cumulative impact factor (without citated abstracts): 26.418