

A DNS epigenetikai változásai és vizsgálati módszerei

Németh Zsuzsanna dr.¹ ■ Takács István dr.¹ ■ Molnár Béla dr.^{1, 2}

¹Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Belgyógyászati és Onkológiai Klinika, Budapest

²Eötvös Loránd Kutatási Hálózat, Molekuláris Medicina Kutatócsoport, Budapest

A humán DNS hordozza az emberi szervezet felépítéséhez és működéséhez szükséges összes információt, a legtöbb betegség kialakulása azonban elsődlegesen mégsem a genetikai anyagban rögzített információ változásának következménye. A mutációk például csak a daganatok 5–10%-ában közvetlen okai a betegség kialakulásának. A nukleotidszintű genetikai eltérések és strukturális variációk mellett a kromatin térbeli formaváltozása is hozzájárul a fenotípus kialakulásához a génátíródás, illetve a jelátviteli utak módosításán keresztül. Az emberi DNS epigenetikai szabályozás révén folyamatos átrendeződésen megy át. Ilyenkor a DNS nukleotidszekvenciája, információtartalma nem változik, hanem a szabályozó vagy kódoló régió válik aktívvá vagy inaktívvá a mindenkori fiziológiai szükségleteknek, életkori sajátosságoknak megfelelően. A DNS-nek ezt a szabályozott átrendeződését „remodeling”-nek hívjuk. Ennek célja, hogy a sejtekben mindig az aktuális működést biztosító fehérjéknek megfelelő génszakaszok íródjanak át. Ez a működés azonban az életkor előrehaladtával veszít hatékonyságából, és sok betegség kialakulása éppen az epigenetikai szabályozás egyensúlyának megbomlására vezethető vissza. Az epigenetikai változások vizsgálatára és mérésére több olyan régi és új elképzelés, illetve módszer van, melyek diagnosztikus alkalmazása segítséget adhat a betegségek korai előrejelzésében. Összefoglaló cikkünk az epigenetikai szabályozás sokrétűségét kívánja bemutatni, rávilágítva egyes központi molekulák, hormonok szerepére az öregedésben és az azzal összefüggő betegségek létrejöttében. Emellett a legújabb epigenetikai vizsgálómódszerek – úgymint a kromatin-immunprecipitáció (ChIP), a nyitott kromatinrészek feltérképezése, a metiláltsági szint vizsgálata – lényegét is ismerteti, melyek alkalmasak lehetnek a közeljövőben diagnosztikus módszerek kidolgozására is.

Orv Hetil. 2022; 163(34): 1334–1344.

Kulcsszavak: DNS-remodeling, epigenetika, hisztonmódosítás, DNS-módosítás, öregedés

Epigenetic changes of DNA and their research methods

All the information, which determine the structure and function of the human body, is carried by the human DNA. However, the development of several human diseases is not primarily originated from the changes of this genetic information, which laid into the DNA. For example, only 5–10% of the developed cancers are caused primarily by mutations. Changes in the three-dimensional structure of the chromatin, beside the genetic alterations in the nucleotide level and structural variants of the genome, also take part in the development of phenotype through the modification of transcription and signal transduction. The human DNA is continuously rearranged by epigenetic regulation. In this process, the nucleotide sequence and the coding information are not changing in the DNA, only the active and inactive state of the regulatory and coding regions according to the actual need of the physiological and age-dependent conditions. This regulated rearrangement of the DNA, which is called “remodeling”, ensures the optimal transcription of the necessary proteins and genes. The effectiveness of this function, however, is decreasing during the aging process and thus resulted in several diseases as a consequence of an unbalanced epigenetic regulation. There are several old and new ideas and methods to research and measure the epigenetic changes, which diagnostic applications could support the early prediction of the development of diseases. The aim of our review article is to summarize the complexity of the epigenetic regulation, highlight the role of some key molecules and hormones in the process of aging, and related diseases as well. Moreover, we describe the newest methods analysing the epigenetic changes, like chromatin immunoprecipitation (ChIP), detection of the open chromatin regions, detection of DNA methylation level, which could be applied as diagnostic methods in the near future.

Keywords: DNA remodeling, epigenetics, histone modification, DNA modification, aging

Németh Zs, Takács I, Molnár B. [Epigenetic changes of DNA and their research methods]. Orv Hetil. 2022; 163(34): 1334–1344.

(Beérkezett: 2022. február 16.; elfogadva: 2022. április 22.)

Rövidítések

ADP = (adenosine diphosphate) adenosin-difoszfát; ATP = (adenosine triphosphate) adenosin-trifoszfát; ChIP = (chromatin immunoprecipitation) kromatin-immunprecipitáció; CpG = (cytidine-phosphate-guanosine) citidin-foszfát-guanozin; DNS = dezoxiribonukleinsav; ELISA = (enzyme-linked immunosorbent assay) enzimhez kapcsolt immunszorbensvizsgálat; H3K9m3, H3K27m3 = trimetil-hisztón-3, 3 metilcsoport a 9. és 27. lizinen; HDAC = hisztón-deacetiláz; HRE = (hormon-responsive element) hormonra reagáló szakasz; HSP = (heat shock protein) hő sokkfehérje; LAD = (lamina-associated domains) laminához kapcsolt domének; NADPH = (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát; NET = (neutrophil extracellular trap) neutrophil sejten kívüli háló; NR = nukleáris receptor; PAD4 = peptidil-arginin deamináz 4; PCR = (polymerase chain reaction) polimeráz-lánreakció; RNS = ribonukleinsav; ROS = (reactive oxygen species) reaktívoxigén-fajták; SIRT1 = szirtuin-1; SUMO = (small ubiquitin-related modifier) kis ubiquitinszerű módosító (fehérje); SWI/SNF = switch/sucrose non-fermentable; TF = transzkripció faktor

A humán DNS hordozza az emberi szervezet felépítéséhez és működéséhez szükséges összes információt, a benne található szabályozó és fehérjekódoló részek teszik lehetővé a szervezet összehangolt működését, amelynek alapja a gének megfelelő átíródása. Ez a génefejeződés szoros szabályozott folyamat, amely egyrészt DNS-ben kódolt, másrészt azonban környezeti, epigenetikai szabályozás alatt áll. Ennek megfelelően hibás működésének oka nemcsak a mutációkban keresendő, hanem egyéb, a genetikai állomány információtartalmát nem érintő változásokban is.

Az emberi DNS epigenetikai szabályozás révén folyamatosan átrendeződésen megy keresztül – ilyenkor a DNS nukleotidszekvenciája, információtartalma nem változik, csak az, hogy melyik szabályozó vagy kódoló régió legyen aktív, illetve inaktív, a mindenkori fiziológias szükségleteknek, életkori sajátosságoknak megfelelően. A DNS-nek ezt a szabályozott átrendeződését „remodeling”-nek hívjuk, melynek célja, hogy a sejtekben mindig az aktuális működést biztosító fehérjéknek megfelelő génszakaszok íródjanak át [1].

A legtöbb betegség kialakulása elsődlegesen nem genetikai változás eredménye, csak következményesen. Így például a daganatos betegségek kialakulásáért 90–95%-ban környezeti tényezők tehetők felelőssé, és a genetikai csak a daganatok 5–10%-ánál oka közvetlenül a betegség kialakulásának [2]. A dohányzás ismert csökkenti a DNS metiláltsági állapotát: ez olyan szabályozási „jel” a génállományon, amely gátolja azon gének működését, melyekre aktuálisan nincs szükség, éppen ezért nem időszzerű bekapcsolódásuk kisebb vagy nagyobb mértékben, de káros a szervezetre [3, 4].

Napjainkban főként a DNS-szekvencia változásait, a mutációkat detektáljuk, és tesszük felelőssé a betegségek létrejöttéért, és főként ennek alapján készülnek a terápiás javaslatok is a célzott kezeléseket illetően. Az epigeneti-

kai változásokat kimutató diagnosztikus módszerek alkalmazása napjainkban elenyésző, pedig a kóros DNS-remodeling miatt az adott helyzetben nem szükséges fehérjék íródhatnak át, vagy szükséges fehérjék átíródása gátlódhat.

Dolgozatunk célja, hogy összefoglaljuk a DNS-szekvencia változása nélküli, a fenotípus változásához hozzájáruló sejtmagfolyamatokat, amelyek megjelenhetnek a kromatinremodelinggel, valamint azok vizsgálati lehetőségeit.

Kromatinremodeling

A kromatinnak, amely a DNS és a hozzá kapcsolódó fehérjekomplexek együttese, két alapvető működési állapota ismert: a kondenz, át nem íródó, „csendes” heterokromatin és az átíródó eukromatin [5].

A DNS a „cukor-foszfát” vázának foszfátcsoportja révén negatív töltésű. A DNS kettős szála pozitív töltésű hisztónfehérjékre feltekeredve nukleoszómaállapotban van jelen sejteinkben (másként fogalmazva gyöngyfűzészzerűen rendezett állapotnak is nevezik [1/A ábra]). Érdekességképpen, az egy-egy sejtben lévő 46 kromoszómánk együttesen nagyjából 2 méter hosszú DNS lenne letekeredett állapotban, nukleoszómaszerkezet nélkül [6].

A negatív töltésű DNS és a pozitív töltésű fehérjék között létrejövő elektrosztatikus kölcsönhatás biztosítja a kromatin viszonylagosan stabil, kompakt szerkezetét [6]. A H2A, H2B, H3 és H4 hisztónfehérje-család teszi lehetővé a DNS nukleoszómákba szerveződését, a H1 hisztón pedig a nukleoszómák közötti kapcsolatot biztosítja. Két-két H2A–H2B és H3–H4 hisztóndimer oktamerbe rendeződve adja a DNS feltekeredésének alapját. N-terminális végeik hosszan kinyúlnak az oktamerből, és a DNS köré szerveződnek. Az itt található aminosavak a célpontjai a hisztónokat módosító enzimeknek (1. táblázat) [7].

Ahhoz, hogy a DNS adott fehérjéket kódoló szakaszai, a gének a megfelelő enzimek számára hozzáférhetőek legyenek és átíródhassanak, a nukleoszómaszerkezetnek meg kell változnia: a DNS-nek le kell tekerednie, továbbá kettős szálának szét kell nyílnia. A DNS nukleoszómaszerkezetét két alapvető, egymással ellentétes hatású folyamat befolyásolja: a hisztónok legjellemzőbb módosításait követően a hisztón–DNS kapcsolat meglazul (1/A ábra), míg a DNS metilálása kompaktabb, további molekulák számára nehezebben hozzáférhető állapotot eredményez [6].

A DNS-remodelinghez szükség van a hisztónok és a DNS módosítására, amelyben számos fehérjecsoport játszhat szerepet (1. táblázat).

Ezek között a hisztón-acetilázok acetilcsoportokat kötnek a hisztónok N-terminális végi lizin vagy arginin fehérjéire, megszüntetve azok pozitív töltését, így destabilizálják a feltekeredett gyöngyfűzészkezetet, és átíródó eukromatint alakítanak ki (1/A és 1/C ábra).

1. táblázat | A fontosabb DNS-modellátorok és feladataik

Fontosabb DNS-modellátorok	Feladata	Célmolekula	Donormolekula	Érintett oldalláncok
Hisztion-acetiltransferáz (HAT)	Acetilálás (Ac)	Hisztion	Acetil-CoA	Lys (K)
Hisztion-deacetyláz (HDAC)	Deacetylálás	Hisztion	Acetil-CoA	Lys (K)
SWI/SNF	Hisztion acetilálása (Ac), Hisztion csúsztatása, kivágása, helyettesítése; DNS újrendezése	Hisztion, DNS	Acetil-CoA, –	Lys (K), –
ISWI	Hisztion csúsztatása	Hisztion	–	–
Mi2/Chd	Hisztion metilálása (Me), hisztion csúsztatása	Hisztion	S-adenozil-Met, –	Glu (E)
DNS-metiltransferáz(DNMT)	Metilálás (Me)	DNS	S-adenozil-Met	Glu (E)
Proteinkinázok	Foszforiláció (P)	Hisztion, DNS	ATP	Ser (S)
Protein-foszfátázok	Defoszforiláció	Hisztion, DNS	ATP	Thr (T), Tyr (Y), His (H)
ADP- és poli-ADP-riboziltransferázok (ART), PARP	ADP-ribozilálás	Hisztion	NAD+	Arg (R), Gln (Q), Cys (C)
ADP-ribozil-glikohidrolázok (ARH)	ADP-riboziláció eltávolítása	Hisztion	NAD+	Arg (R), Gln (Q), Cys (C)
Ubikvitin ligáz (E1, E2, E3)	Ubikvitinálás	Hisztion	Ubikvitin	Lys (K)
Deubikvitináló enzimek (DUBs)	Deubikvitinálás	Hisztion	Ubikvitin	Lys (K)
Az ubikvitináláshoz hasonló enzim kaszkád (E1, E2, E3 ubikvitin-ligáz)	SUMOilálás	Hisztion	SUMO	Lys (K)

ADP = adenzin-difoszfát; ATP = adenzin-trifoszfát; DNS = dezoxiribonukleinsav; NAD = nikotinamid-adenin-dinukleotid

A metilált hisztionoldalláncok többféle feladatot töltenek be:

1. DNS-átíródást indukálhatnak (például H3K4m3, H3K4m2 metiláltsági állapot a 4. lizin oldallánc esetén, amely a promoter régiókra, illetve az eukromatinra jellemző állapot);

2. vagy akár átíródást gátló jelekként szolgálhatnak (például H3K9m3, H3K27m3 a 9. és 27. lizin esetén, ami a heterokromatinra jellemző);

3. valamint más fehérjéknek biztosítanak kötődési helyet (ilyenek például a „kromodomén”-t tartalmazó fehérjék, melyek a metilált oldalláncok multimetilálását teszik lehetővé (1/B és 1/C ábra) [5].

A hisztionok ADP-ribozilálása a gének teljes terjedelmében megfigyelhető a hősokkfehérjék (HSP-k) génátíródási helyeinél. Az ott így „megjelölt” hisztionok a megfelelő enzimek által kivágódnak, szabaddá téve a DNS HSP-t kódoló részét, ezáltal a HSP-k génátíródása válik lehetővé [8, 9].

Az ubikvitinálás a hisztionok lebomlási útját indítja el (1/B ábra) [8, 9].

Az emberi szervezet SWI/SNF fehérjekomplexe, más néven BAF-komplex (1/C ábra) a kromatin szerkezetátalakításának kulcsfontosságú fehérjeegyüttese, mivel többféle típusú átalakítást is képes elvégezni a nukleoszóma szerkezetében.

1. ATP-függő módon megbontja a nukleoszómaszerkezetet, és stimulálja további transzkripciós faktorok (TF-ek) kötődését a nukleoszóma DNS-részéhez [1].

2. Miközben acetilálja a hisztionokat, letekeri a DNS-t, és az eközben kialakuló szerkezeti „feszültségeket” feloldva lehetővé teszi a kettős szálú DNS szétnyitását végző polimerázkomplexnek a gének átírását is (1/C ábra) [10].

3. Ez az evolúciósan konzerv fehérjekomplex a fent említett hisztionacetiláción túl hisztionhelyettesítést is végez. Így a H3.3 beillesztését végzi el a gyakran átíródó részekhez, vagy a kettős szálú DNS törési helyénél a H2A.Z-t helyettesíti H2A.X-szel, ahol ez utóbbi foszforilálódást követően DNS-javító enzimeket toboroz a törött DNS-szakaszhoz.

4. Hisztioncsúsztatást tud létrehozni a promoter régió felszabadítására.

5. Továbbá hisztionokat képes kivágni, ha az adott szakasz teljes átíródása szükséges (ld. a HSP génjeinek ADP-ribozilálását) [1, 8, 11].

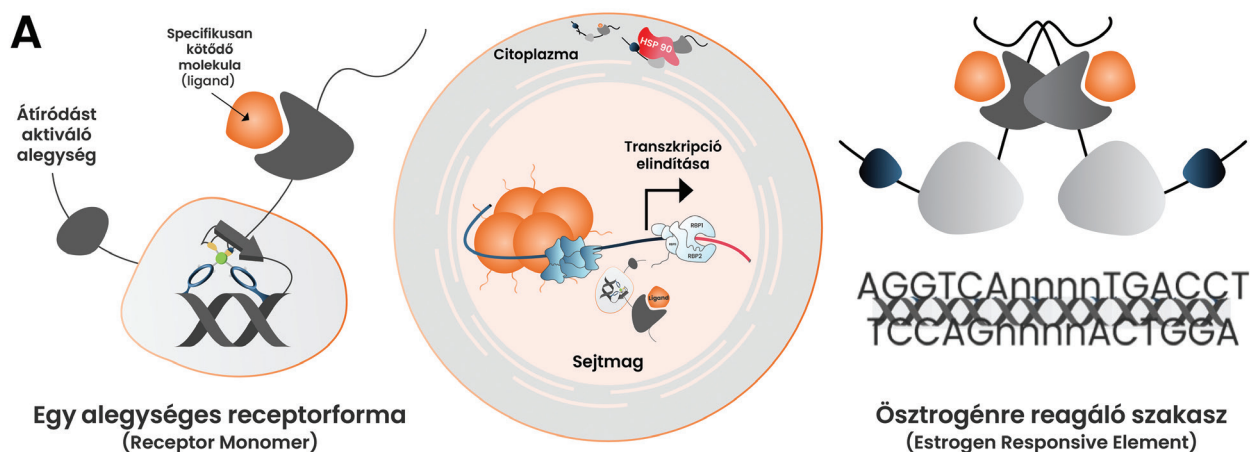
Szerkezetét tekintve a BAF-komplex fontosabb részei az ATP-bontó alegység (BRM/BRG1), a bromo/kromo módosító alegység (amely acetyl- vagy metilcsoporthoz tud kötődni a célfehérjén), az aktinkötő domén (HSA), illetve a DNS-kötő alegység (1/C ábra) [10, 12, 13].

A kromatinszerkezet változását idézi elő a telomeráz enzim is, mely a DNS-végi szakaszok hosszát befolyásolva meghatározza a sejt maximális osztódási lehetőségét, végső soron az életkorát [14]. Jelentős szerkezetváltozás az osztódáskor megfigyelhető kromoszómaszerkezet kialakulása is, illetve annak eltűnése interfázisban, ennek azonban elsődlegesen nem a génszabályozás megváltoztatása a célja a környezeti hatásoknak megfelelően, hanem az, hogy osztódáskor az információ a leánysejtekbe könnyedén és sérülésmentesen átkerüljön. Továbbá nem kódoló RNS-ek is részt vesznek a DNS szerkezetének alakításában és a génszabályozásban is [15].

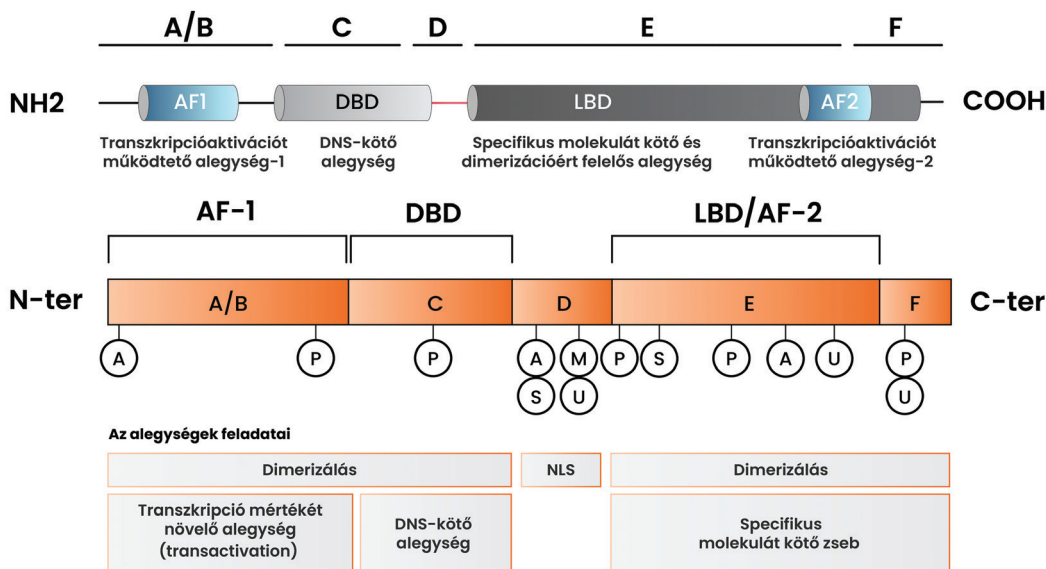
Receptorok

A DNS-remodeling szabályozása – a sejtműködés más folyamataihoz hasonlóan – információhordozó molekulák és azokat érzékelő receptorok révén valósul meg. Ez utóbbiakat összefoglaló néven nukleáris receptoroknak (NR-ek) nevezzük. Mivel a sejtmagban a DNS átíródását indítják el, TF-ek [16].

Szerkezetük és sejten belüli elhelyezkedésük szempontjából két alaptípusukat különböztetjük meg. Az egyik a citoplazmában található, és a megkötött ligand-molekulával együtt jut a sejtmagba, és indítja el a DNS



B



2. ábra

Az I. típusú nukleáris receptorok sejten belüli elhelyezkedése és fehérjeszerkezete. A) *Bal oldali rész:* Az ösztrogénreceptor monomer formájának képe látható a molekula alegységeit és a molekulán belüli egymáshoz viszonyított elhelyezkedésüket ábrázolva. *Középső rész:* Az I. típusú receptor sejten belüli elhelyezkedése látható ligandot kötve és ligand hiányában hőszokkfehérjéhez kötötten a citoplazmában, valamint a sejtmagban már ligandot kötve és a megfelelő génátíródást elindítva. *Jobb oldali rész:* Az ösztrogénreceptor dimerizált formája látható a DNS megfelelő szakaszához kötődve, amit ösztrogénre reagáló szakasznak, angolul „estrogen-responsive element”-nek nevezünk. B) Az I. típusú nukleáris receptorok sematikus, általános szerkezete. *Felső rész:* Az alegységek elhelyezkedése a nukleárisreceptor-fehérje N- és C-terminális részéhez viszonyítva három- és egybetűs megnevezésekkel ábrázolva. *Középső rész:* Az egyes alegységek legjellemzőbb módosításainak bemutatása (A = acetiláció; P = foszforiláció; S = SUMOiláció; U = ubikvitináció). *Alsó rész:* Az alegységek feladatainak bemutatása.

DNS = dezoxiribonukleinsav

átrendeződését, míg a másik a sejtmagban található, és a hozzá kapcsolódó ligandmolekulával csak annak sejtmagba jutását követően lép kapcsolatba, és válik aktívvá [17].

Az NR-ek további szempontok szerinti csoportosítása is ismert. Így a molekula DNS-kötő sajátságai alapján 7 (NR1, NR2, NR3, NR4, NR5, NR6, NR0), míg működésüket tekintve római számmal jelölve I–IV. típusba sorolják őket [18].

Az I. típusra jellemző, hogy ligandjuk nélkül HSP-t kötve a citoplazmában található; ligandkötéskor a HSP felszabadul, és a molekula a sejtmagba helyeződik át, ahol homodimerként kötődik a DNS megfelelő szakaszán lévő „hormon-responsive element”-ekhez (HRE-k) (2/A ábra). Ligandjaikhoz – mint például az androgének, ösztrogén, glükokortikoid és szteroidhormonok – nagy affinitással kötődnek.

A II. típusú jellemzően kis erővel kötődik ligandjaihoz, és annak hiányában a sejtmagban a DNS „response element”-ekhez kötődve található, többnyire heterodimerizálva retinoid X-receptorral korepresszorok és HDAC társaságában (3. ábra) [17].

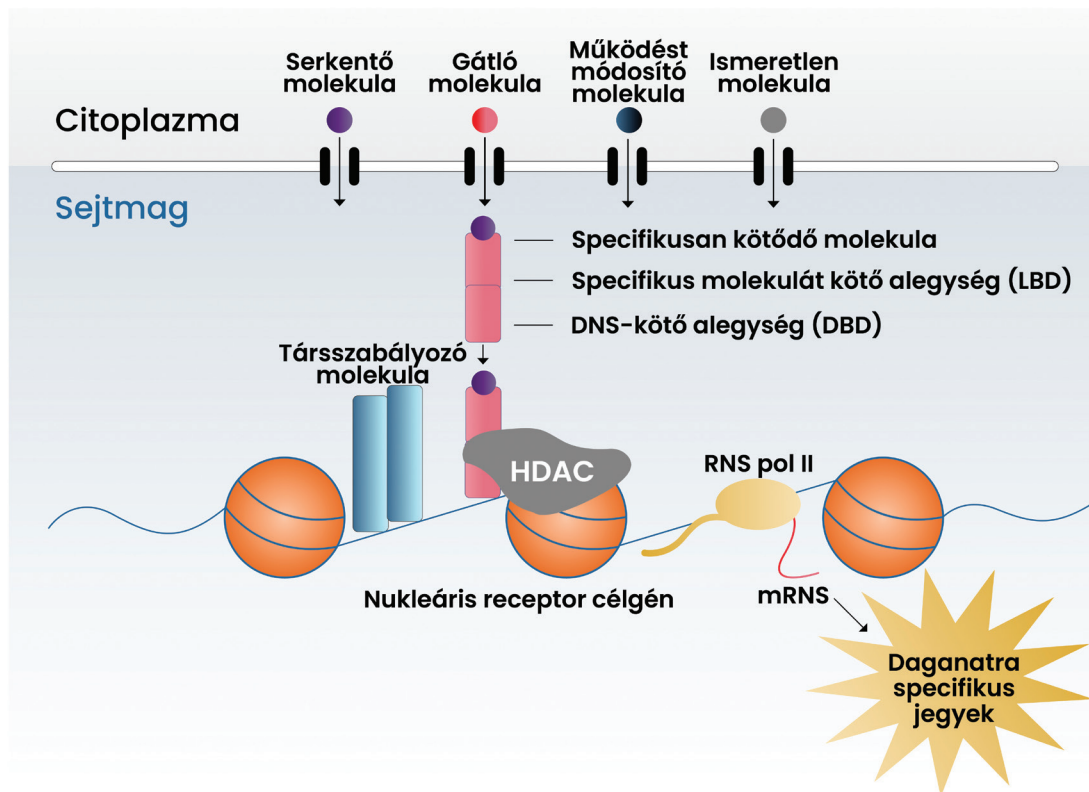
Idetartozik például a pajzsmirigyhormon-receptor, a D-vitamin-receptor és a retinsavreceptor.

A III. és IV. típus az I. típushoz hasonló, de míg az előbbi ismétlő HRE-régiókhoz kötődik, az utóbbi egy HRE-hez, így ez monomerként működik [18].

Az NR-ek a hisztonokhoz hasonlóan számos poszt-transzlációs (fehérjeátíródást követő) szerkezeti változtatáson mehetnek keresztül, mint foszforiláció, acetiláció, ubikvitináció, SUMOiláció és metiláció, melyek révén a receptorok DNS-átíródást szabályozó aktivitása módosul (2/B ábra) [17, 19]. A foszforiláció ligandtól függetlenül is képes aktiválni bizonyos NR-eket, az „orphan”, avagy „árva” receptoroknál azonban, ahol még nem ismerünk semmilyen ligandmolekulát, az aktiváció legfőbb mechanizmusaként ismert [20]. Ubikvitináció ligandkötődéskor figyelhető meg, és a hormonjelátvitel befejezését eredményezheti [21], míg a SUMOiláció a receptor aktivációját csökkenti, és elősegíti a gátlófunkció kialakulását [22].

Ligandok és molekulák

Tudománytörténeti szempontból az NR-ek felfedezése számos esetben a megkötött ligandjaik leírását követően vált lehetővé, így egy ennek megfelelő osztályozásuk is létezik, amely alapján az endokrin, az adaptált és az



3. ábra

A II. típusú nukleáris receptorok általános működési mechanizmusa. A receptor a neki megfelelő DNS-régióhoz kötődve marad HDAC- és szabályozó represszor molekulák társaságában, míg nem kötődik hozzá a ligandja. Annak jelenlétében azonban a HDAC és a represszorokkal való kapcsolata megszűnik, és a génátíródás lehetővé válik.

DNS = dezoxiribonukleinsav; HDAC = hiszton-deacetiláz; mRNS = hírvivő ribonukleinsav

„árva” receptorok csoportjába sorolják őket [18]. Az NR-ek ligand-aktivált/-függő TF-ek. Mivel számos NR-nek még jelenleg sincs ismert, jól meghatározott ligandja, ezeket „árva” receptornak nevezték el. Az NR-ek szerteágazó fiziológiai és fejlődési folyamatot szabályoznak, evégett rengeteg típusú ligandjuk lehet, beleértve a pajzsmirigy- és szteroidhormonokat, az A-vitamint és a koleszterin köztianyagcsere-termékeit is [23–25]. Az NR-ek esetleges hibás működésük révén különféle betegségek kialakulásában játszanak szerepet, ideértve a daganatokat, a diabetest, az atherosclerosist, a gyulladós eredetű, endokrin, illetve nemi szerveket érintő megbetegedéseket [23].

A legismertebb ligandok közé tartoznak a szteroidhormon vázú androgének és az ösztrogén, valamint a D-vitamin és a pajzsmirigyhormon tiroxin.

NETózis – a kromatin átalakulásának speciális típusa

A NETózis hivatalosan az a folyamat, amikor a neutrophil granulocyták úgynevezett neutrophil külső csapdát (neutrophil extracellular trap – NET) bocsátanak ki, hogy semlegesítsék a kórokozókat. A NET-et letekeredett kromatinállomány képezi, amely kb. 200 nm méretű lyukakkal ellátott hálószerű DNS-szerkezet. Ezen hisztonok, mikrobákat inaktíváló, illetve sejtplazmafehérjék vannak kihorgonyozva [26]. A NETózis két alapvetően különböző formáját írták le eddig. Az egyiket klasszikus, vagy öngyilkos típusnak nevezik, és a sejt halálával végződik [27]. A másik típus megtartja a sejt életképességét az effektor funkcióival együtt. Ez utóbbi nem csak neutrophil immunsejtekénél, hanem más sejttípusok eukaryotáknál és növényeknél is ismert. Ezek a sejtek képesek a letekeredett kromatint védekezésére használni [26]. A NETózis fő jellemzői: a Ca-függő mitochondriális ROS termelődése NADPH-oxidáz révén, a hisztonok peptidil-arginin-deamináz-4 (PAD4)-függő citrullinációját, a sejtmaghártya felszakadása és végül pórusformálódás a plazmamembránon, amit a kromatin felszabadulása és NET formálódása követ [27, 28]. Van azonban kutatók, akik úgy gondolják, hogy néhány ezek közül a sajátságok közül más, ettől eltérő, de „NETózist utánzó” folyamathoz tartozik. Ilyen például a leukotoxicus hypercitrullinatio vagy a hibás mitophagia, melyek bár osztoznak hasonló morfológiai változásokban, de eltérő kiváltó okok és biokémiai jelátvitel jellemzi őket [29]. Mivel a NETózisra jellemző molekuláris jelátvitel még nem teljesen tisztázott, számos, feltételezhetően különböző kóroktanú betegséget kapcsolunk ehhez a folyamathoz, mint például rheumatoid arthritis, szisztémás lupus erythematosus [29], diabetes [30], autoimmun és vesebetegségek [31], tumorprogresszió [32], csakúgy, mint a komplementaktiváció és a vérrögképződés [33].

Öregedés és betegségek

A természet hiányos ismerete miatt egymásnak látszólag ellentmondó elméletek születtek az öregedés – amely önmagában is nagyon összetett folyamat – forrásáról [34]. Ebben a szakaszban mi az epigenetikai változások szemszögéből jellemezzük az öregedést.

Az életkor előrehaladtával a génátíródást szabályozó molekulahálózat folyamatosan változik, befolyásolva a sejtek és szövetek működését, és „öregedő” fenotípusban, bizonyos esetekben betegségekben nyilvánul meg [35]. A génszabályozás a sejtek önazonosságának meghatározó eleme, ami jól meghatározott, életkorra jellemző sajátságok és állapotok, differenciáltsági fok, új és/vagy nemre jellemző szöveti tulajdonságok kialakításának az alapja [36].

A génátíródás fejlődési mintázata azonban nemcsak a szövetspecifikus TF-ek és a kromatinon található epigenetikai jegyek jelenlététől vagy azok hiányától függ, hanem a nukleoszómát átrendező fehérjekomplexek alegység-összetételétől is. A különböző sejtek például azonos alegységeket tartalmaznak a BAF-molekulakomplex „központi komplex”-ében (például BRG1, aktin, BAF53, BAF45, BAF47, BAF57), de a további alegységek (például BAF170, BAF60C) már sejt- és állapotfüggők, így sejtenként eltérnek egymástól [1].

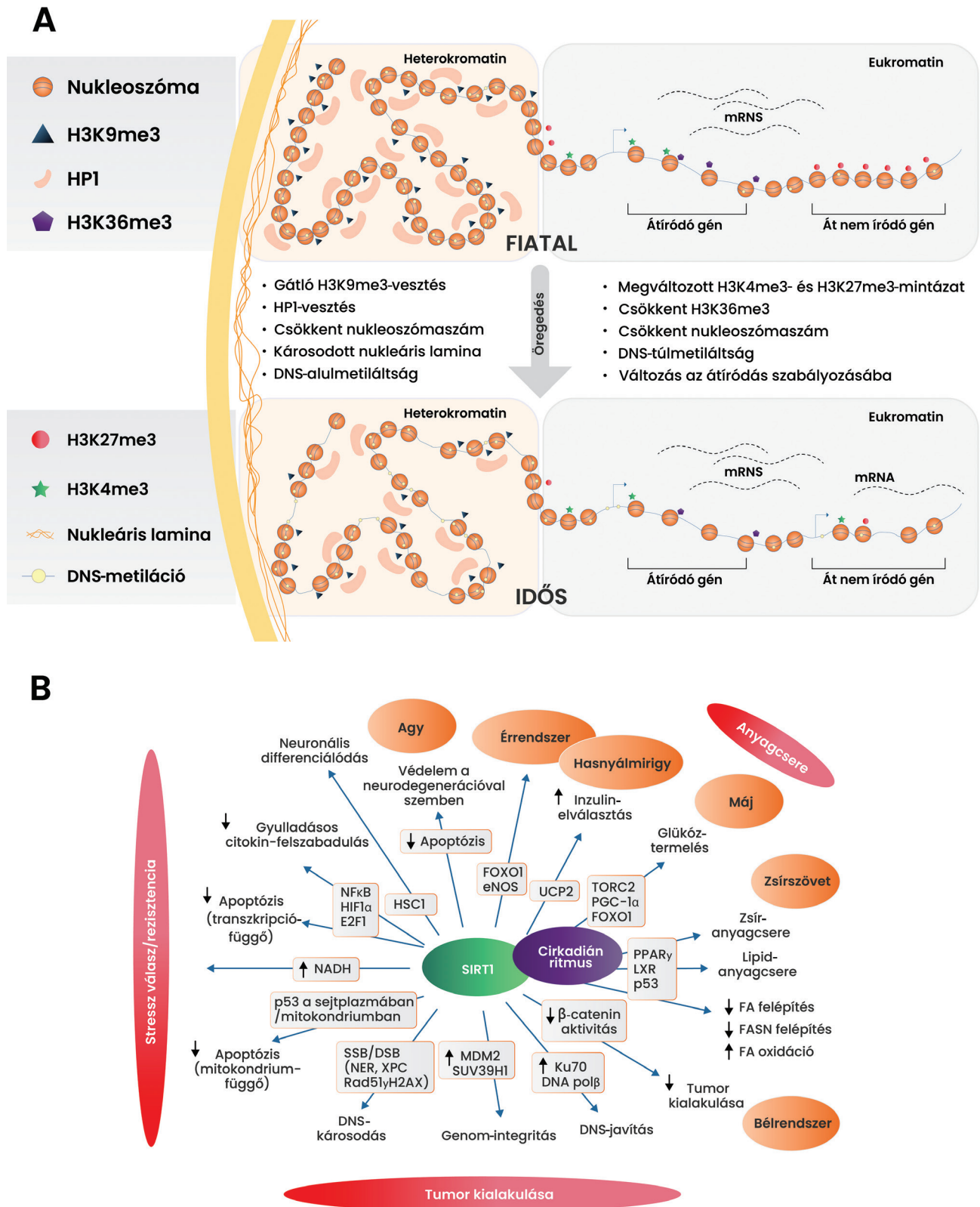
Továbbá fontos azt is megemlíteni, épp az öregedés folyamatának befolyásolhatósága szempontjából, hogy a génátíródást szabályozó és a kromatint módosító molekulák nemcsak a sejten belülről, hanem kívülről érkező jeleket is kapnak, melyek révén képesek megváltoztatni az éppen aktuálisan kialakuló sejtválaszt [36].

Az epigenetikai változások az öregedés korai szakaszában jelennek meg, kromatinmarkerei az életkor előrehaladtával folyamatos változást mutatnak, és megmaradnak a sejtosztódást követően is, így életkorhoz kötött „memória”-ként működnek, megfelelően vagy éppen hibásan [36].

Az öregedés „heterokromatin-vesztéses modellje” a kromatinszerkezet teljes körű változásával számol az öregedés során (4/A ábra) [36], aminek oka, hogy a gátlás alól felszabaduló, korábban elnémított gének rendellenes génátíródást tesznek lehetővé az NR-ek/TF-ek kötődése által.

Ezt támasztja alá az a tény is – számos egyéb hisztonmarker megváltozásával együtt –, hogy a H3K9me3 trimetilációja nagymértékben csökken, ez pedig a DNS-hiszton szorosabb kapcsolatát indukálva a heterokromatin szerkezetét lenne hivatott fenntartani [37]. A heterokromatin sokkal kevésbé érzékeny az oxidatív stressz és a gyök indukálta DNS-törésekre, így ez a szerkezeti (konformációs) állapot része az oxidatív DNS-károsodásokkal szembeni sejtvédekezésnek is [38].

A „Horváth-óra” például a genomiai CpG-szigetek metilációjának teljes körű csökkenését feltételezi mint legfontosabb eseményt az öregedés során, és ígéretes molekuláris markereket kínál az öregedés és az élethossz



4. ábra

A kromatin állapotának változásai az életkor előrehaladtával és a változás okai, szabályozói. A) Az öregedés hatása a kromatin szerkezetére. *Felső rész:* A hetero- és eukromatin szerkezeti jellemzőit mutatja fiatalkorban. A kromatint védő HP1 megfelelő mennyiségben van jelen, illetve az átíró és át nem író gének megfelelő epigenetikai jelekkel ellátottak. *Alsó rész:* A hetero- és eukromatin szerkezeti jellemzőit mutatja időskorban. A HP1 fehérje mennyisége csökkent, illetve nem szükséges gének is átírásra kerülnek. B) A SIRT1 epigenetikai szabályozásának területei. A szirtuin-1 fehérje a circadián ritmussal összhangban fejti ki hatását a szervezet anyagcseréjére, pozitívan befolyásolja a stresszre adott választ, és elősegíti a genetikai állomány integritását és a károsodott részek javítását.

DNS = dezoxiribonukleinsav; mRNS = hírvívó ribonukleinsav; SIRT1 = szirtuin-1

előrejelzéséhez [39]. Horváth a 2013-as és ennek 2015-ös helyesbítő cikkében 353 olyan CpG-szigetet ír le, melyek „öregedési órát” alkotnak a kromatin állapotának, illetve szöveti különbségeknek a jellemzésére [40, 41]. Másként epigenetikai órának is hívják, mert olyan biológiai mechanizmusok összessége, melyek életkorhoz kötött DNS-metilációs változásokat idéznek elő. Az öregedés epigenetikai óra szerinti megközelítésében a biológiai kor csak nemkívánt következménye a fejlődésnek és a szervezet működésének fenntartásához nélkülözhetetlen folyamatoknak, melyek „molekuláris lábnyomai” a DNS „metiláltsági korának” becslését teszik lehetővé [42].

Mindazonáltal nemcsak a dokkoló régiók hozzáférhetősége, az NR-ek/TF-ek fehérjére történő átíródása, illetve a megfelelő régiókhoz kötődésének lehetősége változik az életkor előrehaladtával, hanem az ezeket szabályozó molekulák átíródása, elérhetősége is.

40 éves kortól az androgéneknek és származékaiknak, az ösztrogéneknek is folyamatosan csökken a szérumszintjük. Ahogy korábban már említettük, ezeknek a hormonoknak központi szerep jut számos fiziológiai folyamatban, így nem meglepő, ha csökkent mennyiségük a szervezet megváltozott működését, hiányállapotokat (például osteoporosis, izom- és csonttömegvesztés) vagy éppen életkorhoz kötött betegségeket okozhat. Ez utóbbiak – mint például a cardiovascularis megbetegedések, daganatok, Alzheimer- és Parkinson-kór – az idős emberekben az életkor növekedésével együtt járó alacsony fokú szisztémás gyulladásból eredeztethetők [43, 44]. Az öregedő bőrben a 7-dehidrokoleszterin-koncentráció és a D₃-elóvitamin képződési folyamata is csökkent mértékű, az 1,25(OH)₂D vesében történő csökkent képződéséhez hasonlóan, aminek oka a vese életkorral járó funkciócsökkenése.

Számos eszköz és próbálkozás van az életkorral összefüggő betegségek kezelésére, amint a klinikai tünetek megjelennek, vagy éppen a már meglévő tünetek romlásának lassítására. A fentiek ismeretében azonban egyértelmű, hogy léteznek meglévő, így közegészségügyi és orvosi szempontból hasznosítható összefüggések az epigenetikai szabályozás, az életkor, valamint az ezekkel összefüggő betegségek természetes megelőzése között.

A megfelelő táplálkozás (beleértve a kalóriamegyvonást is) [45], fizikai aktivitási szint [46], pozitív érzelmi beállítódás és állapot [47] képes újrahangolni a szervezet homeosztázisát epigenetikai szinten, amiben a szirtuin-1-nek (SIRT1), a HDAC-molekulacsalád egyik tagjának fontos szerepe van a metabolikus és sejtszintű folyamatokban való kulcsfontosságú feladatai révén (4/B ábra) [48]. Az összes fent említett életmód megfelelő formája növeli a SIRT1 szintjét a szervezetben, hatására kedvezően változnak a gyulladással és stresszmarkerek szintjei, így a kiegyensúlyozott epigenetikai szabályozást segíti elő megőrzött egészséges élethosszal együtt [36, 45].

A fent említett végpontok egyértelmű képet adnak a szervezet aktuális egészségi állapotáról, azonban az epigenetikai jelek mérésével, feltételezhetően akár szűrések formájában is, előre tudnánk jelezni későbbi betegségek rizikóját, kialakulásának esélyét, amennyiben nem történik változás a külső körülményekben vagy szokásokban.

Mivel krónikus betegségek a nem megfelelő epigenetikai változások tartós fennmaradása esetén alakulhatnak ki, időben történő beavatkozással, áthangolással e betegségek jelentős része megelőzhető, illetve részben vagy egészben valószínűleg visszafordítható lehetne.

Az epigenetikai változások kimutatásának módszertani lehetőségei

A hagyományos technikák mellett – mint ELISA, immunhisztokémia, Western-blot, immunprecipitáció, ko-immunprecipitáció –, melyek jól használhatók célzott kérdések megválaszolására az epigenetikai változások vizsgálatában, számos új módszertani megoldás is születik napjainkban. Ezek közé tartozik, a teljesség igénye nélkül, például a kromatin-immunprecipitáció (ChIP) [49], a nyitott kromatinrészek feltérképezése a „single cell” ATAC-seq-módszerrel [50], a laminához kapcsolt domének (LAD) vizsgálata [51] vagy a DNS-metiláltsági szintek és kapcsoltan a génátíródás, a transzkriptom vizsgálata újgenerációs szekvenálási lehetőségek révén [52, 53].

A ChIP a hisztonmódosítások, valamint a kromatinhoz kötődő szabályozó fehérjék és az általuk szabályozott DNS-szakaszok detektálására alkalmas módszer. Lényege, hogy a DNS-hez társult hisztonok, TF-ek és kofaktorok együtt izolálhatók. Ezt követően a kihálasztott és tisztított DNS-szakaszok különböző további technikákkal, így PCR-rel (ChIP-PCR), szekvenálással (ChIP-Seq) vagy DNS-microarray-vel (ChIP-Chip) meghatározhatók [49].

A „single cell” ATAC-seq-módszerrel lehetővé válik a DNS éppen átíródó régióinak, a nyitott kromatinrégióinak a megismerése, feltérképezése, akár adott fiziológiai állapotoknak megfelelően célzott vizsgálatok keretében. Maga a név az „assay for transposase-accessible chromatin using sequencing” megnevezésből származik, és arra utal, hogy transzpozázokkal történik a nyitott kromatinrészek hasítása. A lehasított nyitott szakaszok a felszaporításukat követően szekvenálással meghatározhatók, és azonosítható, hogy mely DNS-részek vannak éppen eukromatin és így átíródásra kész állapotban [50].

A LAD a kettős sejtmagmembrán belső felszínéhez kapcsoló nukleárislamina- és kromatindomének összessége, mely fontos szerepet játszik az interfázisos kromoszómaszerveződésben, elrendeződésében és a génexpresszió gátlásában is [51]. A nukleáris lamina és a hozzá társult kromatin vizsgálatára a BioID system (proximity-dependent biotin identification) módszerét vagy annak továbbfejlesztett változatait használják. Ennek során egy fúziós fehérjét alkalmaznak, amely biotinizációt indukál

az egymás közelében lévő, laminához kötött fehérjéken, melyek denaturálást követően azután sztreptavidinnel fedett gyöngyökkel izolálhatók és meghatározhatók [54].

A fent említett módszerek megfelelő kutatási eredményekre alapozott diagnosztikai protokollokban alkalmazva az egészség megőrzéséhez és a betegségek előrejelzéséhez járulhatnak hozzá az egészségügyi ellátásban.

Következtetés

Összefoglaló cikkünkben leírtuk a DNS szerkezetváltozásainak eddig ismert folyamatait, a folyamatok létrejöttéhez szükséges epigenetikai változásokat, módosításokat a kromatint alkotó DNS-en és a hisztonfehérjéken, melyek markerként szolgálhatnak az életkorhoz kötött betegségek kialakulásának előrejelzésében. Továbbá jellemeztük a folyamatban részt vevő fehérjék, fehérje-komplexek szerepét. Összefoglaltuk a szerkezetváltozás szabályozásában részt vevő receptorok szerkezetét és működését, valamint a kapcsolódó ligandokat és szelektív modulátorokat.

Bemutattuk a NETózis folyamatát, amely a DNS-szerkezet változásának speciális formája, és számos betegség kialakulásában vetették fel kulcsfontosságú szerepét.

Ismertettük az életkorral összefüggő változásokat a kromatin szerkezetében, és részleteztük ennek lehetséges okait, továbbá azt is, hogy milyen, az életkorral összefüggő betegségben játszhatnak szerepet. Kiemeltük, hogy ezen változások milyen környezeti és viselkedési szokásokkal lennének módosíthatók, lehetővé téve az általuk létrehozott betegségek kialakulásának megelőzését.

Összefoglaltuk továbbá, hogy jelenleg milyen módszerek állnak rendelkezésünkre a kromatin epigenetikai változásainak detektálására. Megemlítettük a Horváth-órát is, mely a CpG-szigetek metilációjának mérésével alkalmas az emberi szervezet biológiai, epigenetikai korának megállapítására.

Célunk az volt, hogy körvonalazzuk, milyen lehetőségek állnak rendelkezésre jelenleg ahhoz, hogy az életkorral összefüggő betegségek hátterében álló epigenetikai változások mérésével és diagnosztikájával e betegségeket előre jelezhessük, illetve megfelelő környezeti változások létrehozásával azok kialakulását megelőzzük.

Anyagi támogatás: A közlemény megírása anyagi támogatásban nem részesült.

Szerzői munkamegosztás: N. Zs.: Tervezés, irodalomgyűjtés, a grafika/szemléltetés tervezése, a cikk megírása, javítása, véglegesítése. T. I.: Tervezés, a cikk javítása, véglegesítése. M. B.: Tervezés, irodalomkutatás.

Érdekltségek: A szerzőknek nincsenek érdekltségeik.

Köszönetnyilvánítás

Köszönjük *Varga Dávid* multimédia-designernek az ábrák elkészítésében nyújtott segítségét.

Irodalom

- [1] Becker PB, Workman JL. Nucleosome remodeling and epigenetics. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013; 5: a017905.
- [2] Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res.* 2008; 25: 2097–2116. Erratum: *Pharm Res.* 2008; 25: 2200.
- [3] Caliri AW, Caceres A, Tommasi S, et al. Hypomethylation of LINE-1 repeat elements and global loss of DNA hydroxymethylation in vapers and smokers. *Epigenetics* 2020; 15: 816–829.
- [4] Chung CJ, Chang CH, Liou SH, et al. Relationships among DNA hypomethylation, Cd, and Pb exposure and risk of cigarette smoking-related urothelial carcinoma. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2017; 316: 107–113.
- [5] Folle GA, Di Tomaso MV, Lafon-Hughes L, et al. Nuclear architecture, chromosome aberrations, and genetic damage. In: Yurov YB, Vorsanova SG, Iourov IY. (eds.) *Human interphase chromosomes.* Springer, New York, NY, 2013; pp. 35–51.
- [6] Imperiali B. Lecture 9: Chromatin remodeling and splicing. In: *Introductory biology.* MIT Open Course Ware, 2018 Fall. Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=Chv8dlBVXpw> [accessed: 6 Sept, 2021].
- [7] Glasgow GG-Uo. An introduction to histon modifications & gene transcription roles. In: *Epigenetics & chromatin states.* Genomics Gurus, 2020 Apr 29. Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=0dOFzY3VJY> [accessed: 6 Sept, 2021].
- [8] arpan AbW. Nucleosome remodelling complex/Introduction. In: *Nucleosome remodelling complex.* Animated biology With arpan, 2019 Oct 17. Available from: https://www.youtube.com/watch?v=An9WkN4_Hbk [accessed: 6 Sept, 2021].
- [9] Nyitray L. Reversible covalent regulation of protein functions. [A fehérjeműködés reverzibilis kovalens szabályozása.] In: Nyitray L, Pál G. *Basic elements of biochemistry and molecular biology. [A biokémia és molekuláris biológia alapjai.]* Digitális Tankönyvtár, Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest, 2013; pp. 453–458.
- [10] Bowman GD, Deindl S. Remodeling the genome with DNA twists. *Science* 2019; 366(6461): 35–36.
- [11] Piquet S, Le Parc F, Bai SK, et al. The histone chaperone FACT coordinates H2A.X-dependent signaling and repair of DNA damage. *Mol Cell* 2018; 72: 888–901.e7.
- [12] arpan AbW. SWF/SNF nucleosome remodelling complex. In: *Nucleosome remodelling complex.* Animated biology With arpan, 2019 Oct 18. Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=G1KPBQBIKWE> [accessed: 6 Sept, 2021].
- [13] Alfert A, Moreno N, Kerl K. The BAF complex in development and disease. *Epigenetics Chromatin* 2019; 12: 19.
- [14] Hombach S, Kretz M. Non-coding RNAs: classification, biology and functioning. In: Slaby O, Calin G. (eds.) *Non-coding RNAs in colorectal cancer.* *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 937. Springer, Cham, 2016.
- [15] Rinn JL, Chang HY. Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu Rev Biochem.* 2012; 81: 145–166.
- [16] Kronenberger T, Keminer O, Wrenger C, et al. Nuclear receptor modulators – current approaches and future perspectives. In: Vallisuta O, Olimat S. (eds.) *Drug discovery and development – From molecules to medicine.* Chapter 5. IntechOpen, London, 2015.

- [17] Sever R, Glass CK. Signaling by nuclear receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013; 5: a016709.
- [18] NuRCaMeIn. Classification of nuclear receptors. Available from: <http://www.ub.edu/nurcainein/nuclear-receptors/classification-of-nuclear-receptors/> [accessed: 6 Sept, 2021].
- [19] NuRCaMeIn. All that activates is not a ligand. Available from: <http://www.ub.edu/nurcainein/nuclear-receptors/all-that-activates-is-not-a-ligand-2/> [accessed: 6 Sept, 2021].
- [20] Berrabah W, Aumercier P, Lefebvre P, et al. Control of nuclear receptor activities in metabolism by post-translational modifications. *FEBS Lett.* 2011; 585: 1640–1650.
- [21] Lee JH, Lee MJ. Emerging roles of the ubiquitin-proteasome system in the steroid receptor signaling. *Arch Pharm Res.* 2012; 35: 397–407.
- [22] Treuter E, Venticlef N. Transcriptional control of metabolic and inflammatory pathways by nuclear receptor SUMOylation. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812: 909–918.
- [23] Burris TP, Solt LA, Wang Y, et al. Nuclear receptors and their selective pharmacologic modulators. *Pharmacol Rev.* 2013; 65: 710–778.
- [24] Gronemeyer H, Gustafsson JÅ, Laudet V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov.* 2004; 3: 950–964.
- [25] Zhao L, Zhou S, Gustafsson JÅ. Nuclear receptors: recent drug discovery for cancer therapies. *Endocr Rev.* 2019; 40: 1207–1249.
- [26] Thiam HR, Wong SL, Wagner DD, et al. Cellular mechanisms of NETosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2020; 36: 191–218.
- [27] Vorobjeva NV, Chernyak BV. NETosis: Molecular mechanisms, role in physiology and pathology. *Biochemistry (Mosc).* 2020; 85: 1178–1190.
- [28] Thiam HR, Wong SL, Qiu R, et al. NETosis proceeds by cytoskeleton and endomembrane disassembly and PAD4-mediated chromatin decondensation and nuclear envelope rupture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020; 117: 7326–7337.
- [29] König MF, Andrade F. A critical reappraisal of neutrophil extracellular traps and NETosis mimics based on differential requirements for protein citrullination. *Front Immunol.* 2016; 7: 461.
- [30] Wong SL, Demers M, Martinod K, et al. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. *Nat Med.* 2015; 21: 815–819.
- [31] Gupta S, Kaplan MJ. The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases. *Nat Rev Nephrol.* 2016; 12: 402–413.
- [32] Demers M, Wagner DD. NETosis: a new factor in tumor progression and cancer-associated thrombosis. *Semin Thromb Hemost.* 2014; 40: 277–283.
- [33] de Bont CM, Boelens WC, Puijn GJ. NETosis, complement, and coagulation: a triangular relationship. *Cell Mol Immunol.* 2019; 16: 19–27.
- [34] Barth E, Sieber P, Stark H, et al. Robustness during aging-molecular biological and physiological aspects. *Cells* 2020; 9: 1862.
- [35] Coppé J, Patil C, Rodier F, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* 2008; 6: 2853–2868.
- [36] Booth LN, Brunet A. The aging epigenome. *Mol Cell.* 2016; 62: 728–744.
- [37] Larson K, Yan SJ, Tsurumi A, et al. Heterochromatin formation promotes longevity and represses ribosomal RNA synthesis. *PLoS Genet.* 2012; 8: e1002473.
- [38] Takata H, Hanafusa T, Mori T, et al. Chromatin compaction protects genomic DNA from radiation damage. *PLoS ONE* 2013; 8: e75622.
- [39] Lee JH, Kim EW, Croteau DL, et al. Heterochromatin: an epigenetic point of view in aging. *Exp Mol Med.* 2020; 52: 1466–1474.
- [40] Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* 2013; 14: R115.
- [41] Horvath S. Erratum to: DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* 2015; 16: 96.
- [42] Horvath S, Raj K. DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nat Rev Genet.* 2018; 19: 371–384.
- [43] Cui J, Shen Y, Li R. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends Mol Med.* 2013; 19: 197–209.
- [44] Horstman AM, Dillon EL, Urban RJ, et al. The role of androgens and estrogens on healthy aging and longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2012; 67: 1140–1152.
- [45] Kitada M, Kume S, Takeda-Watanabe A, et al. Calorie restriction in overweight males ameliorates obesity-related metabolic alterations and cellular adaptations through anti-aging effects, possibly including AMPK and SIRT1 activation. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830: 4820–4827.
- [46] Harridge SD, Lazarus NR. Physical activity, aging, and physiological function. *Physiology (Bethesda)* 2017; 32: 152–161.
- [47] Abe N, Uchida S, Otsuki K, et al. Altered sirtuin deacetylase gene expression in patients with a mood disorder. *J Psychiatr Res.* 2011; 45: 1106–1112.
- [48] Rajendran R, Garva R, Krstic-Demonacos M, et al. Sirtuins: molecular traffic lights in the crossroad of oxidative stress, chromatin remodeling, and transcription. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011: 368276.
- [49] Milne TA, Zhao K, Hess JL. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) for analysis of histone modifications and chromatin-associated proteins. *Methods Mol Biol.* 2009; 538: 409–423.
- [50] Fang R, Preissl S, Li Y, et al. Comprehensive analysis of single cell ATAC-seq data with SnapATAC. *Nat Commun.* 2021; 12: 1337.
- [51] van Steensel B, Belmont AS. Lamina-associated domains: links with chromosome architecture, heterochromatin, and gene repression. *Cell* 2017; 169: 780–791.
- [52] Stueve TR, Marconett CN, Zhou B, et al. The importance of detailed epigenomic profiling of different cell types within organs. *Epigenomics* 2016; 8: 817–829.
- [53] Mutz KO, Heilkenbrinker A, Lönne M, et al. Transcriptome analysis using next-generation sequencing. *Curr Opin Biotechnol.* 2013; 24: 22–30.
- [54] Wong X, Cutler JA, Hoskins VE, et al. Mapping the micro-proteome of the nuclear lamina and lamina-associated domains. *Life Sci Alliance* 2021; 4: e202000774.

(Németh Zsuzsanna dr.,
Budapest, Korányi S. u. 2/a, 1083
e-mail: nemeth.zsuzsanna@med.semmelweis-univ.hu)

(Molnár Béla dr.,
Budapest, Korányi S. u. 2/a, 1083
e-mail: molnar.bela1@med.semmelweis-univ.hu)