

GÉN KÓPIASZÁM ÉS MIKRORNS KÖTŐHELY POLIMORFIZMUSOK VIZSGÁLATA

Doktori értekezés

Dr. Kovács-Nagy Réka

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Rónai Zsolt egyetemi adjunktus, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Patócs Attila egyetemi docens, Ph.D.

Dr. Speer Gábor belgyógyász szakorvos, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kovalszky Ilona egyetemi tanár, D.Sc.

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Hegyi György emeritusz professzor, D.Sc.

Dr. Tretter László egyetemi tanár, D.Sc.

Budapest

2013

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉS JEGYZÉK	5
1 BEVEZETÉS – IRODALMI HÁTTÉR	8
1.1 Kromoszomális régiók kópiaszám variációi	9
1.1.1 A GSK3B gén-régió kópiaszám variációi	10
1.1.2 A glikogén szintáz kináz 3-béta (GSK3β).....	11
1.1.3 Az ismétlődő régió további génjei.....	14
1.1.3.1 NR1I2	14
1.1.3.2 C3orf15.....	15
1.2 Polimorf mikroRNS kötőhelyek	15
1.2.1 A mikroRNS szerepe a transzláció szabályozásában	15
1.2.2 MikroRNS polimorfizmusok.....	18
1.2.3 A SNAP-25 gén.....	21
1.2.3.1 A SNAP-25 szerepe a neurotranszmisszióban.....	21
1.2.3.2 SNAP-25 hiányos állatmodellek	22
1.2.3.3 SNAP-25 lehetséges szerepe pszichiátriai rendellenességekben.....	23
1.2.4 A WFS1 gén és a wolframin fehérje	24
1.2.4.1 A Wolfram szindróma.....	24
1.2.4.2 A WFS1 gén és a wolframin fehérje	24
1.2.4.3 A wolframin fehérje feltételezett funkciói	26
1.2.4.4 A WFS1 gén mutációi és polimorfizmusai	29
1.3 Pszichológiai jellemzők mérése használt kérdőívek	31
2 CÉLKITŰZÉSEK.....	33
3 MÓDSZEREK	34
3.1 Vizsgálatban részt vevő személyek.....	34
3.2 A pszichológiai vizsgálatok során felhasznált kérdőívek	34
3.3 DNS izolálás.....	35
3.4 In silico módszerek.....	35
3.5 CNV mérés valós idejű PCR módszerrel	36
3.5.1 A kópiaszám mérésének elve	36
3.5.2 A C3orf15-NR1I2-GSK3B régió vizsgálata.....	38

3.6	Genotipizálás PCR-RFLP módszerrel.....	39
3.7	Genotipizálás real-time PCR-rel	40
3.8	Haplotipizálás real-time PCR-rel	40
3.9	Haplotípus meghatározása PCR-RFLP-vel.....	41
3.10	Haplotípus frekvenciák becslése.....	41
3.11	Riporter konstrukciók készítése.....	41
3.12	Tranziens transzfekció	45
3.12.1	Transzfekció menete	45
3.12.2	Sejtek begyűjtése, feltárása	45
3.13	Luciferáz és β -galaktozidáz enzimaktivitás mérése.....	46
3.14	RNS izolálás	46
3.15	mRNS mérés	46
3.16	miRNS mérés.....	47
3.17	Statisztikai módszerek	48
4	EREDMÉNYEK.....	49
4.1	Génszámvariációk vizsgálata	49
4.1.1	A GSK3B régió kópiaszám változásának eset-kontroll vizsgálata	49
4.1.2	A változó kópiaszámú szakaszok kiterjedésének vizsgálata	50
4.1.3	A kópiaszámok összehasonlítása különböző mintákban.....	52
4.2	MikroRNS kötőhelyek polimorfizmusainak vizsgálata	53
4.2.1	A SNAP-25 gén mikroRNS kötőhelyének polimorfizmusai.....	54
4.2.1.1	Az rs3746544 és rs1051312 polimorfizmusok genotipizálása.....	54
4.2.1.2	Az rs3746544 és rs1051312 polimorfizmusok haplotipizálása.....	55
4.2.1.3	A G–C haplotípus hiányának igazolása független módszerekkel.....	57
4.2.1.4	A három haplotípus egy reakcióelegyben történő vizsgálata.....	59
4.2.2	A WFS1 gén mikroRNS kötőhelyeinek polimorfizmusai.....	60
4.2.2.1	Az rs1046322 pszichogenetikai asszociáció analízise	60
4.2.2.2	Az rs1046322 funkcionális vizsgálata	66
5	MEGBESZÉLÉS	73
5.1	A GSK3B gén kópiaszám variációi és a bipoláris depresszió	73
5.2	MikroRNS kötőhely polimorfizmusok vizsgálatai	77

5.2.1	Molekuláris haplotipizáló módszerek.....	78
5.2.2	MikroRNS kötőhely polimorfizmusok funkcionális vizsgálata	80
5.2.2.1	A wolframin fehérjeszint transzlációs szabályozásának valószínűsítése.....	80
5.2.2.2	A wolframin fehérjeszint transzlációs szabályozásának feltételezett funkciója	84
6	KÖVETKEZTETÉSEK.....	87
7	ÖSSZEFOGLALÁS	89
8	SUMMARY.....	90
9	IRODALOMJEGYZÉK	91
10	SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	109
11	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	111

Rövidítés jegyzék

ADHD: figyelemhiányos hiperaktivitás (attention deficit hyperactivity disorder)

ANCOVA: Analysis of Covariance

ATF6: Cyclic AMP-dependent transcription factor 6

BiP: 78 kDa glucose-regulated protein homolog

bp: bázispár

BD: bipoláris depresszió

bZIP: basic leucine zipper 1

CaM: kalcium-kalmodulin

cDNS: komplementer DNS

C. elegans: Caenorhabditis elegans

CHOP: C/EBP-homologous protein

cM: centimorgan

CNV: kópiaszám variáció (copy number variation)

C3orf15: chromosome 3 open reading frame 15

dATP: dezoxi-adenozin-trifoszfát

dCTP: dezoxi-citidin-trifoszfát

dGTP: dezoxi-guanozin-trifoszfát

DHFR: dihidrofolát reduktáz

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNS: dezoxi-ribonukleinsav

dNTP: dezoxi-nukleozid-trifoszfát

DTT: dithiotreitol

dTTP: dezoxi-timidin-trifoszfát

EDTA: etilén-diamin-tetraacetát

ER: endoplazmás retikulum

Ero1 α : endoplasmic oxidoreductin-1-like protein

FABP2: fatty acid binding protein 2

GAD: generalizált szorongás

GAPDH: gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz

GRP94: 94 kDa glucose-regulated protein

GSK3B: glikogénszintáz kináz 3béta gén

GSK3 β : glikogénszintáz kináz 3 béta fehérje
HADS: Hospital Anxiety and Depression Scale kérdőív
HIF1 α : hipoxia indukált faktor 1 α
hnRNS: heterogeneous nuclear RNA
HRD1: E3 ubiquitin-protein ligase synoviolin 1
IRE1: serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease = inositol requiring enzyme 1
KO: knock-out
LD: kapcsoltság (linkage disequilibrium)
LFSNH: dominant low-frequency sensorineural hearing loss
MDD: unipoláris major depresszív rendellenesség (major depressive disorder)
MGB: minor groove binding
miRNS: mikroRNS
miRSNP: mikroRNS-ek kötődését befolyásoló SNP-k
MRI: mágneses rezonancia képalkotás (Magnetic Resonance Imaging)
mRNS: hírvivő vagy messenger RNS
ncRNA: nem kódoló RNS-ek (non-coding RNA)
NR1I2: nuclear receptor subfamily 1, group I, member 2
OCD: kényszerbetegség (obsessive-compulsive disorder)
ONPG: orto-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid
PBS: Phosphate Buffered Saline
PTSD: poszttraumás stressz zavar (posttraumatic stress disorder)
PCR: polimeráz lánc reakció (polymerase chain reaction)
PERK: Proline-rich receptor-like protein kinase
pre-miRNS: prekursor miRNS
pri-miRNS: primer mikroRNS
RFLP: restrikciós fragmentum hosszúság polimorfizmus (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RISC: miRNA-RNA induced silencing complex
RNS: ribonukleinsav
SERCA: sarco-endoplazmás retikulum Ca²⁺ ATP-áz
SNAP-25: synaptosomal-associated protein of 25 kDa
SNARE komplex: soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor

SNP: egy pontos nukleotid polimorfizmus (single nucleotide polymorphism)

Stx-1: szintaxin-1

TAE: Tris-acetát-EDTA puffer

UPR: sejtfehérje-válasz (unfolded protein response)

WFS1: wolframin gén

XBP-1: X-box-binding protein 1

3' UTR: a gén 3' nem kódoló szakasza (untranslated region)

5' UTR: a gén 5' nem kódoló szakasza (untranslated region)

1 Bevezetés – Irodalmi háttér

Komplex öröklődésű egy betegség vagy tulajdonság abban az esetben, ha a kialakulásukra öröklött és környezeti tényezők egyaránt hatással vannak. Az emberiséget széles körben érintő népbetegségek, mint például a diabetes mellitus, kardiovaszkuláris megbetegedések, daganatos, neurológiai, pszichiátriai kórképek egyaránt ebbe a csoportba tartoznak. Ezen multifaktoriális kórképek genetikai rizikó faktorai **a polimorfizmusok, azaz olyan DNS szekvenciák, melyek minimum 2 változat (allél) formájában fordulnak elő a populációban.** Ezek közül az egyik (általában a ritkábbik) allél jelenléte növeli a betegség kialakulásának rizikóját.

A polimorfizmusok formai szempontból jelenthetik egyetlen bázis cseréjét, kiesését vagy beékelődését (egypontos nukleotid polimorfizmus, SNP). A molekuláris funkció szempontjából igen érdekesek **a mikroRNS-ek kötődését befolyásoló SNP-k (miRSNP).** Ma már tudjuk, hogy a humán fehérjék transzlációjának legalább 60%-át miRNS-ek (is) szabályozzák. A miRSNP a gén 3' nem kódoló szakaszában (3' UTR) található, allél variánsai fokozhatják vagy csökkenthetik a megfelelő miRNS transzlációra gyakorolt hatását.

Az SNP-ken kívül ismertek olyan genetikai variációk is, melyeknél egy hosszabb (néhánytól néhány száz bázispárig terjedő) szakasz egymás után (tandem), változó számban ismétlődik. Az utóbbi néhány évben derült fény a némileg hasonló, de sokkal nagyobb kiterjedésű **kópiaszám variációkra (copy number variation, CNV).** Ebben az esetben nagy (átlagosan több százezer bázispárt érintő), esetleg több gént magában foglaló szakasz amplifikációjáról, deléciójáról vagy kromoszomális lokalizációjának megváltozásáról van szó. Gének vagy géncsoportok delécióját, amplifikációját régebben súlyos betegségekhez kötötték, kiderült azonban, hogy ilyen variációk nagy számban fordulnak elő egészséges emberekben is. Mégis lehet funkcionális hatásuk, és egyes betegségek rizikófaktoraként szerepelhetnek éppúgy, mint a korábban megismert polimorfizmusok (Ku és mtsai 2010). Mivel a CNV-k a genetikai polimorfizmusok egy viszonylag új csoportját képezik, mérésükkel kapcsolatban számos probléma merül fel.

A jelen dolgozat témája két miRSNP és egy CNV vizsgálatának módszertani kérdései és azok funkcionális hatásának elemzése. **A bemutatásra kerülő, interdiszciplináris pszichogenetikai munkában a fenotípusos jellemzést**

pszichiáterek és pszichológus kollégák végezték. Dolgozatomban az általam végzett molekuláris genetikai munka kapja a hangsúlyt, a fenotípust csupán röviden kívánom összefoglalni.

A nemrég felfedezett miRSNP-k közül a ***SNAP-25* és a wolframin (*WFS1*) gén miRSNP-inek molekuláris genetikai vonatkozásaival, valamint a *WFS1* miRSNP-k és néhány kvantitatívan mérhető pszichológiai jellemző (agresszió, szorongás, depresszió és impulzivitás) összefüggésével** foglalkoztunk részletesen. Ezek a pszichológiai paraméterek nemzetközileg standardizált kérdőíves vizsgálatokkal mérhetők nemcsak klinikai mintákban, hanem kezelésre nem szoruló, egészséges emberekben is.

A pszichiátriai rendellenességekben szenvedők jelentős csoportját adják a major depressziós betegek. Ennek a hangulati rendellenességnek két fő altípusa ismert: (1) az MDD (unipoláris major depresszív rendellenesség), melyre a kiváltó ok nélküli szomorúság, érdeklődésre és öröme való képtelenség, pesszimizmus és öngyilkossággal kapcsolatos gondolatok jellemzők, valamint (2) a BD (bipoláris depresszió), ahol a depressziós szakaszok között hipomán vagy mániás periódusok figyelhetők meg. A mániás szakaszok gyakori jegyei a túlaradó jókedv, vakmerőség, csökkent alvásigény, lobbanékonyág, agresszió. Ikervizsgálatok alapján a depresszió örökölhetősége 60–80%-ra tehető, vagyis a genetikai faktorok jelentősek a kórkép kialakulásában (Johansson és mtsai 2001). A jelen dolgozatban bemutatásra kerülő pszichiátriai-genetikai vizsgálatok fő tárgya a **depresszió (MDD és BD) és a glikogénszintáz kináz 3 béta (*GSK3B*) gén komplex CNV-jének eset–kontroll vizsgálata.**

1.1 Kromoszomális régiók kópiaszám variációi

Az utóbbi években több tanulmány számolt be arról, hogy bizonyos gének, illetve néhány gént magukban foglaló kromoszomális régiók megismétlődhetnek (kópiaszám többlet) illetve részlegesen hiányozhatnak (kettő helyett csak egy példány), s ezen variációk meglepően nagy gyakorisággal fordulnak elő. Ezt a jelenséget kópiaszám variációnak (CNV) nevezték el (Check 2005). 20 személy vizsgálata során 221 ilyen variábilis helyet találtak a genomban, és ezek közül 76 polimorfizmusnak bizonyult

(Sebat és mtsai 2004). Egy másik vizsgálatba 55 személyt vontak be, akik között 255 számbeli variációt találtak, melyekből 102 sorolható a polimorfizmus kategóriába (Iafate és mtsai 2004). A CNV-k kilobázistól megabázisig terjedő DNS szakaszok, melyek deléció, inszerciót vagy duplikációt jelentenek a genomban. Nagy méretükből adódóan sokkal összetettebbek lehetnek, mint egy SNP, megváltozhat általuk az érintett gének expressziója, géneket darabolhatnak fel, fúziós fehérjéket alakíthatnak ki. A Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation>) adatbázis alapján 2011-ig 15963 lókuszon 66741 CNV-t azonosítottak. A CNV-k pontos határvonalairól, előfordulási gyakoriságáról valamint biológiai jelentőségéről azonban máig kevés adat áll rendelkezésre. A humán betegségek hátterében álló szerkezeti variációk tanulmányozása egy új, és nagyon gyorsan fejlődő terület, melynek napjainkban csak a megfelelő technológiai és statisztikai eszközök hiánya szab gátat.

1.1.1 A GSK3B gén-régió kópiaszám variációi

A hármas kromoszóma hosszú karján először egy 165 kb (variation_0035) hosszúságú CNV-t azonosítottak (Iafate és mtsai 2004), mely 3 gént érint (1. ábra): a *C3orf15* 3' részét, az *NR1I2*-t, és a *GSK3B* 3' régióját. Ezt a CNV változatot 39 kontroll személy tesztelése során találták meg 2 emberben (egyik 3 példányban, másik 1 példányban hordozta ezt a szekvenciát, egyik esetben tehát inszerciót, másikban deléció azonosítottak). Később három kisebb terjedelmű kópiaszám variánst is kimutattak, melyek csupán az *NR1I2* gén 5' részét érintik (Variation_6205: 36 emberben 1 deléció; Variation_12326: 36 emberben 1 deléció; Variation_39343: 1 emberben (JD Watson) 1 deléció). Leírtak egy szintén rövid variánst, a variation_98419-t, ami a *GSK3B* gén 7. intronjának 1,41 kb-os szakaszára terhed ki. 2007-ben Lachman munkacsoportja (Lachman és mtsai 2007) szignifikáns asszociációt mutatott ki a CNV előfordulása és a bipoláris depresszió rizikója között az *NR1I2* régiót tesztelve, mely megfelelhet a hosszabb és az egyik rövidebb variánsnak is. Ezt az összefüggést 2010-ben (Saus és mtsai 2010) nem tudták megismételni, bár találtak kópia többletet és hiányt, ezek előfordulási gyakorisága nem különbözött szignifikánsan a kontroll és a beteg (unipoláris és bipoláris depressziósok) csoportja között. Az ellentmondás magyarázatára a szerzők feltételezik, hogy nem ugyanazt a kópia variánst méri a két vizsgálat. Saus

munkacsoportjának próbája a *GSK3B* régiójával volt komplementer, tehát csak a leghosszabb variánst méri – amennyiben kizárólag ezek a kópia-variánsok léteznek.



1. ábra: A vizsgált régió génjei. A három gént a három nyíl reprezentálja, az exonokat függőleges vonalak jelzik. A nyilak irányultsága a gének 5'-3' irányát jelentik. C3orf15: chromosome 3 open reading frame 15, NR1I2: nuclear receptor subfamily 1, group I, member 2, GSK3B: glikogén szintáz kináz 3- β .

A három génnel kapcsolatos jelenlegi ismereteink alapján valószínűsíthető, hogy az agyi folyamatok vonatkozásában főleg a *GSK3B* gén kópiaszám változásának lehet közvetlen funkcionális hatása.

1.1.2 A glikogén szintáz kináz 3-béta (*GSK3 β*)

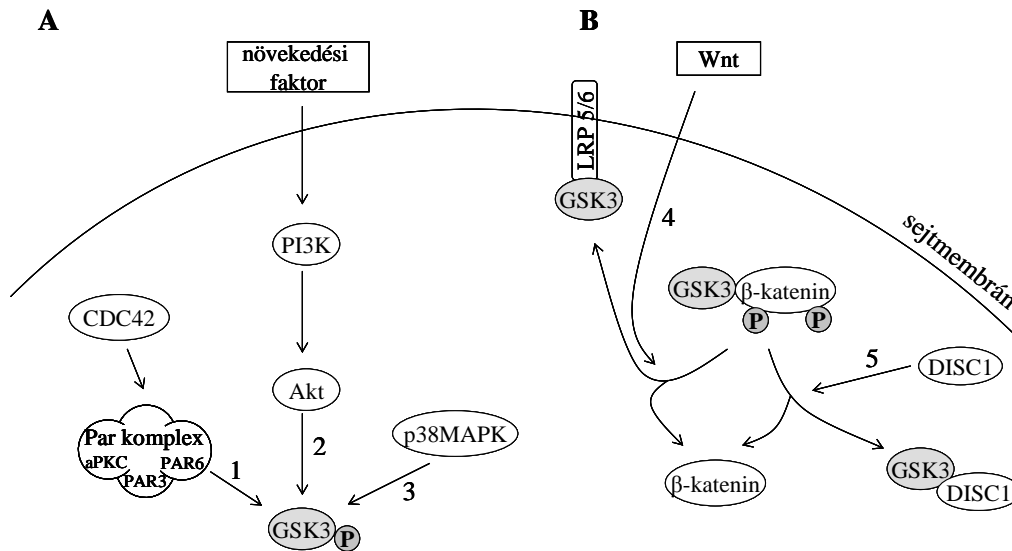
A glikogén szintáz kináz-3 (*GSK3*) egy szerin / treonin kináz, mely széles szubsztrát specifitása folytán sokféle biológiai folyamatban és számos betegség patomechanizmusában szerepel, például a diabetes-ben és az Alzheimer-kórban. Nevét onnan kapta, hogy a glikogén szintáz foszforilálójaként és ezáltal inaktiválójaként azonosították. Ugyanakkor hamar világossá vált, hogy számos más jelpálya szubsztrátját is szabályozza, melyek közül a legtöbbet a inzulin/növekedési faktor és a Wnt útvonalakra való hatásairól tudunk. Érdekes módon – a legtöbb protein kinázzal ellentétben – a *GSK3* nyugvó sejtekben működik, és a sejt aktivációja az enzim gátlásához vezet, vagyis a *GSK3* működésének szabályozása elsősorban a foszforilációs aktivitás gátlásán alapul (Zhao és Townsend 2009). A fehérjének két izoformája ismert (*GSK3 α* és *GSK3 β*), melyek aminosavsorrendje nagy mértékben hasonlít, de a két enzimet különböző gének (*GSK3A* és *GSK3B*) kódolják. A két izoforma kináz doménje 96%-ban azonos, a legszembetűnőbb szerkezeti eltérés az, hogy az α -izoforma N-terminális vége egy glicin gazdag régiót tartalmaz (Doble és Woodgett 2003). Mindkét változat inaktiválható többféle protein kinázzal (PK-A, PK-B és PK-C), a *GSK3 β* esetében a 9-es szerin (S9), a *GSK3 α* fehérjén pedig a S21 foszforilálódik. Ezen túlmenően kimutatták a *GSK3* tirozinon történő autofoszforilációját is (*GSK α* : Y279; *GSK β* : Y216), mely aktiválódáshoz vezet. A foszforilációval történő

szerkezetváltozások modelljeit pár éve publikálták (Buch és mtsai 2010). Újabban kimutatták azt is, hogy a *GSK3B*-nek két splice variánsa ismert, az általánosan kifejeződő *GSK3 β 1*, és a *GSK3 β 2*. Ez utóbbi egy 13 aminosavból álló inszerciót tartalmaz a kináz doménben, és specifikusan az idegrendszerben expresszálódik elsősorban az agyfejlődés során (Mukai és mtsai 2002). Legújabb adatok alapján úgy tűnik, hogy a *GSK3 β 1* és a *GSK3 β 2* foszforilációval történő inaktiválódása nem mutat különbséget, de eltérések mutathatók ki szubsztrát specifitásukban, ami várható is volt az eltérő kináz doménszerkezet alapján (Soutar és mtsai 2010), az eltérő biológiai hatás ugyanakkor még nem bizonyított.

A *GSK3 β* alapvető szerepet játszik a neuronális fejlődés folyamatában, túlműködése rizikófaktora lehet a szkizofréniának (Emamian és mtsai 2004), az Alzheimer-kórnak (Van Wauwe és Haefner 2003), a figyelem hiányos hiperaktivitási zavarnak és a bipoláris depresszióknak (Gould és mtsai 2004). A központi idegrendszerben a GSK3 mindkét izoformája többféle jelpálya aktiválódásának hatására foszforilálódhat a szerin oldalláncon, mely a kináz inaktivációját eredményezi. Ezek közül az egyik legfontosabb a növekedési faktor / receptor tirozin kináz / foszfatidil inozitol 3-kináz (PI3K) jelpálya során aktiválódó Akt fehérjék által történő foszforiláció. Ezen jelpálya mellett a Par komplex is képes foszforilálni a GSK3-at a CDC42 (cell division control protein 42 homologue) hatására, valamint a p38MAPK (p38 mitogén-aktivált protein kináz) is képes foszforilálni a *GSK3 β* izoformát. A másik, sokat tanulmányozott mechanizmus a Wnt / β -katenin jelpálya, ahol a GSK3 foszforilálja, és így a degradációs útvonalra tereli a β -katenint. Wnt jelenlétében megszűnik ez a hatás, mivel a Wnt bekapcsolódása indukálja a GSK3 és a membránban található LRP5/6 (low-density-lipoprotein-receptor-related protein 5/6) kapcsolódását, ami egyúttal a GSK3 leválását eredményezi a β -kateninről (Doble és Woodgett 2003, Hur és Zhou 2010). Hasonló módon fehérje-fehérje interakció útján hat a DISC1 (disrupted in schizophrenia 1) is, ami kötni képes a GSK3-at, és ez által a β -katenin felszabadul a gátlás alól. (Doble és Woodgett 2003, Hur és Zhou 2010) (2. ábra).

Több kutatási eredmény támasztja alá, hogy a GSK3 aktiválódásának megfelelő egyensúlya fontos az idegrendszer működése szempontjából. A vizsgálatok egyik iránya a GSK3 hiperaktivitás és az Alzheimer-kór kialakulásának összefüggésére mutatott rá. Kimutatták, hogy a GSK3 szerepet játszik a tau fehérjék hiperfoszforilációjában és

aggregációjában. Ráadásul, a „szenilis plakkokban” felhalmozódó béta-amiloid peptid oligomerek gátolják az inzulin (növekedési hormon) és a Wnt jelpályák működését, ami a GSK3 aktiválódásához (gátlásának csökkenéséhez) vezet (Hernández és mtsai 2010).



2. ábra. GSK3 szabályozása az idegrendszerben. A: foszforiláció keresztüli szabályozás. (1) CDC42 (cell division control protein 42 homologue) hatására összeáll a Par komplex (aPKC: atípusos protein kináz C, PAR3 és PAR6: partitioning defective complex protein 3 és 6), ami a GSK3 foszforilálódásához vezet. **(2)** Növekedési faktor jelpályán keresztül aktiválódik a PI3K (foszfatidil-inozitol-3 kináz), majd az Akt fehérjék, amik foszforilálják a GSK3-t. **(3)** A p38MAPK (p38 mitogén-aktivált protein kináz) képes foszforilálni a GSK3 β -t (GSK3 α -t nem). **B: fehérje-fehérje kölcsönhatáson alapuló inaktíválás. (4)** A Wnt útvonalon keresztül történő szabályozás alapja, hogy a membránban található LRP5/6 (low-density-lipoprotein-receptor-related protein 5/6) asszociál a GSK3-mal, ami ezáltal leválik a β -kateninről. **(5)** A DISC1 (disrupted in schizophrenia 1) fehérje szintén kötni képes a GSK3-at, és ezáltal gátolja a β -katenin foszforilációját.

Ezeket a hatásokat állatkísérletek is igazolták: A GSK3 β -t túltermelő egerek hippocampus-ában csökkent β -katenin szintet és hiperfoszforilált tau fehérjét, valamint további, az Alzheimer-kórra jellemző biokémiai és sejtszintű változásokat mutattak ki (Lucas és mtsai 2001). A vizsgálatok másik iránya a bipoláris depresszió egyik leghatásosabb gyógyszere, a már 50 éve használatos lítium hatásmechanizmusával függ össze. Bár a lítium semmiképp sem tekinthető a GSK3 specifikus gátlószerének, de *in*

vitro és *in vivo* adatok arra utalnak, hogy a lítium egyik fontos endogén célpontja a GSK3 β . *In vitro* a lítium hatásosan és specifikusan gátolja a GSK3 β aktivitását a terápiában is használt koncentrációban (Klein és Melton 1996). Az is ismert, hogy a lítium terápia aktiválja a Wnt útvonalat egérmodell striátumában feltehetően a GSK3 / β -katenin komplex stabilitásának csökkentése révén, ami fokozódó Akt aktivitással és GSK3 foszforilációval jár együtt (O'Brien és Klein 2009). Ezek az adatok arra utalnak, hogy a GSK3 aktivitás növekedése fontos szerepet játszhat a bipoláris depresszió kialakulásában.

A GSK3B génje a 3. kromoszóma hosszú karján található, 12 exon alkotja (Stambolic és Woodgett 1994). A génben számos SNP fordul elő, melyek egy tanulmány szerint három haploblokkba sorolhatók (Saus és mtsai 2010). Az SNP-k közül az rs6438552 és az rs334558 molekuláris hatásait vizsgálták részletesebben (Kwok és mtsai 2005). Az 5. intronban lévő C/T SNP (rs6438552) megváltoztatja a splicing komplex kötődési helyét, és így megváltozik a 3' irányban lévő exonok kivágódása *in vitro* vizsgálatok alapján. A szerzők megfelelő genotípusú betegek analizálásával ezt a feltételezést *in vivo* is megerősítették, és bizonyítani vélték, hogy a megváltozott GSK3 β emelkedett szintje szubsztrátjának, a tau fehérjének fokozott foszforilációját eredményezi. A gén promoterében lévő -50C/T (rs334558) SNP T allélját tartalmazó promoterről pedig kimutatták *in vitro* rendszerben, hogy nagyobb transzkripciós aktivitással rendelkezik, mint a C változat.

1.1.3 Az ismétlődő régió további génjei

1.1.3.1 NR1I2

Az NR1I2 gén, melyet leggyakrabban pregnán X receptornak (PXR) neveznek (további alternatív nevei: BXR; PAR; PRR; SAR; SXR; ONR1; PAR1; PAR2; PARq) a biotranszformációs rendszer egy fontos komponense. A fehérje egy sejtmagreceptorok családjába tartozó transzkripciós faktor, amely egy ligand-kötő, illetve egy DNS-kötő doménnel rendelkezik, és kitüntetett szerepet játszik a gyógyszer kölcsönhatások szabályozásában. A különböző xenobiotikumokra adott válasz során számos target gént aktivál, köztük a citokróm P450 géncsalád számos tagját (Zhang és mtsai 2008). Az NR1I2 magas expressziós szintjét kimutatták a májban, vastagbélben, valamint a vékonybélben (Lehmann és mtsai 1998), agyi funkciója azonban nem ismert.

1.1.3.2 *C3orf15*

A *C3orf15* (*AMY1*) génről mindezidáig kevés adat áll rendelkezésünkre. Főként a herében expresszálódik a spermatogenezis során, ezért azt gondolják, hogy annak szabályozásában játszik szerepet (Yukitake és mtsai 2002), agyi funkciója nem ismert.

1.2 Polimorf mikroRNS kötőhelyek

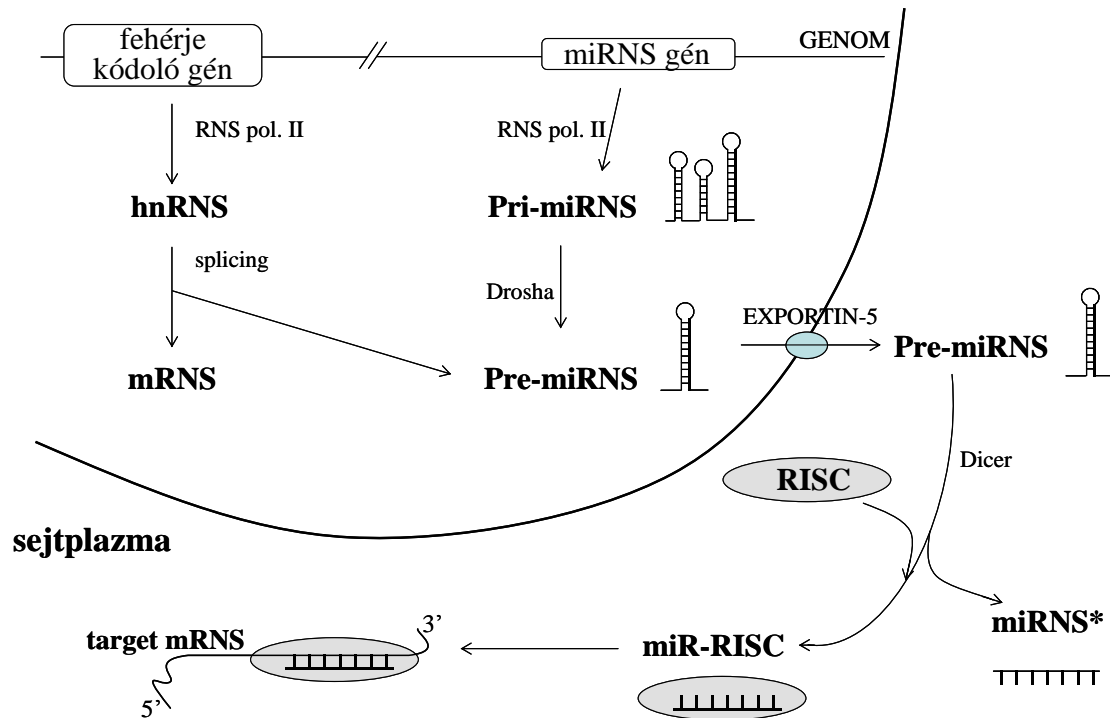
1.2.1 *A mikroRNS szerepe a transláció szabályozásában*

A mikroRNS-ek (miRNS) a kis, nem kódoló RNS-ek (non-coding RNA, ncRNA) családjának legtöbbet vizsgált csoportjába tartoznak, melyeket 1993-ban fedeztek fel *C. elegans*-ban (Lee és mtsai 1993, Wightman és mtsai 1993). Azóta több mint 700 humán miRNS-t azonosítottak (Griffiths-Jones és mtsai 2008), de számítógépes becslések szerint számuk ezernél is magasabb (Berezikov és mtsai 2005). Ezek a mindössze 19–25 nukleotidból álló, az evolúció során erősen konzerválódott RNS-ek (Bartel és Chen 2004) igen fontos szerepet töltenek be olyan alapvető folyamatokban, mint például a sejthalál, a sejt proliferáció vagy a stressz rezisztencia (Ambros 2003). MiRNS-eket kódoló szakaszok – az Y kromoszómát kivéve – minden kromoszómán megtalálhatók, gyakran csoportokban lokalizálódnak. A saját génekkel rendelkező, 50 kb-nál kisebb területen csoportosuló miRNS-eknél közös expressziós mintázatot találtak, ezért valószínűsítették, hogy policisztronos előalakban íródnak át (Chiang és mtsai 2010). A miRNS-eket kódoló genomi régiók másik része az adott miRNS-től független fehérjéket kódoló gének intronjaiban lokalizálódik, és a miRNS a prekursor mRNS splicing-já során keletkeznek. Azt is megfigyelték, hogy a genom „törékeny részein” halmozottan fordulhatnak elő miRNS-eket kódoló szakaszok, valamint számos, daganatokkal asszociáló régióban is találtak miRNS géneket (Calin és Croce 2007, Calin és mtsai 2004).

A miRNS-ek molekuláris funkciójukat tekintve az eukarióta génexpresszió transláció szintű szabályozásában vesznek részt a cél mRNS-ek 3' nem kódoló régiójához (3' UTR) kapcsolódva (Friedman és mtsai 2009). Meg kell azonban jegyezni, hogy újabban találtak olyan eseteket is, ahol a miRNS a mRNS 5' UTR-jéhez, esetleg a kódoló régióhoz kapcsolódott – az ilyen esetekben a megfelelő splicing

gyakran feltétele a miRNS kötődésének (Ryan és mtsai 2010). A miRNS-ek általános biogenezisét a 3. ábra foglalja össze.

sejtmag



3. ábra. A miRNS biogenezise. A miRNS kifejeződéséért felelős régiók fehérje kódoló gének intronjaiban vagy önálló génként fordulnak elő a genomban. A gén átírása mindkét esetben az RNS polimeráz II-vel történik. A miRNS-ek processzálása során az elsődlegesen keletkező pri-miRNS-ből a Drosha enzim lehasítja a pre-miRNS-t, ami az Exportin-5 által transzlokálódik a citoplazmába. Itt a Dicer hatására keletkezik az érett mikroRNS kettős szálú formája (az érett miRNS és a vele komplementer miRNS*). A végső, egyszálú miRNS az RNS indukált csendesítő komplex (RISC) részévé válik, ami a cél mRNA 3' komplementer szakaszához kapcsolódva fejt ki a translációra gyakorolt hatását.

A primer miRNS (pri-miRNS) 500–3000 nukleotidból álló, hajtú konformációkat tartalmazó molekula, mely a transzkripció általános formájának megfelelően az RNS polimeráz II működése révén keletkezik. A pri-miRNS érése során az RNáz III családba tartozó Drosha enzim lehasítja a prekursor miRNS-t (pre-miRNS), ami már csak 60–70 bázis hosszú, és szintén hajtú szerkezetű. Ezt az előalakot az Exportin-5 fehérje transzlokálja a citoplazmába, ahol az RNáz III enzimes család egy

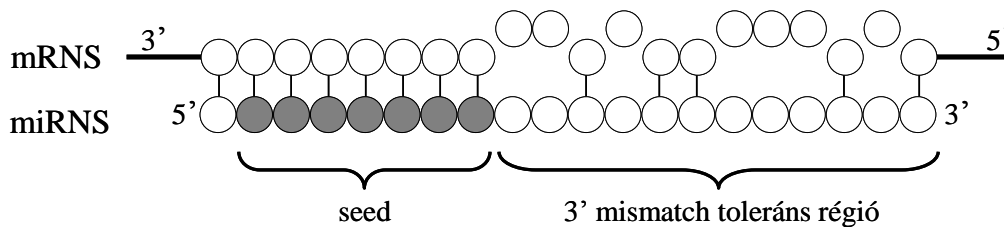
másik tagja, a Dicer hasítja tovább, létrehozva az érett miRNS-t. (Krol és mtsai 2010, Mishra és Bertino 2009). Ennél a lépésnél a miRNS még kettős szálú, a komplementer szálát miRNS*-gal jelölik. A RISC (miRNA-RNA induced silencing complex) nevű ribonukleoprotein komplex azonban már csak az egyszálú miRNS-t köti, míg a miRNS* lebomlik.

Hogy mi különbözteti meg a miRNS „vezérszálát” a csupán vele együtt „utazó” (passanger) miRNS* száltól, az ma még nem világos. Úgy tűnik, általában az 5' kar adja a végső miRNS-t, de az is előfordul, hogy a miRNS* nem csupán melléktermék, hanem bizonyos szövetekben maga is rendelkezhet érett miRNS funkcióval. Például az eger miR-142-5p (5' karról átíródott miRNS) jellemzően expresszálódik a kifejlett egyed agyában és más szövetekben, míg a miR-143-3p (a 3' karról átíródott miRNS) embrionális és újszülött korra jellemző (Chiang és mtsai 2010).

A RISC csendesítő komplex cél mRNS-re való kötődésének feltétele a komplexben található miRNS és a cél mRNS 3' UTR-je közötti Watson-Crick komplementaritás. A kötés kialakulása általában a transzláció gátlását okozza, esetleg a mRNS stabilitását csökkenti. Egyes esetekben azonban előfordul miRNS hatására bekövetkező transzlációs aktiválás is. (Eiring és mtsai 2010, Ørom és mtsai 2008, Vasudevan és Steitz 2007, Vasudevan és mtsai 2007).

Attól függően, hogy mennyire tökéletes a kapcsolat a két RNS között, a transzláció gátlása létrejöhet a mRNS degradációja útján, vagy a mRNS stabilitásától független, egyéb faktorok gátlása révén. A mRNS stabilitás változása miRNS hatására elsősorban növényekre jellemző, illetve akkor jön létre, ha tökéletes a komplementaritás a mRNS 3' UTR és a miRNS teljes szekvenciája között. Emlős sejtekre inkább jellemző a miRNS és a mRNS részleges kapcsolódása, mely legtöbbször a fehérje szintézis közvetlen gátlását okozza (Filipowicz és mtsai 2008). Jelenlegi ismereteink szerint a miRNS transzlációra gyakorolt hatásának kifejtéséhez emlősökben elegendő a 19–22 bp hosszúságú miRNS 5' végétől számított 2–7. pozíciójú bázisok komplementaritása. Ezt a szakaszt ún. seed szekvenciának hívjuk (Lewis és mtsai 2005), míg a miRNS többi részét Mishra és mtsai 3'-mismatch toleráns régióknak (3'-MTR) nevezték el (Mishra és Bertino 2009) (4. ábra). Így lehetséges az, hogy egyetlen miRNS gének széles skáláját képes szabályozni, illetve egy adott mRNS-re több miRNS is hathat. Tovább árnyalja a képet, hogy emlősökben is leírtak olyan eseteket, ahol a miRNS a mRNS stabilitásának

csökkenését okozza. Kimutatták például, hogy – kísérleti körülmények között – a miR-1 és a miR-124 hatására közel 100 mRNS szintje csökkent humán sejtekben (Lim és mtsai 2005). Azt is leírták, hogy a dihidrofolát reduktáz (DHFR) mRNS féléletideje kétszeresére nő, ha kevésbé kötődik hozzá a miR-24. Ez a jelenség egy polimorfizmusnak köszönhető, és feltételezhető, hogy ez az egyik molekuláris mechanizmus, amely a DHFR overexpressziója révén metotrexát rezisztenciához vezet (Mishra és mtsai 2007). Mindezek alapján a miRNS biogeneze és a transzlációs szabályozásában kifejtett hatása egy izgalmas, de részleteiben még nem teljesen tisztázott terület.



4. ábra. Egy érett miRNS felépítése és kapcsolódása a cél mRNS-hez. A miRNS-t és a mRNS egy részét alkotó nukleotidokat a körök jelképezik. A miRNS 5' végén lévő, seed régiót alkotó 7 bázis (szürke) teljes komplementaritása (függőleges vonalak a nukleotidok között) szükséges a cél mRNS-hez való kapcsolódáshoz. A seed régiótól 3' irányban lévő bázisok esetében nem szükséges a teljes komplementaritás, ezért ezt 3' mismatch tolerans régióknak nevezik (távolabb lévő körök).

1.2.2 MikroRNS polimorfizmusok

Mind a mikroRNS-ek képződésének szabályozása, mind a mikroRNS-ek által kifejtett moduláló hatások szervesen hozzátartoznak a sejt homeosztázisához, így ha a miRNS-ek hatáserőssége megnő vagy lecsökken egy adott szövetben, az betegség kialakulásához vezethet. Több tanulmány számolt be arról, hogy daganatos kórképekben lényegesen változik a miRNS-ek expressziós profilja. Megfigyelték például a miR-143- és miR-145-szint csökkenését colorectalis daganatokban (Michael és mtsai 2003), míg Burkitt-lymphoma esetében a miR-155 szint növekedése volt jellemző (Metzler és mtsai 2004).

A miRNS expresszió szintjét, valamint a miRNS és target mRNS közt létrejövő kötés erősségét tovább befolyásolják a miR polimorfizmusok. Ezeket az új típusú funkcionális polimorfizmusokat a következőképpen csoportosíthatjuk:

1. miR polimorfizmusok a miRNS-eket létrehozó fehérjék génjeiben: a miRNS biogenezisben szerepet játszó fehérjék génjeinek kódoló vagy szabályozó régióiban – ezek a variációk a processzált miRNS mennyiségét érinthetik.
2. miR gének epigenetikai szabályozását megváltoztató polimorfizmusok: a miRNS gének – mint minden más gén – hipermetilációval csendesíthetők. Amennyiben megváltozik a gének epigenetikus szabályozása, az hatással van a miRNS termelésének idejére, helyére, aktivitására, így kórosan érintheti a sejtek működését. Az emlőrák kialakulásában több miRNS aberráns hipermetilációját írták le, mely a célgének transzlációs gátlásának hiányához vezet (Lehmann és mtsai 2008).
3. polimorfizmusok a miRNS génjében: Ez a csoport további két alcsoportra bontható, attól függően, hogy a polimorfizmus / mutáció hol helyezkedik el:
 - a. a pri-miRNS és pre-miRNS transzkriptumokban (de nem az érett miRNS-ben),
 - b. az érett miRNS szekvenciában, ezen belül:
 - i. a miRNS kötő régiójában – ezek a változatok létrehozhatnak vagy megszüntethetnek kötőhelyeket,
 - ii. a kötő régió kívüli SNP-k – ezek a variánsok lehetnek semlegesek, de nem kizárt, hogy érintik a miRNS processzállását vagy a targethez való kötődését.

A fenti esetekben a mutáció / polimorfizmus több gén expresszióját is érintheti.

4. polimorfizmusok a miRNS target génjeiben: Ezek olyan polimorfizmusok / mutációk, melyek nem magát a miRNS-t érintik, hanem csupán egyetlen, meghatározott célgént. Ebben az esetben az SNP általában a célgén 3' UTR régiójában van, ezen belül:

- a. a seeddel komplementer kötő régióban,
- b. a kötő régió környékén.

A célgén miRNS kötése a fenti polimorfizmusok / mutációk esetében gyengülhet vagy megszűnhet, illetve új célgén jöhet létre.

Ezen polimorfizmusok közül az 1. és 2. csoportba tartozók kevésbé jól definiálhatók a 3. és 4. csoport tagjaihoz képest, hiszen nagyon átfogó, sok tagot érintő kategóriáról van szó. Hatásuk szerteágazó lehet, mert nem egy konkrét miRNS-t érintenek, így általános zavarok kialakulásához vezethetnek. Ezzel ellentétben, a 3. csoportba tartozó variánsok egy adott miRNS mennyiségét vagy szekvenciáját befolyásolják, illetve a 4. csoport a miRNS cél mRNS-ét, tehát ezekben az esetekben olyan hatások figyelhetők meg, melyek csupán egyetlen miRNS-re, vagy annak egy adott targetjére vonatkoznak. Ha ezek közül a polimorfizmusok közül valamelyik összefüggésbe hozható egy betegséggel, akkor a 3. csoport esetében a miRNS génjének SNP-je asszociál a betegséggel, tehát primer okként a miRNS gén szerepel. A 4. csoport esetében a miRNS csupán másodlagos tényező, az elsődleges ok a cél mRNS-ét kódoló gén megváltozása. A 3. és 4. csoport összehasonlító vizsgálata során Saunders és munkatársai kimutatták, hogy a miRNS gének meglehetősen konzerváltak, míg a célgének 3' UTR-jében gyakrabban fordulnak elő polimorfizmusok. 474 miRNS-t kódoló gént vizsgálva megfigyelték, hogy a polimorfizmusok sűrűsége a miRNS géneiben fele akkora volt (1,3 SNP/kb), mint a célgénekben (2,7 SNP/kb) (Saunders és mtsai 2007). Hasonló eredményt írtak le 2010-ben 325 miRNS gént vizsgálva (Muiños-Gimeno és mtsai 2010).

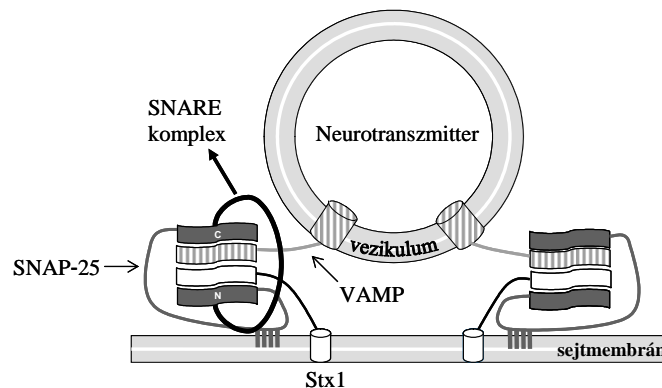
Az SNP-k mellett az utóbbi években a figyelem a nagyobb genomai régiókat érintő CNV-k felé fordult. Ezek a kópia szám polimorfizmusok miRNS gének amplifikációjához, inszerciójához, deléciójához vezethetnek, melyek jelentős fenotípusos változást, adott esetben betegséget okozhatnak. Egy CNV analízis során 230 CNV lókuszbán összesen 5 miRNS gént találtak (Lin és mtsai 2008). Egy teljes genomai vizsgálat során Wong és mtsai azt találták, hogy 14 CNV lókuszból összesen 21 ismert miRNS gént érint (Wong és mtsai 2007). Egy 2009-es tanulmány 380 miRNS génjét vizsgálva összesen 385 lókuszból számol be, melyek a miRNS-t kódoló géneket

magukban foglalják (Duan és mtsai 2009). A miRNS géneket érintő CNV-k hatása változatos lehet, és ma még kevésbé tisztázott.

1.2.3 A SNAP-25 gén

1.2.3.1 A SNAP-25 szerepe a neurotranszmisszióban

A SNAP-25 (synaptosomal-associated protein of 25kDa) fehérje a SNARE komplex (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) egyik alkotója. Ez a komplex elengedhetetlen az intracelluláris vezikulumok sejtmembránhoz való kötődéséhez, valamint a vezikulum és a sejtmembrán fúziójához. A komplexet a SNAP-25 mellet további két fehérje alkotja, a szintaxin-1 (Stx-1) és a szinaptobrevin (VAMP). A SNAP-25 és a szintaxin-1 a preszinaptikus membránhoz kapcsolt fehérjék, a szinaptobrevin a szinaptikus vezikulum membránjában található (5. ábra) (Hayashi és mtsai 1994).



5. ábra. A SNARE komplex szerkezete. A SNARE komplex egymás közelébe hozza a sejtben található vezikulumot a sejtmembránnal. A komplexet alkotó 3 fehérje: SNAP-25 (sötétszürke), szintaxin (Stx-1, fehér) és szinaptobrevin (VAMP, csíkos).

A SNAP-25 központi szerepet játszik a vezikulum dokkolásának szabályozásában. Kimutatták ugyanis, hogy egy feszültség függő kalcium csatornát szabályoz, ami az exocitózis kulcsszignálja (Catterall 1999, Tafoya és mtsai 2008).

A fehérje génje a 20-as kromoszóma rövid karján található, és két alternatív termék íródhat át róla, amelyekről a SNAP-25A és SNAP-25B fehérjék keletkeznek. Ezek egymás homológjai, mindössze kilenc aminosavban térnek el egymástól. A

SNAP-25A az embrionális fejlődés alatt expresszálódik nagy mennyiségben, míg a SNAP-25B a felnőtt korra jellemző forma (Bark és mtsai 2004). A SNAP fehérje családba további két fehérje tartozik, a SNAP-23 és a SNAP-29. A SNAP-23 megközelítőleg 60%-os egyezést mutat a SNAP-25-tel és minden sejtben expresszálódik. Erről a fehérjéről kimutatták, hogy a SNAP-25-höz hasonlóan szerepe van az exocitózisban, míg a SNAP-29 esetében ez nem bizonyított (Salaün és mtsai 2004).

A SNARE fehérjék szerkezetét és funkcióját kiterjedten tanulmányozták. A három, heterotrimert alkotó fehérje közül a SNAP-25 a legnagyobb. Két alfa hélixet tartalmaz és a központi részén egy palmitoil oldallánc segítségével kapcsolódik a preszinaptikus membrán ciszteinben gazdag membrán-interakciós régiójához (Pobbati és mtsai 2006). A szintaxin és a szinaptobrevin C-terminális peptidjeikkel ülnek a preszinaptikus membránban, illetve a vezikulum membránjában és SNARE motívumokon keresztül kapcsolódnak a SNAP-25-höz. Így jön létre egy „négy hélix kötelék”, mely egymáshoz húzza a vezikulumot és a sejtmembránt (Zhang Chen és mtsai 2002).

1.2.3.2 SNAP-25 hiányos állatmodellek

Az utóbbi években sok tanulmány foglalkozott a SNAP-25 fehérje szerepének tisztázásával genetikai szinten. Két állatmodellt hoztak létre a SNAP-25 hiány következményeinek vizsgálatára: a coloboma mutáns egeret és a „blind-drunk” egeret. A coloboma egerek heterozigóta 2-cM-deléciót hordoznak a 2-es kromoszómájukon, mely több gént, köztük a SNAP-25-öt is érinti. (Hess és mtsai 1992). A mutáció következtében 50%-ára csökken a SNAP-25 fehérje expressziója, és az egerek dopamin szekréciója zavart szenved. Az egerek hiperaktivitást és tanulási nehézséget mutatnak, ami miatt a figyelemhiányos hiperaktivitás (ADHD) megfelelő állatmodelljei. Amennyiben az állatokban transzgenikus SNAP-25 fehérjét termeltetnek, helyreáll a dopaminerg neurotranszmisszió és eltűnik a hiperaktív viselkedés (Wilson 2000). Egy újabb tanulmányban a SNAP-25 gén konzervált régiójában található izoleucin-treonin cserét okozó mutációt hordozó egértörzset vizsgáltak. Ezek az ún. „blind-drunk” egerek, amikben a mutáns SNAP-25B fehérje kétszer nagyobb affinitással kötődik a szintaxin-1-hez, mint a vad típus. Az így kialakuló kórosan szoros immobilizáció az exocitotikus vezikulumok körforgásának elégtelenségéhez vezet. Ezek az egerek ataxiát és szenzo-

motoros gátlást mutatnak, amik a szkizofréniában is jelentkező fenotípusos jellemzők (Jeans és mtsai 2007).

1.2.3.3 *SNAP-25 lehetséges szerepe pszichiátriai rendellenességekben*

A SNAP-25 fehérje neurotranszmisszióban betöltött szerepét, valamint a fent leírt állatmodellek fenotípusos jellemzőit ismerve, a fehérjét kódoló gén polimorfizmusait, mint pszichiátriai rendellenességek lehetséges rizikófaktorait, behatóan vizsgálták. A két legtöbbet vizsgált polimorfizmus az rs3746544 („*Mnl* I SNP”-nek is nevezik, a genotipizáláskor használt restriktív enzim alapján) és az rs1051312 („*Dde* I SNP”). Ezek az SNP-k a gén 3' UTR-jének 239. (c.*239T>G) és 243. (c.*243 C>T) nukleotidjait érintik. Barr és munkatársai 97 családban találtak asszociációt az ADHD és az rs3746544 SNP, valamint a két polimorf lókuszt haplotípusa között (Barr és mtsai 2000). Egy másik tanulmányban az rs1051312 variáns mutatott asszociációt a betegséggel ír populációban (Brophy és mtsai 2002). Kim munkacsoportja további polimorfizmusokat is vizsgált, és összefüggést mutatott ki a *SNAP-25* gén és az ADHD között. Eredményeik azt mutatták, hogy azon betegekben, akiknél az ADHD mellett komorbid major depresszió is megjelenik, az asszociáció még erősebb (Kim és mtsai 2007). Asszociáció mutatható ki az ADHD és intronban található polimorfizmusok valamint egy 5' UTR-ben lévő mikroszatellita között is, ami tovább bizonyítja a gén szerepét a betegség hátterében. (Zhang és mtsai 2010). A *SNAP-25* polimorfizmusairól kimutatták, hogy befolyásolják szkizofrén betegek bizonyos endofenotípusait: az rs1051312 TT homozigóta betegek jobb kognitív funkciókkal rendelkeznek. (Spellmann és mtsai 2008).

A SNAP-25-ről igazolták, hogy nem csak az idegrendszerben, hanem inzulint termelő rágszáló sejtvonalban is expresszálódik, és a SNAP-25 gátlása drámaian csökkenti az inzulin szekréciót. (Gonelle-Gispert és mtsai 1999). Ezért nem meglepő, hogy a pszichiátriai rendellenességekben vizsgált polimorfizmusokat összefüggésbe hozták a szkizofrén betegek testtömeg növekedésével (rs1051312) és szérumban triglicerid szintjével (rs8636 and rs3746544) (Musil és mtsai 2008). A 2-es típusú diabetes mellitus állatmodelljében (Goto-Kakizaki patkány) kimutatták, hogy a pancreas β -sejtjeiben szignifikánsan kevesebb SNAP-25 fehérje található, mint a kontroll (Wistar) állatokban (Zhang és mtsai 2002). Munkacsoportunk vizsgálta az rs1051312 polimorfizmust 2-es típusú diabetes mellitus-ban. Szignifikáns asszociációt találtunk az

SNP és a betegség között (Kovács-Nagy és mtsai 2010). Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy a *SNAP-25* génvariánsok ígéretes genetikai markerek lehetnek mind pszichiátriai rendellenességek, mind metabolikus szindróma vagy diabetes mellitus esetében.

1.2.4 A *WFS1* gén és a wolframin fehérje

1.2.4.1 A Wolfram szindróma

Fiatalkori diabetes-hez asszociált kétoldali látóideg sorvadást először 1938-ban írt le Wolfram és Wagener (Wolfram és Wagener 1938), a betegséget Wolfram szindrómának nevezték el. A XX. század második felében rendre jelentek meg további közlemények, melyekben a Wolfram szindrómát gyakran DIDMOAD-ként említik a fő tünetek kezdőbetűire utalva: diabetes insipidus, diabetes mellitus, optikus atrófia és sükettség (deafness). A tünetek alapján sokáig mitokondriális eredetre gondoltak (Bu és Rotter 1993), de a 90-es években több közlemény igazolta, hogy az esetek legnagyobb része autoszomális recesszív öröklésmentet mutat (Collier és mtsai 1996, Polymeropoulos és mtsai 1994).

A Wolfram szindróma egy fiatalkori, nem autoimmun eredetű diabetes-hez társuló progresszív neurodegeneratív betegség. Prevalenciája angol felmérések szerint 1:770000 (Barrett és mtsai 1995), mely alacsonyabb, mint egy korábbi észak-amerikai becslés (1:100000, Fraser és Gunn 1977). Kimenetele igen súlyos, a betegek átlagosan 30 éves korukig meghalnak. MRI vizsgálatok általános agyi atrófiát mutatnak, és a neurológiai tünetekhez gyakran pszichiátriai zavarok is társulnak, mint például a depresszió, memóriazavar, pánik betegség, hallucináció és öngyilkossági kísérlet, melyek gyakran jelentkeznek a hordozók között is (Swift és Swift 2000). Egyes becslések szerint az átlagos populáció közel 1%-a hordoz valamilyen *WFS1* mutációt heterozigóta formában, ugyanakkor a súlyos depresszióval kezelt betegekben ez az arány lényegesen magasabb, eléri a 25%-ot (Swift és Swift 2000).

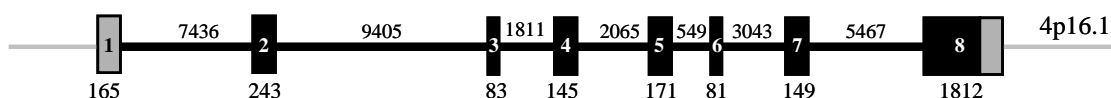
*1.2.4.2 A *WFS1* gén és a wolframin fehérje*

1998-ban Inoue és munkatársai (Inoue és mtsai 1998) pozicionális klónozással azonosították a szindróma kialakulásáért felelős *WFS1* gént, mely a 4p16.1 kromoszomális régióban található. A 8 exonból álló gén (6A. ábra) terjedelme 33,4 kb.

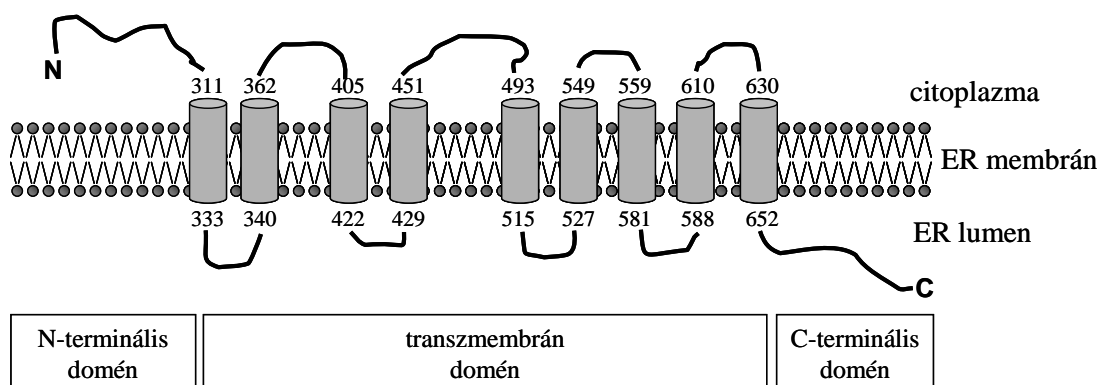
Az első exon nem íródik át, a 3640 bp hosszúságú mRNS 2673 bp kódoló régiót tartalmaz, mely egy 890 aminosavból álló, 100 kDa tömegű fehérje képződéséért felelős.

A wolframin az endoplazmás retikulum (ER) membránjában található. (Strom és mtsai 1998). Három alegysége közül a középső hidrofób domén kilenc transzmembrán régióból áll, amit két hidrophil szakasz szegélyez: a citoplazmába nyúlik a fehérje N-terminális vége, míg a C-terminális rész az ER lumenében található (6B. ábra). A fehérje poszt-transzlációs módosítása során két luminális aszparagin (N661, N746) N-glikozilálódik. Ez a folyamat a fehérje stabilitásának elengedhetetlen feltétele, gátlása a wolframin lebomlását eredményezi. A wolframin aminosav sorrendje konzervált, a humán fehérje 86%-os hasonlóságot mutat az egér (Inoue és mtsai 1998), illetve a patkány wolframinnal (Takeda és mtsai 2001).

A: *WFS1* gén



B: wolframin fehérje



6. ábra. A *WFS1* gén (A) és a wolframin fehérje (B) szerkezete. A: A *WFS1* gén 8 exonból áll (téglalapok), melyek közül az első és a nyolcadik 3' vége fehérjére nem íródik át (szürke téglalap). A számok az exonok ill. intronok hosszát jelzik. B: A szürke hengerek: a wolframin fehérje transzmembrán régiói, számok: az aminosavak pozíciói.

A fehérje jóformán minden szövetben megtalálható, például a pancreas-ban is, ahol kimutatták, hogy míg a szigetsejtekben jelentős mennyiségben fordul elő, addig az exokrin pancreas szövetben elenyésző (Takeda és mtsai 2001). Egérben legnagyobb mennyiségben az agyban, a hasnyálmirigyben, a szívben és az izomban fejeződik ki, míg a májban kevesebb, a vesében és lépben pedig csupán csekély mennyiségű fehérje mutatható ki (Hofmann és mtsai 2003). Az agyi wolframin expresszió részletesebb vizsgálata alapján a fehérje patkány agyban a hippocampus-ban, amygdalában, allocortexben és tuberculum olfactoriumban található a legnagyobb mennyiségben. Glia sejtekben a wolframin nem volt kimutatható. A neuronokban a wolframin eloszlása nem egyenletes, a sejttestben és a proximális dendritekben sokkal nagyobb arányban van jelen, mint az axonvégekben (Hofmann és mtsai 2003).

1.2.4.3 A wolframin fehérje feltételezett funkciói

Wolframin fehérje és az ER stressz

Bár a wolframin funkciója jelenleg még nem tisztázott, több munkacsoport valószínűsítette, hogy a fehérjének központi szerepe lehet az ER stressz szignál transzdukciós útvonalainak negatív visszacsatolásában. Így a wolframin megakadályozhatja a szekréciós sejtek ER stressz okozta apoptózisát. Kimutatták, hogy a thapsigargin, amely gátolja az ER Ca^{2+} -ATP-áz, és így ER stresszt vált ki, indukálja a wolframin fehérjét humán fibroblasztokban és egér β -sejt eredetű MIN6 sejtekben (Li és mtsai 1993). Endogén ER stresszt mutató Akita egerekből nyert inzulinóma sejtekben is megfigyelték mind a mRNS, mind a fehérje szint emelkedését kontroll sejtekhez képest (Ueda és mtsai 2005). Az ER stressz okozta wolframin szint emelkedés – legalábbis részben – transzkripció szintjén zajlik, amit humán *WFS1* promoter-luciferáz riporter gén rendszerrel igazoltak (Ueda és mtsai 2005). Mindezek alapján valószínűsíthető, hogy az ER stressz fokozódása a wolframin fokozott képződéséhez vezet, mely negatív visszacsatolásként működik. A wolframin indukció elmaradása túlzott mértékű ER stresszt és a sejtek pusztulását okozza (Fonseca és mtsai 2009). A wolframin ER stresszben betöltött, konkrét szerepéről azonban még keveset tudunk.

Az úgynevezett sejtfehérje-válasz (UPR = unfolded protein response) az ER stressz egyik részletesen tanulmányozott folyamata. Ez a válasz három fő útvonalon aktiválódhat (IRE1, PERK és ATF6), így az első vizsgálatok azt kívánták tisztázni,

hogy melyik útvonalhoz kapcsolható a wolframin működése. Fonseca munkacsoportja kimutatta (Fonseca és mtsai 2005), hogy míg egészséges egér fibroblasztokban ER stressz indukáló ágensek (pl. thapsigargin) hatására a *WFS1* mRNS és fehérje szint jelentősen emelkedik, *Ire1 α* és *Perk* hiányos sejtekben ez az indukció gátolt, sőt, csökkent fehérjeszint figyelhető meg.

Ugyanezen munkacsoport 2010-ben azt is bebizonyította, hogy az ATF6 útvonal közvetlenül összefügg a wolframin funkciójával. Ko-immunprecipitációs kísérletekkel igazolták ugyanis, hogy a sejt nyugalmi állapotában a wolframin megköti az ER membránban lokalizált ATF6 α -t, valamint az ATF6 α bontását elősegítő HRD1 ligáz, mely az ATF6 proteosomális degradációjához és az UPR válasz gátlásához vezet. A szerzők azt is kimutatták, hogy dithiotreitollal (DTT) indukált ER stressz hatására a wolframin elengedi az ATF6 α -t, illetve a DTT kimosása után néhány órával újra megköti azt. Ismert, hogy az ER membránban található ATF6 α aktiválódásához az N-terminális DNS kötőhelyének (bZIP domén) lehasítása, és a sejtmagba való transzlokációja szükséges. Így a bZIP kapcsolódni tud az ER stressz rezponzív elemeket tartalmazó promoterekhez és ezzel elősegíti az UPR válasz kialakulását (pl. BiP, XBP-1 indukció). A szerzők szerint a wolframin elősegíti az ATF6 α proteosomális degradációját. Az ER stressz során fokozatosan növekvő wolframin szint így megakadályozza az UPR válasz túlaktiválódását. Ezt a feltételezést támasztották alá ugyanebben a munkában azok az eredmények is, melyek szerint *WFS1* KO egér hasnyálmirigyében, valamint Wolfram szindrómás betegek limfocitáiban szabályozatlan ER stressz figyelhető meg, mely magas ATF6 és csökkent HRD1 szinttel jellemezhető. Wolframin overexpresszált sejtekben viszont az ATF6 nem képes szerepét betölteni, és target génjeiről keletkező mRNS-ek (pl. *BiP*, *XBP-1*) szintje alacsonyabb a kontrollhoz képest. Ennek alapján feltételezhető, hogy a wolframin fehérje fontos szerepet tölt be az ER stressz válasz túlműködésének megakadályozásában (Fonseca és mtsai 2010).

Wolframin fehérje és Ca²⁺ homeosztázis

A wolframin fehérje funkciójával kapcsolatban az is felmerült, hogy részt vesz a Ca²⁺ homeosztázis biztosításában is, bár ennek pontos mechanizmusa még tisztázásra vár. *Xenopus* oocytákba injektált wolframin a vártak megfelelően az ER-ben lokalizálódik,

és hatással van a citoplazmatikus Ca^{2+} szintre (Osman és mtsai 2003). Vad típusú wolframint termelő sejtekben szignifikánsan magasabb volt a citoplazma Ca^{2+} koncentrációja a kontroll (wolframint nem expresszáló) és a transzmembrán doménben mutáns (p.R456H) wolframint kifejező sejtekhez képest. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a wolframin vagy az ER valamely kation (kalcium) csatornáját szabályozza, vagy maga a fehérje rendelkezik csatorna aktivitással. Az utóbbi elképzelést valószínűsíti az a tény, hogy a wolframin – más csatornához hasonlóan – homotetramer formában van jelen a membránban (Hofmann és mtsai 2003), de további bizonyítékok egyelőre nem ismertek.

A HEK293 sejtek a wolframin Ca^{2+} szintre gyakorolt hatásának egyszerűsített modelljeként alkalmazhatók, mert nem tartalmaznak feszültség-függő Ca^{2+} csatornát. *WFS1* KO sejtekben a wolframin expresszió gátlása az ER Ca^{2+} koncentrációjának csökkenésével járt, ugyanakkor a fehérje túltermelése szignifikánsan emelte az endoplazmatikus kalcium szintet. Az utóbbi hatás a SERCA (sarco-endoplazmás retikulum Ca^{2+} ATP-áz) Ca^{2+} pumpa gátlása során megszűnt, ami valószínűsíti, hogy a lumenáris Ca^{2+} -szint növekedést a wolframin SERCA pumpától függő módon képes létrehozni. Ugyanakkor a *WFS1* expresszió változása a citoplazmatikus Ca^{2+} szintet is befolyásolta. Mindezek alapján valószínűsíthető, hogy a wolframin a sejt kalcium homeosztázisának szabályozásában szerepel (Takei és mtsai 2006).

WFS1 mutáns egér β -sejtjein is vizsgálható a wolframin intracelluláris kalcium szintet befolyásoló hatása. A glükóz stimulusra kiváltott Ca^{2+} indukálta inzulin szekréció 23%-kal csökkent a *WFS1* hiányos β -sejtekben, amit teljesen helyreállított az adenovírussal bejuttatott wolframin fehérje. A szekréció csökkenés hátterében valóban az intracelluláris Ca^{2+} -szint emelkedés zavara áll, ugyanis a wolframin hiányos β -sejteken 36%-kal alacsonyabb emelkedés mérhető, mint egészséges β -sejtek esetében (Ishihara és mtsai 2004). Ezen kísérletek alátámasztották, hogy a wolframinnak szerepe van a β -sejtek inzulin szekréciójában, amit az intracelluláris Ca^{2+} -szint befolyásolása révén szabályoz.

A képet tovább árnyalja egy új eredmény, miszerint a wolframin egy kalcium-kalmodulin (CaM) kötő fehérje. Patkány agy kivonatból sikerült kimutatni, hogy a wolframin N-terminális (citoplazmatikus) része ekvimoláris mennyiségben képes kötni a kalmodulint Ca^{2+} jelenlétében, vagyis citoplazmatikus kalcium szint-érzékelő funkciót

tölthet be. A Wolfram szindrómát okozó mutációk között három a wolframin kalmodulin kötő régiójában található, melyek a gén konzervált régiójában vannak, így patkányban vizsgálhatók (p.A127T, p.A134T, p.R178P). Kimutatták, hogy mindhárom mutáció megszünteti a fehérje CaM kötő képességét (Yurimoto és mtsai 2009).

1.2.4.4 *A WFS1 gén mutációi és polimorfizmusai*

Napjainkban a *WFS1* gén több mint 130 mutációját azonosították, és hozták összefüggésbe a Wolfram szindrómával (Cryns és mtsai 2003) japán (Inukai és mtsai 2005), kínai (Hong és mtsai 2009), brazil (Gasparin és mtsai 2009), és európai populációkban [olasz: (d'Annunzio és mtsai 2008), francia: (Giuliano és mtsai 2005), spanyol: (Gómez-Zaera és mtsai 2001)]. A mutációk egy része a fehérje teljes kiesését okozza, ami eltérő módon valósulhat meg: kialakulhat nonszensz mutáció, kereteltolódás, splice-mutáció, kereteltolódást nem okozó deléción / inszerción és misszensz mutáció (Khanim és mtsai 2001). Bizonyos mutációk esetében egyáltalán nem keletkezik fehérje, más esetekben pedig a funkció károsodik.

A Wolfram szindróma recesszív öröklésű betegség, de azonosítottak olyan ritka *WFS1* variánsokat is, melyek domináns módon alakítják ki a betegséget (Wolfram syndrome-like disease). A domináns öröklésű kórképek közül az LFSNH (dominant low-frequency sensorineural hearing loss) a legismertebb (Gürtler és mtsai 2005), de leírtak dominánsan öröklődő, siketséggel társuló diabetes mellitust is, melyet a p.E864K mutáció okoz (Valéro és mtsai 2008). Érdekes módon a p.E864K aminosav csere optikus neuropátiával társult siketséggel is járhat (Eiberg és mtsai 2006), de ezt a kórképet okozhatja a p.K836N csere is (Hogewind és mtsai 2010). Mindezek alapján a genotípus-fenotípus összefüggés a mutációk szintjén nem egyértelmű, ehhez a mutációk okozta funkció-változást kellene ismerni. A mutációs spektrum azonban nagyon széles, és egy-egy mutáció mindössze egy vagy néhány beteget érint, vagyis nem találhatók „mutációs forró helyek” a génben. A legtöbb mutáció a legnagyobb, 8. exonban található, de ez csupán ennek kiterjedéséből adódik (Rigoli és mtsai 2010), így a genetikai diagnózis felállításához gyakran a gén teljes szekvenálása szükséges. További komplikációt okoz az a tény is, hogy a betegséget gyakran két vagy több, a *WFS1* gén különböző helyein előforduló, heterozigóta mutáció („compound” heterozigóta) okozza (Khanim és mtsai 2001).

Az ismert mutációk közül igen keveset elemeztek funkcionális szempontból, ami összefügg azzal a ténnyel, hogy a wolframin szerepéről igen keveset tudunk. Így a vizsgálatok nagyrészt a fehérje lokalizációjára és szintjének mérésére vonatkoznak. Az első molekuláris szintű kutatást Hofmann és munkatársai végezték 2003-ban. Amint az várható, a kereteltolódást okozó mutációk (1029insC) esetében nem kaptak mérhető fehérje szintet. Azt is kimutatták, hogy a nonszensz mutáció (p.W371X) hatására létrejövő, a normálisnál rövidebb transzkriptumok hamar lebomlanak, és így nem íródnak át fehérjévé. A p.R629W mutáció esetében pedig a mutáns fehérje stabilitása jelentősen csökken (Hofmann és mtsai 2003). A szintén aminosav cserét okozó másik két mutáció (p.P724L és p.G695V) hatására a wolframin fehérje nem helyeződik ki az ER membránba, hanem aggregátumot képez a lumenben (Fonseca és mtsai 2005). A C-terminális hidrofíli domén szerepét emeli ki az a megfigyelés, hogy ezen a területen – és különösen az utolsó 7 aminosavat érintő misszensz mutáció esetében – szintén súlyos kórkép alakul ki (Hardy és mtsai 1999, Sam és mtsai 2001)

A *WFS1* gén polimorfizmusait eddig kevésbé vizsgálták, de a gén kapcsolata a 2-es típusú diabetes mellitus-szal állatkísérletek alapján erősen valószínűsíthető. *WFS1* hiányos pancreas β -sejt vonalon (Yamada és mtsai 2006) és *WFS1* hiányos egerekben (Ishihara és mtsai 2004) igazolták a fehérje fontosságát a β -sejt tömegének és funkciójának megfelelő kialakulásához. Kimutatták, hogy a *WFS1* mutáns egerekben fele annyi a szigetsejtek mennyisége, mint a kontroll egyedekben (Ishihara és mtsai 2004), továbbá a β -sejtek proliferációja csökkent, és fokozott apoptózis figyelhető meg (Yamada és mtsai 2006). A *WFS1* kiütött β -sejtvonalban a sejtekben megemelkedett az ER-stressz markerek (pl. BiP, CHOP, Ero1 α) szintje (Fonseca és mtsai 2005). A *WFS1* inzulin szekrécióval kapcsolatos szerepére is vannak adatok. Glükóz indukció során a β -sejtek citoplazmatikus kalcium koncentrációja nő, ami inzulin felszabadulást eredményez – ezzel párhuzamosan emelkedik a *WFS1* expressziója is. Ez a növekedés a 2-es típusú diabetes Ob/Ob egér modelljének szigetsejtjeiben szignifikánsan csökken a kontrollhoz képest (Fonseca és mtsai 2005). A glükóz indukálta Ca²⁺ emelkedés zavart szenved *WFS1* hiányos egerekben is, amit csökkent inzulin szekréció kísér (Ishihara és mtsai 2004).

A fent vázolt állatkísérletek mellett humán teljes genom asszociáció analízis (GWAS) (van Hoek és mtsai 2008) és egyéb SNP vizsgálatok (Fawcett és mtsai 2010,

Han és mtsai 2010, Kawamoto és mtsai 2004, Lee és mtsai 2008) szignifikáns asszociációt mutattak a *WFS1* egyes polimorfizmusai és a cukorbetegség előfordulása között. A vizsgált SNP-k egy része intronikus (rs752854, rs4688989, rs5018648, rs10010131, rs13101355, rs7672995, rs6446482), vagy a 3' UTR-ben található (rs1046320), de vizsgáltak aminosav cserét okozó polimorfizmust (rs734312) is. Az utóbbi a 8. exonban található és a p.H611R aminosav cserét okozza. Ez a *WFS1* gén leggyakrabban vizsgált polimorfizmusa, melynek szerepe a diabetes mellitus mellett pszichiátriai kórképek vonatkozásában is felmerült, de funkcionális hatásáról ez idáig nem számoltak be.

Az SNP allélvariánsai összefüggést mutattak bipoláris, illetve a major depresszió előfordulásával (Koido és mtsai 2005), valamint öngyilkossági kísérletek vizsgálata során is kimutatható az asszociáció (Must és mtsai 2009, Sequeira és mtsai 2003). Ezen példák is igazolják, hogy a wolframinnak szerepe van neuropszichiátriai kórképek kialakulásában, de a pontos mechanizmus nem ismert. Egy 2008-as tanulmány az ER stressz szerepét vizsgálta neuronokban: az ER stressz indukciója az ATF6 útvonalon keresztül megvédi a neuronokat az apoptózistól (Kudo és mtsai 2008). Annak ismeretében, hogy a wolframin az ATF6 útvonalat gátolja (Fonseca és mtsai 2010), arra a következtetésre juthatunk, hogy valószínűleg a túl sok wolframin is kóros állapothoz vezet. Ezek alapján feltételezhető, hogy a fehérje optimális mennyiségének csökkenése és növekedése egyaránt bizonyos sejtfunkciók zavarához vezet.

A wolframin neuropszichiátriai szerepét támasztja alá Kakiuchi munkacsoportjának eredménye is. A valproát hangulat stabilizáló gyógyszerről bebizonyították, hogy a *WFS1* promotert erősen aktiválja és ezáltal megemeli a wolframin szintjét a neuronokban, valamint elősegíti a fehérje disszociációját a GRP94 fehérjéről (Kakiuchi és mtsai 2009).

1.3 Pszichológiai jellemzők mérése használt kérdőívek

Ikervizsgálatok alapján az impulzivitás heritabilitása 45%-ra tehető (Congdon és Canli 2008), az agresszió örökölhetőségének mértéke pedig 50% körül van (Craig, Halton, 2009) ami mutatja, hogy a környezeti tényezők mellett a genetikai faktorok jelentős szerepet játszanak. Az impulzivitás a bipoláris depresszióhoz kapcsolódó

endofenotípus, mely gyors döntésekre való hajlamot jelent. Mérésére a *Barratt-féle impulzivitás-kérdőív* a legelterjedtebb, a magasabb pontszámmal rendelkezők nagyobb valószínűséggel végeznek olyan cselekvéseket, melyek kimenetelében nem biztosak, illetve tudatában vannak annak negatív következményeivel. Kérdőívvel hasonlóan jól jellemezhető a szorongás és a depresszió is, melyet a HADS (Hospital Anxiety and Depression Scale (Zigmond, A.S. és Snaith, R.P. 1983)) kérdőívvel jellemeztünk. A szorongásos betegségek csoportjába számos izolált kórkép tartozik, klinikai szempontból a felnőttkorban legfontosabbak a generalizált szorongás (GAD), a poszttraumás stressz zavar (PTSD), a pánikbetegség, a kényszerbetegség (OCD) valamint a különböző fóbiák (Ravindran és Stein, 2010). Ezen rendellenességek a leggyakoribb mentális problémák közé tartoznak, élete során minden ötödik ember szenved valamelyik formájától. Jellemző még az erős komorbiditás más pszichiátriai és/vagy fizikális megbetegedéssel (Player és mtsai., 2011). Az agresszió olyan viselkedéses folyamatot jelent, amelyben a támadónak szándékában áll fájdalmat vagy sérülést okozni egy másik élőlénynek, aki azonban próbálja ezt elkerülni. Vizsgálatára szolgál a *Buss-Perry Agresszió Kérdőív*, melyben négy alskála segítségével külön mérhető a fizikai és verbális agresszió, a hosztilitás (ellenséges viselkedés), valamint a harag (Parrott és Zeichner, 2007). A felsorolt kérdőíveket felhasználtuk az impulzivitás, depresszió, szorongás és agresszió kvantitatív jellemzésére egy nem-klinikai (egészséges) mintán abból a célból, hogy a vizsgált WFS1 miRSNP pszicho-genetikai hatásait jellemezzük.

2 Célkitűzések

A pszichogenetikai kollaborációs munka egyik fő célkitűzése az volt, hogy új eredményekkel járjunk hozzá a pszichológiai jellegek és pszichiátriai rendellenességek öröklődő hátterének megismeréséhez. Ezen belül a bemutatásra kerülő munka konkrét célja a laboratóriumunkban folyó genotípus–fenotípus asszociáció elemzések genotípus vizsgálatánál a módszertan buktatóinak kiküszöbölése és a molekuláris hatásmechanizmus pontosabb megismerése volt.

Két viszonylag új polimorfizmus-típust vizsgáltunk: a néhány éve felfedezett kópiaszám variáció (CNV) csoportjába tartozó *GSK3B* gén CNV-t, valamint a funkcionális szempontból új csoportnak számító, a *SNAP-25* és *WFS1* gének mikroRNS kötését feltételezhetően befolyásoló, miRSNP-eket. A bemutatásra kerülő munka konkrét célkitűzései a következők voltak:

1. A 3. kromoszómán található, az *Nr1I2* és *GSK3B* gént magában foglaló CNV-t összefüggésbe hozták a major depresszió előfordulásával, azonban ezzel ellentétes eredmények is születtek, ezért **célul tűztük ki a *GSK3B* gént érintő CNV-k előfordulási gyakoriságának és kiterjedésének vizsgálatát kontroll csoportban és major illetve bipoláris depresszióval diagnosztizált betegek körében.**
2. A *SNAP-25* gén excitózisban betöltött szerepe felvetette a *SNAP-25* polimorfizmusok lehetséges szerepét különböző népbetegségekben, ezért *in silico* módszerekkel **mikroRNS kötőhely polimorfizmusokat kívántunk azonosítani a *SNAP-25* génben, továbbá célul tűztük ki olyan molekuláris genetikai módszerek kidolgozását, melyek felhasználhatók a *SNAP-25* miRSNP variánsok gyors és megbízható meghatározására.**
3. Bár a *WFS1* gén mutációi által okozott betegség jól ismert (Wolfram szindróma), a gén polimorfizmusaival viszonylag még kevesen foglalkoztak, ezért **célul tűztük ki a *WFS1* gén esetleges mikroRNS kötőhely polimorfizmusainak *in silico* azonosítását, molekuláris–funkcionális vizsgálatát,** valamint a kollaborációban vizsgált pszichológiai jellegekkel (agresszió, impulzivitás, szorongás, depresszió) való esetleges kapcsolatát.

3 Módszerek

3.1 Vizsgálatban részt vevő személyek

Asszociáció vizsgálatainkban 432 depresszióban szenvedő (123 férfi és 309 nő, átlagéletkor: 46,8 év), valamint 801 kontroll személy (370 férfi, 431 nő, átlagéletkor: 21,3 év) vett részt. Mindkét csoporthoz etnikailag homológ (kaukázusi), rokonságban nem álló személyek tartoztak. A betegek mintái a Semmelweis Egyetem Pszichiátriai és Pszichoterápiás Klinikájáról és a Kútvölgyi Klinikai Tömb Klinikai és Kutatási Mentálhigiénés Osztályáról származtak, ahol a diagnózist a DSM (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) IV. kritériumai alapján állították föl. A kontroll csoportba tartozó személyek önkéntes alapon vettek részt a kutatásban, és az asszociáció vizsgálatból kizárásra kerültek mindazok, akik saját bevallásuk szerint pszichiátriai kezelésben részesültek. Minden résztvevő előzetes tájékoztatást kapott a kutatás módjáról és céljáról, valamint írásos beleegyező nyilatkozatot töltött ki. A kódolt mintákat anonim módon kezeltük. A vizsgálatokat és az aláírt beleegyezési nyilatkozatokat az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (ETT-TUKEB) hagyta jóvá.

3.2 A pszichológiai vizsgálatok során felhasznált kérdőívek

A **Hospital Anxiety and Depression Scale** (HADS) mérőeszközt a nem pszichiátriai beteg-populáció (pl. tumoros betegek) hangulatának felmérésére fejlesztették ki. A 14 tételes önbeszámolón alapuló kérdőív 2 alskálája a *depresszió* és a *szorongás*. Mindkét alskálán legfeljebb 21 pontot lehet elérni, a skálánkénti 0–7 pont közötti értékek nem jeleznek semmiféle komoly hangulati problémát, a 11 pont fölötti értékek súlyos hangulatzavar meglétére utalnak, melyek kezelése javasolt (Zigmond és Snaith 1983). A kérdőív magyarra fordítása és hazai validálása megtörtént (Muszbek és mtsai 2006).

A **Buss-Perry Agresszió Kérdőív** (Buss-Perry Aggression Questionnaire; Buss és Perry, 1992) a fizikai és verbális agresszió, az ellenséges viselkedés (hostilitás), valamint a harag felmérésére szolgáló pszichológiai mérőeszköz. Az önbeszámolón alapuló kérdőív 29 tételes, melynek 4 alskálája a *fizikai* és *verbális agresszió* (a viselkedés instrumentális és motoros komponensei: mások megsértése, megsebesítése), a *hostilitás* (a viselkedés kognitív komponense: rosszindulat és igazságtalanság érzés)

és a *harag* (a viselkedés emocionális és affektív összetevője: agresszióra való fiziológiás válasz).

A **Barratt Impulzivitás Skála** (Barratt Impulsiveness Scale, Version 11; Patton és mtsai, 1995) az egyik leggyakrabban alkalmazott önkítöltős kérdőív az impulzív viselkedés jellemzésére. A mérőeszköz 30 tételből áll, a válaszadó reakcióiban megjelenő lobbanékonytságot és intenzitást (*motoros alskála*), a jövőbeli események megtervezésének hiányát vagy meglétét (*tervezés alskála*), valamint a gondolkodásban megjelenő impulzivitást (*kognitív funkciók alskála*) méri fel.

3.3 DNS izolálás

A DNS mintákat szájnyálkahártya-sejtek dörzsölésével nyertük. Ezután a mintavételi vattapálcákat 400 µl lízispufferbe helyeztük (0,1 M NaCl; 0,01 M Tris-HCl, pH = 8,0; 0,5% SDS; 0,2 mg/ml proteináz K). Egy éjszakán át tartó 56 °C-os inkubálás során a sejtek lizáltak, és a proteináz K hatására a fehérjék lebomlottak. Másnap a lizált sejtkivonatot centrifugálással távolítottuk el a vattapálcából (2000g, 10 perc). Az így nyert oldatból Puregene DNS izoláló kit (Gentra) segítségével izoláltuk a DNS-t.

3.4 *In silico* módszerek

A munkánk során vizsgált gének szekvenciáit az NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>), és az Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) génbankjából töltöttük le. A génekben található SNP-k elhelyezkedéséről és gyakoriságáról szóló adatokat szintén a fenti adatbázisokból nyertük. A mikroRNS kötődést befolyásoló polimorfizmusok (miRSNP-k) azonosítására a Patrocles (<http://www.patrocles.org/>) (Georges és mtsai 2006) és a PolymiRTS (<http://compbio.uthsc.edu/miRSNP/>) (Bao és mtsai 2007) míg a kópiaszám polimorfizmusok keresésére a Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation>) adatbázisok álltak rendelkezésünkre. A vizsgált mikroRNS-ek szekvenciáihoz a miRBase (<http://www.mirbase.org/>) adatbázis segítségével fértünk hozzá.

3.5 CNV mérés valós idejű PCR módszerrel

3.5.1 A kópiaszám mérésének elve

Real-time PCR segítségével megbízhatóan és viszonylag egyszerűen kivitelezhetők a mennyiségi mérések. A hagyományos PCR-rel ellentétben, ahol végpontdetektálást végzünk, itt a PCR terméket folyamatosan detektálhatjuk. A reakció során a termékekkel arányos mennyiségű fluoreszcens jel keletkezik, amit a gép folyamatosan mér. Ez a jel a PCR exponenciális fázisában arányos a kiindulási DNS mennyiséggel, ami „relatív kvantifikálás” (l. alább) alkalmazásával lehetővé teszi egy adott régió kópiaszámának meghatározását.

A detektálásra használt fluoreszcenciát kibocsátó festékeket két csoportra lehet osztani: az első csoportba tartozók nem szekvencia specifikusak, minden dupla szálú DNS-hez hozzákötődnek. Ennél a módszernél problémát okozhat, hogy a festék (pl. SYBR Green I) minden kétszálú DNS-t megjelöl (pl. a primer-dimereket is), ami a mérés megbízhatóságát csökkenti. A detektálás másik módja, hogy fluoreszcens festékek (pl. VIC, FAM) szekvencia specifikus, ún. TaqMan próbákhoz vannak kötve, így csak a próbával komplementer DNS szakasz jelenlétét jelzik. A bemutatásra kerülő mérésekben TaqMan próbákat alkalmaztunk, melyek lehetővé tették a képződő ampliconok specifikus detektálását. Ebben a rendszerben tehát a reakcióelegy a vizsgált régió felszorzozódására használt primerek mellett szekvencia-specifikus, fluoreszcens festékkel jelölt oligonukleotidot is tartalmaz. A próba 5' végéhez kötött riporter molekula által kibocsátott jel csak akkor detektálható, ha a DNS-polimeráz 5' exonukleáz aktivitása révén a próbát elhasítja, így fluoreszcens jel felszabaul a 3' végen lévő quencher (csillapító) molekula gátló hatása alól a PCR extenziós lépésében.

A kópiaszám meghatározásához relatív mennyiségi mérést használtunk (relatív kvantifikálás), melynek konkrét módját munkacsoportunk előzetes vizsgálatok során dolgozott ki. (Szántai és mtsai 2009). A módszer lényege, hogy a célgén mennyiségét egy olyan kontroll gén mennyiségéhez hasonlítjuk, melyről irodalmi adatok alapján feltételezhető, hogy a diploid genomban csak két kópiája fordul elő. Munkacsoportunk a szakirodalomban általánosan használt *RNázP* kontroll gént használta. A cél-, illetve a kontrollgénekre tervezett próbákat különböző riporter festékekkel (FAM, ill. VIC) jelöltük, így a detektálás ugyanabban a reakcióelegyben történt. Minden minta esetében

három párhuzamos mérést végeztünk, majd az eredményeket átlagoltuk. Ha a párhuzamos mérések értékei 15%-nál nagyobb szórást mutattak, a legjobban eltérő értéket kizártuk a számításból, vagy a mérést megismételtük.

A mennyiségi mérés alapja az ún. küszöb-ciklusszám (C_T) meghatározása. Ez a felhasználó által kijelölt küszöb fluoreszcencia eléréséhez szükséges PCR ciklusszám. A küszöb fluoreszcenciát úgy határoztuk meg, hogy jól detektálható legyen, és a PCR exponenciális fázisába essen. A génszám meghatározáshoz a ΔC_T módszert alkalmaztuk, miszerint a cél- és a kontrollgénhez tartozó C_T értékek különbségének (ΔC_T) segítségével az alábbi képlet alkalmas a kópiaszám (génszám) meghatározására:

$$\text{génszám} = 2^{C_{T(\text{kontroll})} - C_{T(\text{célgén})} + 1} / q$$

Az egyenletben a $C_{T(\text{kontroll})}$ a kontroll génhez, a $C_{T(\text{célgén})}$ a vizsgált génhez tartozó C_T értéket jelentik. A kitevőben lévő „+1” segítségével a két gén mennyiségének aránya helyett közvetlenül a célgén ismétlődési számát kapjuk meg; a q az adott génpárra jellemző arányossági hányados, ami a mért értékek technikai okokból (pl. eltérő fluoreszcens festék) származó eltérését korigálja.

A méréseket a Life Technologies real-time PCR 7300 berendezéssel végeztük el. A termociklus 10 perces elődenaturálással kezdődött 95 °C-on. Ezt 40 kétlépcsős ciklus követte: 95 °C 15 másodpercig, 60 °C 1 percig. Ezen 1 perces lépésben végezte a gép a detektálást. A reakcióelegy vagy saját tervezésű primereket (0,3 µM) és fluoreszcens jelölésű TaqMan próbákat (0,2 µM) (*I. táblázat*), vagy pedig a Life Technologies-tól rendelt primer-próba kiteket (a gyár által előírt hígításban) tartalmazta. Kontrollként *RNázP* génre specifikus TaqMan kitet használtunk. A PCR reakcióelegy a fentiekén kívül a TaqMan PCR Master Mixet (AmpliTaq Gold[®] DNS-polimeráz, dNTP, TaqMan PCR puffer és MgCl₂) és 3 ng genomi DNS-t tartalmazott, a végtérfogat 15 µl volt. A saját tervezésű primereket és próbákat a Primer Express programmal terveztük úgy, hogy a próbák 5' végükön vagy VIC vagy FAM fluoreszcens jelölést, 3' végükön pedig MGB quencher molekulát kötöttek. A kontrollként használt *RNázP* kópiaszámot mérő kitből FAM ill. VIC jelölésűt használtuk a mérések során annak megfelelően, hogy a célgént és a kontrollként alkalmazott *RNázP*-t azonos reakcióelegyben detektálhassuk.

3.5.2 A *C3orf15-NR112-GSK3B* régió vizsgálata

A *C3orf15-NR112-GSK3B* régióban lokalizált CNV kiterjedését különböző lokalizációjú TaqMan rendszerekkel (A–F, 1. táblázat) vizsgáltuk. A hatféle TaqMan rendszerből három esetben mi terveztük a specifikus primereket és próbákat, három esetben pedig gyári kitet használtunk. Az egyes próba–primerpárok jellemzőit az 1. táblázat foglalja össze. A primereket és próbákat a Primer Express program segítségével terveztük. A tervezés során figyelembe vettük, hogy csak genomi DNS mérésre legyenek alkalmasak a szettek és a genom más régiójához ne tudjanak bekötődni. Ezt BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) program segítségével ellenőriztük.

1. táblázat. A CNV vizsgálatára használt primerpárok és próbák szekvenciái. Zárójelben az Ensembl adatbázis alapján számolt bázisok pozíciói.

<i>gén</i>	<i>régió</i>	<i>jel</i>	<i>primerek és próbák</i>
<i>C3orf15</i>	18. exon	A	Hs0271551_s1 (Life Technologies kit)
<i>NR112</i>	promoter (–179 – –80)	B	sense: TTGTGAGCCAGAAGGGATTTG
			antisense: GGCATGACTCCAGCTCAGGTA
próba: TACGTATGTTACCCATAACC (FAM)			
	9. exon	C	Hs02515976_s1 (Life Technologies kit)
<i>GSK3B</i>	9. exon	D	sense: CACCGGAGGCAATTGCA
			antisense: TGTTAGTCGGGCAGTTGGTGTA
			próba: AGCCGTCTGCTGGAGT (VIC)
	5. exon	E	Hs02558733_s1 (Life Technologies kit)
promoter (–415 – –266)	F	sense: GGCCACTGTTGCCATTGTC	
		antisense: AGCCGATCAGCCTGAGAAAC	
		próba: CCAGCCAGCCACCGA (VIC)	

3.6 Genotipizálás PCR-RFLP módszerrel

A *SNAP-25* génben található rs3746544 és rs1051312 SNP-k valamint a *WFS1* génben lévő rs1046322 SNP genotipizálása a polimorfizmusokat tartalmazó génrégiók amplifikálásával kezdődött. A reakció elegy kb. 4 ng genomi DNS-t, 1 μ M sense és antisense primert (2. táblázat), 200 μ M dATP-t, dCTP-t, dGTP-t és dTTP-t, 0,5 U HotStarTaq DNS polimerázt, valamint 1 \times puffert és 1 \times Q-oldatot (Qiagen, Valencia CA USA) tartalmazott. A PCR elegy végtérfogata 13 μ l volt. A termociklus elődenaturációval kezdődött 95 °C-on 15 percig, ami egyben a hot-start DNS polimeráz aktiválását is eredményezte. Ezután következett 40 ciklus a következő lépésekkel: denaturálás (94 °C, 30 sec), anneálás (30 sec a megfelelő hőmérsékleten, 2. táblázat) és extenzió (72 °C, 1 min). A PCR utolsó lépése egy végső extenzió volt 72 °C-on 10 percig, ezután a mintákat 8 °C-on tartotta a gép a további folyamatokig. A PCR-t követő RFLP analízishez a 2. táblázatban szereplő restriktions enzimeket használtuk a megfelelő pufferekkel (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA).

2. táblázat. PCR-RFLP alapú genotipizáláshoz használt primerek, enzimek.

Gén SNP		<i>SNAP-25</i> rs3746544 rs1051312		<i>WFS1</i> rs1046322
PCR	sense primer	5' TTG TGT CTT TTG TTC TCT 3'		5' CAA AGG GAA GGC TGC TGT G 3'
	antisense primer	5' AAG GAT GAT TAT GAT TTA GA 3'		5' AAG AAA TGC TAC TGT GGA GGT TA 3'
	anneálás	51 °C		60 °C
RFLP	restriktions enzim	<i>Mnl</i> I	<i>Dde</i> I	<i>Dde</i> I
	enzim puffer	NEB 3	NEB 2	NEB 3

Az emésztés 37 °C-on 5 órán át tartott. Ezután a *SNAP-25* esetében Qiagen HDA-GT12 (Hilden, Germany) multikapilláris elektroforézis berendezéssel, „AM320” módszerrel (minta injektálása: 40 sec, szeparálás: 5 min) végeztük a keletkezett termékek analízisét. Az elektroferogramok kiértékelésére a Biocalculator 3.2 software-t használtuk. A *WFS1* polimorfizmus vizsgálata során az emésztést hagyományos alámerülő agaróz gélelektroforézis követte 2% Metaphor agaróz + 1,5% agaróz kevert gélen 1,5 órán át 100 V feszültségen. Az elektroforézis után a gélt 10 percig festettük 1 μ g/ml etídium-

bromidot tartalmazó 1× TAE pufferoldatban. A kiértékelés BioRad GelDoc 1000 géldokumentációs rendszerrel történt.

3.7 Genotipizálás real-time PCR-rel

A *WFS1* gén átfogó vizsgálata céljából a gén 17 SNP-jét genotipizáltuk OpenArray[®] Real-Time PCR berendezéssel (Life Technologies) a gyártó előírásainak megfelelően. A polimorfizmusok listáját a 6. táblázat tartalmazza. Két SNP-t (rs1046322 és rs9457) hagyományos TaqMan alapú real-time PCR-rel is genotipizálunk. A reakcióelegy kb 4 ng templát DNS-t, 1× végkoncentrációjú C__8841086_1_ (rs1046322 SNP-re specifikus) illetve C__2873371_10 (rs9457 SNP-re specifikus) genotipizáló kiset (Life Technologies) és 1× végkoncentrációjú PCR TaqMan Mixet (AmpliTaq Gold[®] DNS-polimeráz, dNTP, TaqMan PCR puffer és MgCl₂) tartalmazott 6 µl végtérfogatban.

A termociklus egy 10 perces denaturációval, enzimaktivációval kezdődött 95 °C-on. Ezután 40 ciklus követte egymást: 15 másodpercig 95 °C majd 1 percig 60 °C. Ez utóbbi szakaszban végezte a gép (Life Technologies 7300 Real Time PCR System) az adatgyűjtést. Az amplifikálás után még egy 1 percig tartó 60 °C-on történő detektálást végeztünk (Allelic Discrimination). Az ebből nyert adatokat a 7300 System Software jeleníti meg.

3.8 Haplotipizálás real-time PCR-rel

A *SNAP-25* génben lévő rs3746544 és rs1051312 SNP-k haplotípusának meghatározása szekvencia specifikus TaqMan próbák segítségével történt. A „kétcsöves” módszernek elnevezett rendszerben minden mintát két reakcióban vizsgáltunk. Mindkettő tartalmazta a TaqMan Universal PCR Master Mixet (AmpliTaq Gold[®] DNS-polimeráz, dATP, dTTP, dGTP és dCTP, ROX referencia festék) 1× végkoncentrációban, kb. 4 ng genomi DNS mintát, 6 µM sense (5' TTC CAA AGG TTG TAC ATA GTG GTC AT 3') és antisense primert (5' AAA TGC CAC CGA GGA GAG AA 3'). Ezekon kívül az I-es reakcióelegy tartalmazta a T–T- (5' FAM–CCT TGA TGT CTT GAG TT–MGB 3') és T–C-specifikus (5' VIC– TCC TTG ATG TCC C TGA GTT–MGB 3') próbákat, míg a II-es elegy a G–T- (5' FAM–CCT TGA GGT CTT GAG TT–MGB 3') és G–C-specifikus (5' VIC–CCT TGA GGT CCT GAG TT–MGB 3') próbákat. (A vastag,

aláhúzott bázisok jelölik az SNP-ket). Az „egycsöves” módszer esetében hasonlóak voltak a reakciókörülmények, azonban a G–C-specifikus próbát kihagytuk (mivel eredményeink alapján ez a haplotípus a vizsgált populációban nem fordult elő), és kettő helyett egy reakcióelegy tartalmazta a másik három próbát. A T–T és a T–C-specifikus próba a „két csöves” módszerhez hasonlóan FAM ill. VIC jelölést tartalmazott, a G–T-specifikus NED fluoreszcens festékkel volt jelölve. Mindkét módszernél az amplifikáció a Life Technologies 7300 Real Time PCR berendezésben, 10 µl-es végtérfogatban zajlott a következő termociklussal: 95 °C, 10 perces kezdeti denaturáció és DNS-polimeráz aktiváció, 40 ciklus denaturáció (95 °C, 15 sec) és összevont anneálás és extenzió (60 °C, 1 min). Az adatgyűjtés az utolsó lépés alatt történt, az eredményeket a Sequence Detection Software v1.4-gyel elemeztük.

3.9 Haplotípus meghatározása PCR-RFLP-vel

A SNAP-25 rs3746544 és rs1051312 SNP-k G–C haplotipizálása a genotípus meghatározáshoz hasonló módon történt. A fent ismertetett PCR után a termékeket 0,8 U *Sau96* I enzimmal és 1× NEBuffer 4-gyel (New England Biolabs) emésztettük. Az emésztés egyéb körülményei a fentiekkel megegyeztek.

3.10 Haplotípus frekvenciák becslése

Az egyes személyek haplotípusának számítással történő becslését PHASE v2.1 software segítségével végeztük el a teljes populáció egy részén ($N = 482$).

3.11 Riporter konstrukciók készítése

A konstrukciók elkészítése során kétféle riporter vektort alkalmaztunk: a pGL3 Controllt (pGL3C) (Promega) és a pMIR Reportot (Ambion). Ezekbe klónoztuk be a *WFS1* gén 3' UTR szakaszát. Elsőként a pGL3C vektorral hoztuk létre a vizsgálatához szükséges konstrukciókat, majd ezekből amplifikáltuk az inszerteket, amiket a pMIR Report vektorba klónoztunk át.

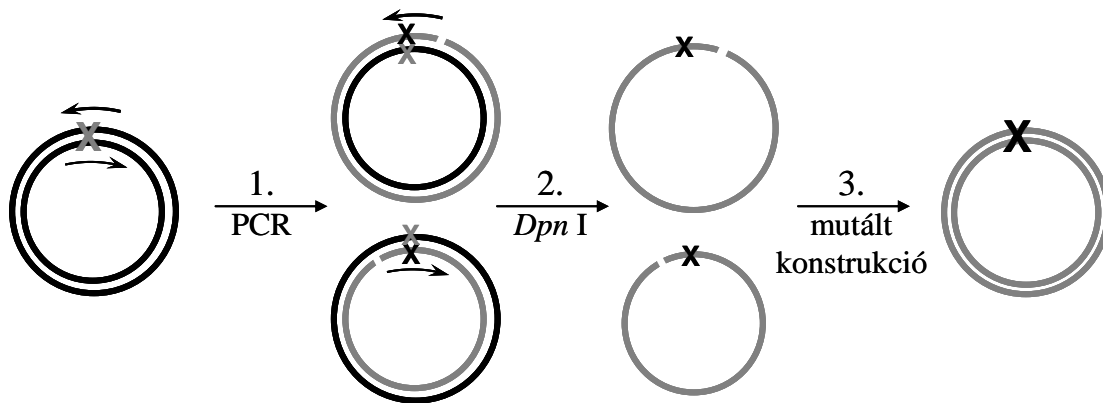
A teljes 3' UTR amplifikálásához genomi DNS szolgált mintaként. A primereket úgy terveztük meg, hogy ragadós véggel rendelkezzenek, mely lehetővé tette, hogy

ezeket a vektorba beillesztjük. A pGL3C vektorhoz mindkét primer az *Xba* I enzim felismerő helyét (aláhúzva) tartalmazta (sense: 5' TCG GCG TCT AGA GGA TGG TCC GCC ACG AGG AGC 3', antisense: 5' AAA GGA TCT AGA GCG CTG CAG GTT CCA CCA GAG G 3'). A PCR HotStarTaq polimeráz enzimmel történt az enzim leírásában szereplő termociklus alkalmazásával, 57 °C-os anneálási hőmérsékleten.

A PCR után a keletkezett terméket 1,5% agaróz gélelektroforézissel tettük láthatóvá, majd tisztítottuk (Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega). Ezt követően a vektorokat és inszerteket a megfelelő restriktions enzimmel emésztettük 3–5 órán át, majd a vektort CIAP foszfatázzal emésztettük további 1 órán át. Ezt követte a DNS-ek oszlopos tisztítása a már említett gél tisztító kittel, majd 1%-os SeaKem[®] GTG[®] Agarose (Lonza, Rockland ME, USA) gélen való szétválasztása. A megfelelő hosszúságú termékeket a gélből kivágtuk, a DNS-t a Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System kittel megtisztítottuk. Az így létrehozott ragadós végű inszertet és vektort szobahőmérsékleten 3 órán át ligáltuk T4 ligáz enzim segítségével. A ligátumokat XL10-Gold[®] ultrakompetens sejtekbe (Stratagene) transzformáltuk, a termék protokolljának megfelelően, majd a konstrukciót tartalmazó sejteket felnevesztettük és abból PureYield[™] Miniprep System (Promega) kittel konstrukciót tisztítottunk. Az inszert beépülését és genotípusát restriktions emésztéssel és szekvenálással ellenőriztük.

Az így létrehozott konstrukcióból irányított mutagenézissel állítottuk elő a vizsgálatok során használt további variánsokat: a másik allélt és az ún. seed mutánst tartalmazó konstrukciókat. Ehhez a QuikChange[®] Lightning Site-Directed Mutagenesis Kitet (Stratagene) használtuk, melynek lényege, hogy a kétszálú cirkuláris plazmid 1–1 szálára két ellenkező irányultságú mutagén primert tervezünk, melyek közepén nem a templáttal komplementer, hanem az általunk kívánt „mutáns” bázisok állnak. A módszer első lépése egy PCR a mutagén primerekkel. Ilyenkor a templát DNS denaturálása után a primerek anneálnak a DNS szálakhoz, és a *Pfu* Turbo polimeráz amplifikálja az új DNS-t. Így létrejön az eredetitől csak a mutációban eltérő új DNS. A PCR terméket *Dpn* I enzimmel emésztjük, aminek a hatására, az eredeti metilált DNS lebomlik, és csak az új, mutációt tartalmazó DNS-szál marad meg. Ebben a fázisban a cirkuláris DNS tartalmaz egy nicket, amit a transzformálás után az XL10-Gold[®] ultrakompetens sejtek kijavítanak. Ezt a módszert mutatja be a 7. ábra. A mutagén primerek a

következők voltak: G-ről A-ra cserélő sense: 5' CCT GAG CCT GAC CTT TCT GAA TGA CAT GGG TG 3', antisense: 5' CAC CCA TGT CAT TCA GAA AGG TCA GGC TCA GG 3', seed mutánst létrehozó sense: 5' CAG GCT GCC TCA TGA CCC TCG AGA GGT GCA GGT AGT GGG TGA ATG TG 3', antisense: 5' CAC ATT CAC CCA CTA CCT GCA CCT CTC GAG GGT CAT GAG GCA GCC TG 3'.



7. ábra. Irányított mutagenézis elve. 1. lépés: Az eredeti, kétszálú konstrukcióban (fekete körök) található mutálandó bázis (szürke X) környékére tervezett mutagén primerekkel (nyilak) PCR. Létrejönnek az új DNS szálak (szürke), a mutált bázissal (fekete X). 2. lépés: eredeti (fekete) metilált szálak emésztése Dpn I restrikciós enzimmel. 3. lépés: létrejön a szürkével jelölt új, mutált (fekete X) konstrukció.

Hasonlóan az eredeti plazmidhoz, itt is PureYield™ Miniprep és Midiprep System Kittel tisztítottuk a termékünket, és szekvenálással ellenőriztük a mutagenézis sikerességét. A fenti módszerekkel létrehoztuk az egymástól allélokban valamint a seed régióban különböző variánsokat, valamint negyedik kontroll plazmidként az első lépéssel azonos módon, a *WFS1* 3' UTR-jével hasonló hosszúságú DNS szakaszt tartalmazó konstrukciót (sense: 5' AAA TTT GCT AGC ACT GAG CTT TTT CTT AAT TTC ATT CC 3', antisense: 5' AAA TTT GCT AGC GTC CAC AGA AGA TGT TTA TTT GAT 3').

Ezen konstrukciókból kiindulva hoztuk létre a pMIR Report vektort tartalmazó új konstrukcióinkat. A pGL3C-A, -G, -seed mutáns és kontroll konstrukciókból az inszertet HotStarTaq polimerázzal amplifikáltuk, az enzim leírásában javasolt körülmények között, 58 °C anneálási hőmérsékleten (primerek az első három esetén sense: 5' TCG GCG GAG CTC GGA TGG TCC GCC ACG AGG AGC 3', antisense:

5' AAA GGA AAG CTT GCG CTG CAG GTT CCA CCA GAG G 3', a kontroll 3' UTR esetén sense: 5' TGT AAT GAG CTC ACT GAG CTT TTT CTT AAT TTC ATT CC 3', antisense: 5' CCC GAC AAG CTT GTC CAC AGA AGA TGT TTA TTT GAT 3'). Ezen primerekkel *Sac* I és *Hind* III hasítási helyet (aláhúzással) vittünk az inszertek végére, ami a ligáláshoz szükséges. Az üres pMIR-Report vektort és az inszerteket a fenti két enzimmel emésztettük, majd a fent leírt módon ligáltuk, transzformáltuk és tisztítottuk. Az inszertek beépülését először *Sac* I és *Hind* III emésztéssel majd szekvenálással ellenőriztük.

Hasonló módon létrehoztunk négy konstrukciót, melyek a *SNAP-25* gén 3' UTR-jét tartalmazták, és csak az rs3746544 és rs1051312 SNP-knek megfelelő bázisokban tértek el egymástól. A két SNP 4 haplotípust képes létrehozni (T–T, T–C, G–T, G–C), az ezeket tartalmazó konstrukciókat a korábban részletezett haplotipizáló módszerünk ellenőrzésére használtuk.

A luciferáz riporter gént tartalmazó konstrukciók mellett létrehoztunk egy miR-668-at expresszáló konstrukciót is. Ehhez p*Silencer*TM vektorba ligáltuk a prekurzor miR-668 szekvenciáját. A vektor CMV promotere mögött lévő *Bam*H I és *Hind* III felismerőhelyek közé lehet bevinni a pre-miR-t. Az inszertként szolgáló pre-miR szekvenciát tartalmazó molekulákat megszintetizáltattuk, úgy, hogy a komplementer DNS-ek végei túlnyúljanak, és ragadós végként szolgáljanak a ligáláshoz. A megrendelt oligonukleotidokat (sense: 5' GAT CCG GTA AGT GCG CCT CGG GTG AGC ATG CAC TTA ATG TGG GTG TAT GTC ACT CGG CTC GGC CCA CTA CCT TTT TTG GAA A 3', antisense: 5' AGC TTT TCC AAA AAA GGT AGT GGG CCG AGC CGA GTG ACA TAC ACC CAC ATT AAG TGC ATG CTC ACC CGA GGC GCA CTT ACC G 3') az előírásban szereplő anneálási pufferben (10 mM Tris pH=8, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA) 3–5 percig 90 °C-on inkubáltuk, majd lassan, kb. 1 óra alatt 37 °C-ra hűtöttük le, így létrejött a kétszálú inszert. A vektort *Bam*H I és *Hind* III enzimekkel emésztettük, majd gélben futtattuk, kivágtuk és tisztítottuk a már részletezett módon. Ezután a ligálás T4 ligázzal történt, és a terméket XL10-Gold[®] ultrakompetens sejtekbe (Stratagene) transzformáltuk.

3.12 Tranziens transzfekció

3.12.1 *Transzfekció menete*

Kísérleteink során HEK293, humán embrionális vesesejtvonalat transzfektáltunk luciferáz riporter génnel, β -galaktozidáz kontroll génnel, prekursor miRNS-t expresszáló vektorokkal illetve prekursor miRNS-sel. A sejteket 10% főtális borjú szérumot (Lonza) és 1% Penicillin–Streptomycin antibiotikumot tartalmazó DMEM (Invitrogen – Gibco) médiumban növesztettük. Transzfektáláshoz a sejteket 24 lyukú plate-be raktuk ki, lyukanként 500 μ l médiumba. 24 órával később Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) segítségével transzfektáltuk a sejteket a következő módon: 2,5 μ l 1 mg/ml Lipofectamine™ 2000 és 60 μ l Opti-MEM összemérése után 5 perccel hozzá mértünk 62,5 μ l Opti-MEM és a megfelelő konstrukciók keverékét. A liposzómák kialakulásához szükséges 20 perc várakozás után adtuk a 125 μ l elegyet a sejtekhez. Belső kontrollként alkalmazott β -galaktozidáz tartalmazó vektorból 0,2 μ g-ot, a luciferáz riporter gént tartalmazó konstrukcióból 0,1 μ g-ot és ezek mellett változó mennyiségű (0–10 pmol) pre-miRNS-t transzfektáltunk. Minden mérést három párhuzamos ismétlésben végeztünk el.

3.12.2 *Sejtek begyűjtése, feltárása*

A transzfekció után 48 órával gyűjtöttük be a sejteket. A médiumot a lyukakból leszívtuk, 0,5 ml PBS-ben mostuk, majd 0,5 ml PBS-ben gyűjtöttük be a sejteket. Ezt követte 3 perc centrifugálás 3000 rpm-en 4 °C-on. A csapadékot RNS szint mérés céljából 200 μ l TRI® reagensben (Sigma-Aldrich) vettük fel és tároltuk –80 °C-on az RNS izolálásáig. Amennyiben luciferáz és β -galaktozidáz enzimaktivitást kívántunk mérni a sejtekből, a centrifugálás után 100 μ l 250 mM-os Tris-HCl pH = 8,0 pufferben vettük fel és –80 °C-on tároltuk a sejtfeltárásig. A feltárást három egymást követő fagyasztás–olvasztás ciklussal végeztük, amit 13000 rpm-en való centrifugálás követett 4 °C-on 15 percig. Az így kapott felülúszó tartalmazta a transzfektálás során termelt luciferáz és β -galaktozidáz enzimeket, melyek enzimaktivitását meghatároztuk.

3.13 Luciferáz és β -galaktozidáz enzimaktivitás mérése

Enzimaktivitás mérésre a Varioskan Flash Multimode Reader berendezést használtuk, ami alkalmas mind luminometriai, mind fotometriai mérések elvégzésére. Luciferáz aktivitás mérésre 12 μ l sejt felülúszót és 60 μ l Luciferin reagenst mértünk össze. A reagenst 30 ml törzsoldatából mértük ki, ami 5 mg Beetle Luciferin, kálium só (Promega), 1 ml 0,6 M Tricint, 1 ml 0,0321 M $(\text{MgCO}_3)_4 \cdot \text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ -t, 0,08 ml 1 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ -t, 1 ml 3 mM EDTA-t, 1 ml 1 M DTT-t, 1 ml 8,1 mM CoAlLi_3 -t, 0,15 ml 0,1 M ATPNa_2 -t tartalmazott. β -galaktozidáz enzimaktivitás méréshez az enzim mesterséges szubsztrátját, az ONPG-t (*o*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid) használtuk. 130 μ l ONPG oldathoz (ONPG és $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$ puffer pH = 7,5 és Mg^{2+} puffer) 20 μ l sejt kivonatot mértünk. A kapott eredményekből enzimaktivitást számoltunk. Az egyes pontokban kapott luciferáz értékeket a hozzájuk tartozó β -galaktozidáz értékekkel normalizáltuk.

3.14 RNS izolálás

Kísérleteink során a sejtben lévő endogén mRNS szintek mellett az endogén vagy általunk transzfektált miRNS-ek szintjét is mérni kívántuk. Ehhez olyan RNS tisztító eljárásra volt szükség, ami során nem vesznek el a kisméretű RNS molekulák. Ilyen módszer a trizolos izolálás. A TRI[®] reagensben begyűjtött sejtekből, kloroform illetve etanol segítségével RNS-t tisztítottunk. A tisztított RNS-ek minőségéről 1%-os gélelektroforézissel, mennyiségéről NanoDroppal való koncentráció méréssel győződöttünk meg.

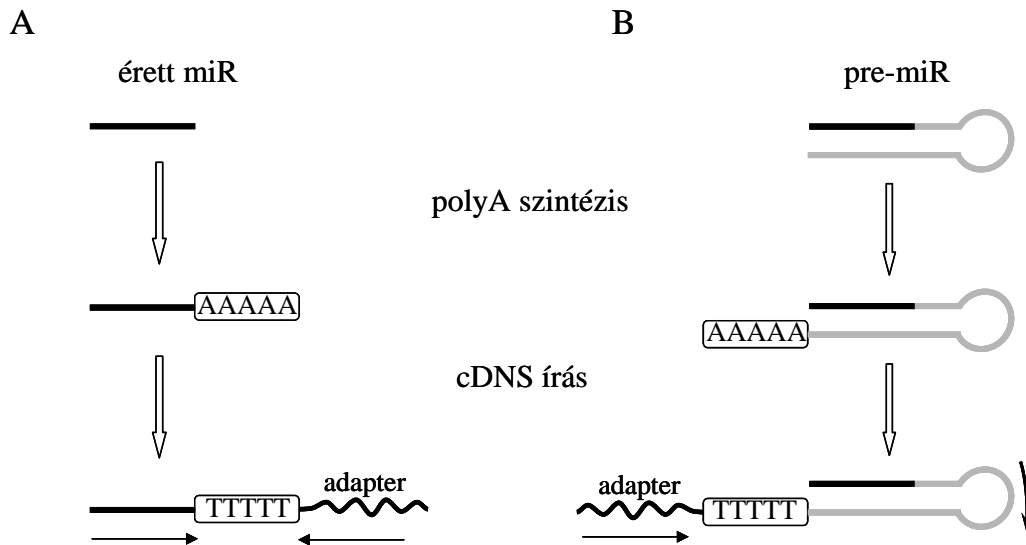
3.15 mRNS mérés

A fenti módon izolált RNS-ből cDNA Archive Kittel (Life Technologies) írtunk cDNS-t a gyártó szerinti protokollt követve. A cDNS-ek mennyiségi összehasonlítása real-time PCR-rel történt. Kontrollnak a *GAPDH* cDNS-ét használtuk. A *WFS1* mRNS szintjének mérését saját tervezésű primerekkel végeztük (sense: 5' GCA TAC CAG GAG CCG GGA AAG 3', antisense: 5' CTC CAG GAC TTC TTC AAA GGG GAT T 3'), a

terméket SYBR Green festékekkel detektáltuk. A kapott C_T értékekből a $2^{-\Delta C_T}$ módszerrel határoztuk meg a mRNS relatív mennyiséget.

3.16 miRNS mérés

A mikroRNS-ek transzfektálása során fontos volt annak tisztázása, hogy a sejtbe valóban bejutott-e a prekursor miRNS és ha igen, akkor a sejtben végbemegy-e az érési folyamat. A miRNS-ek detektálása bonyolultabb feladat, mint a mRNS-eké, hiszen olyan rövid nukleinsavakról van szó, hogy a velük komplementer cDNS-re nem lehetne két primert tervezni. Ezért az általunk használt miRNS detektáló kit (miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis Kit és High Specificity miRNA QPCR kit, Stratagene) először a miRNS-re egy poli-A szakaszt szintetizál, ami az ezután következő cDNS íráskor a primer templátjaként szolgál. A primer azért különleges, mert 5' végén tartalmaz egy univerzális adapter szekvenciát, aminek a segítségével meghosszabbítja a cDNS-t. Ezek után már real-time PCR-rel mérhető hosszúságú cDNS-t kapunk, aminek mennyiségét az adapterszekvenciával komplementer univerzális primer és saját tervezésű, miRNS-re specifikus primer (miR-668 esetén 5' GGC TCG GCC CAC TAC 3') segítségével vizsgálni lehet. Az elvet tovább gondolva, a pre-miRNS-re is terveztünk specifikus primert (5' GTG AGC ATG CAC TTA ATG TGG 3'), így a még nem processzált pre-miR-668 szintjét is meg tudtuk határozni (8. ábra). A miR-668 mennyiségi mérése során belső kontrollként a miR-196b szintjét vizsgáltuk, a relatív miR-668 mennyiséget $2^{-\Delta C_T}$ módszerrel határoztuk meg.



8. ábra. A mikroRNS mérés elve. A: érett miRNS mérés (fekete vonal). **B:** prekursor miRNS mérés (szürke + fekete hajtú szerkezet). A mérés elve azonos, első lépés a poli-A farok szintézise (fehér téglalapban AAAAA), második lépés a cDNS írás, amikor adapter szekvenciával (hullámos fekete vonal) hosszabbodik meg a cDNS. A keletkezett szekvenciára tervezett primerekkel (fekete nyilak) mérhető a cDNS mennyisége.

3.17 Statisztikai módszerek

Eset-kontroll analízisek: A *WFS1* gén SNP-i esetében a mért és a számított genotípus frekvenciák esetleges eltérését a Hardy–Weinberg egyensúlytól, valamint a *GSK3B* gén CNV-k eset-kontroll analízisét χ^2 -próbával értékeltük az SPSS 19.0 programcsomag segítségével.

Kvantitatív fenotípusok kiértékelése: A *WFS1* gén polimorfizmusai és az agresszió, impulzivitás, szorongás, valamint depresszió közötti asszociáció elemzését egy pontos kovariancia analízis (ANCOVA = analyses of covariance) módszerrel végeztük SPSS 19.0 program alkalmazásával. A nemet és a kort kovariánsként használtuk. A genetikai modell két-allélos, és feltételezi a ritkább allél recesszivitását. A többszörös összehasonlításból adódóan szükséges volt Bonferroni korrekciót végezni. Mivel 4 féle fenotípust és 17 SNP-t vizsgáltunk $4 \cdot 17 = 68$ tesztre korigáltunk. Így a szignifikancia küszöbértéke (p) $0,05 / 68 = 0,0007$ volt.

Kapcsoltsági vizsgálat: A Lewinton-féle D' illetve az R^2 értékeket határoztuk meg HaploView 4.2 software segítségével (Barrett és mtsai 2005).

4 Eredmények

4.1 Génszámvariációk vizsgálata

4.1.1 A GSK3B régió kópiaszám változásának eset-kontroll vizsgálata

Első lépésként a *GSK3B* gén 9. exonjának területére tervezett próbával végeztünk *GSK3B* génkópiaszám méréseket, felhasználva a laboratórium által a közelmúltban kidolgozott génszámmérést, melyhez valós idejű PCR rendszert használtunk (Szantai és mtsai 2009). A mérés során a különböző fluoreszcens festékekkel jelzett *GSK3B*-ra specifikus és a kontroll, *RNázP*-próbát ugyanabban a reakcióelegyben használtuk, ezáltal lényegesen csökkentve az esetlegesen eltérő DNS koncentrációkból és egyéb technikai okokból adódó mérési hibát. 432 eset (172 MDD és 260 BD) és 414 kontroll kópiaszámát határoztuk meg relatív kvantifikálással. A vizsgált populációkban a *GSK3B* gén 9. exonjának területén deléciókat nem találtunk. Ugyanakkor a normálisnál ($n = 2$) nagyobb kópiaszámot, azaz amplifikációt tartalmazó DNS mintákat találtunk mind a kontroll, mind pedig a depressziós betegek csoportjában (3. táblázat). A megnövekedett kópiaszám meglehetősen ritkának bizonyult a kontroll csoportban (410 főből 4 személy, 1%), míg a betegek között összesen 22 személynél (5.1%) azonosítottunk amplifikációt.

3. táblázat. A GSK3B 9. exon területének amplifikációja. N: esetszám; n: kópiaszám; OR: esélyhányados (odds ratio); MDD: major depresszió; BD: bipoláris depresszió. A statisztikai analízis során (p ill. OR számítás) a beteg csoportokat – egyenként – a kontroll mintákkal hasonlítottuk össze.

	Normál génszám ($n = 2$)		Amplifikáció ($n > 2$)		OR	p
	N	%	N	%		
Kontroll	410	99,0%	4	1,0%		
Beteg	410	94,9%	22	5,1%	5,5	0,00051
MDD	169	98,3%	3	1,7%	1,8	0,43
BD	241	92,7%	19	7,3%	8,1	0,00001

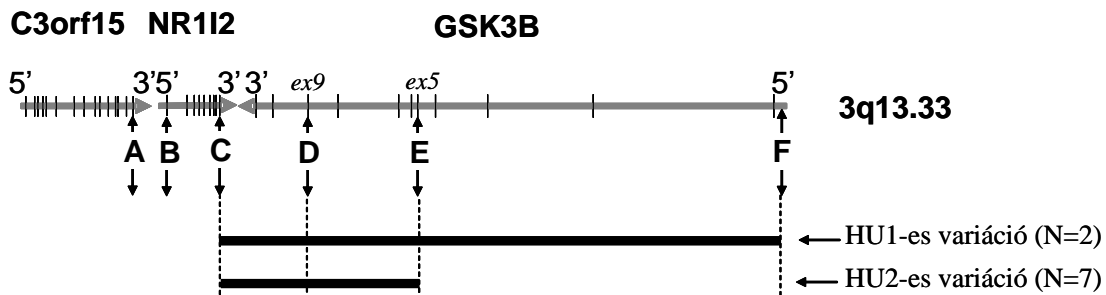
Eredményeink statisztikailag szignifikáns összefüggést mutattak a CNV és a depresszió előfordulása között (OR = 5,5, $p = 0,000509$). Annak eldöntésére, hogy vajon az amplifikáció a depresszió mindkét altípusával asszociál-e, elvégeztük a

statisztikai analízist a major depressziós és a bipoláris depressziós mintákon külön-külön is. Míg a major depressziósok nem különböztek lényegesen a kontroll csoportban mért amplifikáció arányában (1,0% vs. 1,7% előfordulás), addig a bipoláris depresszióban szenvedők között szignifikánsan többen rendelkeztek amplifikációval a kontrollhoz viszonyítva (7,3 % vs. 1,0 %, OR = 8,1, $p = 0,000010$).

4.1.2 *A változó kópiaszámú szakaszok kiterjedésének vizsgálata*

A következőkben azt vizsgáltuk meg, hogy az *NR1I2*–*GSK3B* génrégió extra példánya kiterjedésében megegyezik-e az előzetesen leírt, 165 kb hosszúságú változattal (variation_0035; Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation>)). Az ismétlődő régió pontosabb behatárolását összesen hat próbával végeztük (9. ábra). Ezeket a következő elvi és gyakorlati szempontok szerint terveztük meg: A TaqMan próbák tervezésénél igyekeztünk a már rendelkezésre álló, exon területre eső expressziós kiteket felhasználni (pl. *GSK3B*: 5. exon; *C3orf15*: 18. exon). Azonban kíváncsiak voltunk arra, hogy az amplifikált régiók magukba foglalják-e a gének promotereit, s ezáltal feltételezhető-e, hogy funkcionális egységet alkotnak. Ezért próbát terveztünk az *NR1I2* és a *GSK3B* 5' régióira is (1. táblázat).

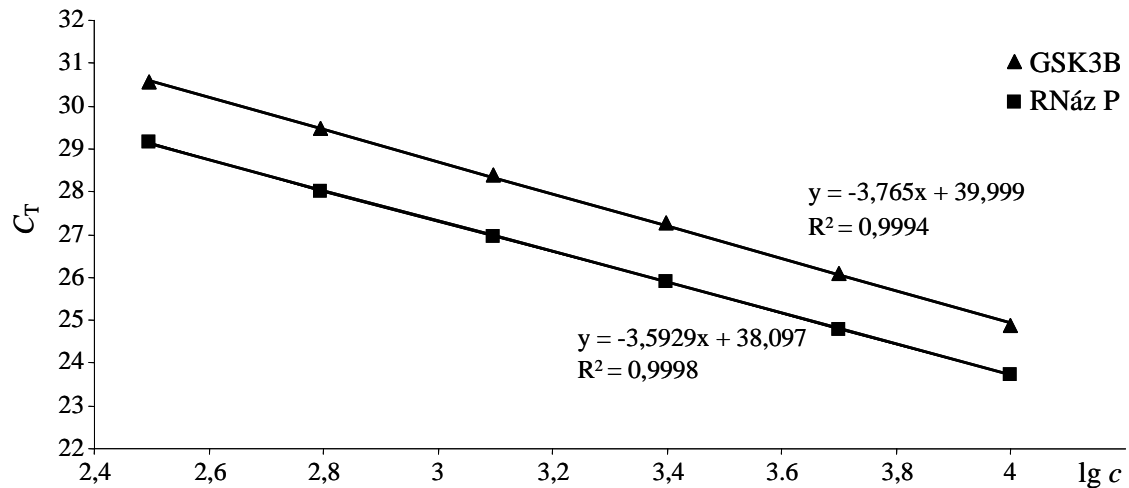
Mind az általunk tervezett, mind pedig az előre gyártott TaqMan rendszerek esetében fontos volt a primerpár-próba szett megbízhatóságának ellenőrzése, melyet a C_T (küszöb ciklus) értékek kiindulási DNS koncentráció függésével ellenőriztünk. Valamennyi vizsgált primerpár-próba szett esetében hattagú felező hígítási sort készítettünk 0,31–10 ng/ μ l kiindulási DNS-koncentráció tartományban, majd mind a vizsgált gén, mind pedig a kontroll gén esetében ábrázoltuk a kapott C_T értékeket a koncentráció tízes alapú logaritmusának függvényében. A 10. ábra egy reprezentatív példát mutat be a kiindulási DNS koncentráció és a C_T érték megfelelő összefüggésének igazolására. A *GSK3B* 5. exonjának analízise során a vizsgált és a kontroll gén egyenesei gyakorlatilag párhuzamosnak mondhatók, tehát a vizsgált 0,31–10 ng/ μ l kiindulási DNS-koncentráció tartományban a génszám meghatározása megbízhatóan kivitelezhető. Méréseink pontosságát jelezte, hogy az R^2 értékek meghaladták a 0,99 értéket, tehát a mért értékek jól illeszkedtek a regressziós egyenesekre.



9. ábra. Hat lókusz (A-F) kópiaszáma a *GSK3B* gént tartalmazó *3q13.33* régióban. Az ábra felső részén a vizsgált génrégió látható, a szürke nyilak a három gént és ezek 5'-3' irányultságát mutatják. A függőleges vonalak az exonokat jelölik. A gének alatti függőleges nyilak a 6 (A–F) primer-próba rendszer kromoszómális pozícióját mutatják, alattuk pedig az azonosított CNV-k kiterjedése látható. Fekete téglalap az amplifikációt, az üres téglalap a delécióát reprezentálja, a vékony fekete vonal a normál génszámra vonatkozik. Nincsenek jelölve azok a kromoszómális területek, melynek génszámáról nem kaptunk közvetlen információt.

A további vizsgálatok során a fent használt kiindulási DNS koncentráció tartományban végeztük el a relatív kópiaszám meghatározást. A kidolgozott primer-próba rendszerekkel (A–F betűvel jelölve a 9. ábrán) három olyan CNV típust detektáltunk, melyet eddig a szakirodalomban nem mutattak ki. Ezeket HU1, HU2 és HU3-as variációknak neveztük el. Méréseink szerint a *C3ORF15* gén (A próbával mérve) nem része a CNV-nek, az *NR1I2* génnek pedig csupán a 3' régiója (C próbával mérve) érintett. A *GSK3B* gén 3' része minden esetben amplifikálódott (C, D próba alapján), míg az 5' rész csak a HU1 variánsban (F próbával mérve) mutatott megemelkedett kópiaszámot. A HU1 variáns az egyetlen, ahol a gén teljes egészében, az 5' promoter régióval együtt amplifikálódik (C, D, E és F próbák alapján), ilyen CNV-t két személynél találtunk. Fontos megjegyezni, hogy az amplifikációs terület ezekben a mintákban az F próbán túl is tarthat, erről a jelen mérések nem adnak tájékoztatást. A HU2 variánsban csak részleges amplifikációról van szó (C, D, E próba alapján amplifikált), mely nem társul a gén 5' régiójának deléciójával, ilyen variánst 7 esetben azonosítottunk. A HU3 variánsban a 3' vég amplifikálójára (C, D és esetenként E próba alapján is) az 5' vég deléciójával társul (F próbával mérve). Az amplifikációnak és a deléciónak ezt a furcsa kombinációját összesen 17 személynél találtuk meg, és a

szakirodalom szempontjából új típusnak tekinthető. Fontos eredménynek tekinthető az is, hogy a HU3 variáns előfordulása statisztikailag szignifikánsan nagyobb ($p = 0,00115$) bipoláris betegek között (13 beteg 260-ból), mint a kontroll csoportban (4 eset 414-ből). Az eredményeink rámutatnak arra, hogy a *GSK3B* gént érintő CNV kiterjedése változatos, és egyetlen lókuszmérés nem ad pontos felvilágosítást az amplifikálódott területről.



10. ábra. A valós idejű PCR során keletkező ampliconok küszöbértékének eléréséhez szükséges ciklusszám (C_T) és a kiindulási DNS-koncentráció (c) összefüggése. A *GSK3B* gén 5. exonjának és az *RNáz P* kontroll génjének C_T értékei a kiindulási DNS-koncentráció tízes alapú logaritmusának függvényében.

4.1.3 A kópiaszámok összehasonlítása különböző mintákban

A 9. ábra az amplifikált régiók kromoszomális (térbeli) elhelyezkedését mutatja be, érdekes módon nem csak ebben, hanem az amplifikáció mértékében is meglehetősen nagy variabilitás figyelhető meg, és a génszám esetenként igen magasnak (több, mint 20) bizonyult. A kvantitatív eredmények részletei a 4. táblázatban találhatók. Eredményeink alapján a HU1-es variánsra jellemző, hogy mindkét azonosított mintában (1 db MDD és 1 db BD) a teljes régió három példányban van jelen ($n = 3$), azaz egyetlen extra példány jött létre. A kép azonban korántsem ilyen egyszerű a HU2-es és HU3-as variánsoknál. A 4. táblázatban két kategóriát határoztunk meg: egy magas kópiaszámú csoportot, ahol a 9. exon régió kópiaszáma meghaladja az ötöt és egy alacsony kópiaszámú csoportot, ahol az egyes genomokban a 9. exon kópiaszáma 5-nél

kisebb. Az 5. exon kópiaszáma egyedenként gyakran megegyezik a 9. exon régió kópiaszámával, de esetenként alacsonyabb is lehet. Az 5' UTR kópiaszáma érdekes módon sohasem magas, hanem normális ($n = 2$) vagy deléció mutatható ki ($n = 1$), kivéve azt a két mintát (HU1 variáns), ahol a 3-as kópiaszám az egész régióra, és így az 5' szakaszra is kiterjed. A HU2-es típusnál az 5. és a 9. exon amplifikációs száma azonos, kivéve azokat a mintákat, ahol az 5. exon területén nem találtunk amplifikációt, és az 5' UTR génszáma is normális ($n = 2$). A HU3-as variációk esetében a 9-es exon amplifikációs száma igen magas is lehet (20 fölött), mely kombinálódik az 5' UTR területén mért delécióval. Delécióval kombinált magas amplifikációs számot kizárólag BD minták esetében találtunk (5 esetben 10 feletti, 3 esetben 5 és 10 közötti kópiaszám), míg alacsony amplifikációs számú, delécióval társult minták a BD csoportban (5 db) és a kontrollban (4 db) is előfordultak. Összességében azt mondhatjuk, hogy a *GSK3B* régió CNV analízise igen összetett képet mutatott, mely egyetlen próbával nem jellemezhető.

4. táblázat. Az új CNV variánsok számszerű jellemzése. n = kópiaszám; átlag: a mért kópiaszámok átlaga; STD: szórás.

		9. exon			5. exon			5' UTR		
		átlag	STD	n	átlag	STD	n	átlag	STD	n
HU1	$n < 5$	2,8	0,2	3	2,8	0,4	3	2,7	0,2	3
HU2	$n \geq 5$	12,8	5,2	8–17	11,8	6,2	8–17	2,3	0,2	2
	$n < 5$	3,6	0,4	3–4	3,2	0,9	2–4	2,1	0,5	2
HU3	$n \geq 5$	12,9	6,9	5–23	7,8	2,2	5–11	0,4	0,4	0-1
	$n < 5$	3,7	0,6	3–4	3	0,4	2–3	1,1	0,3	1

4.2 MikroRNS kötőhelyek polimorfizmusainak vizsgálata

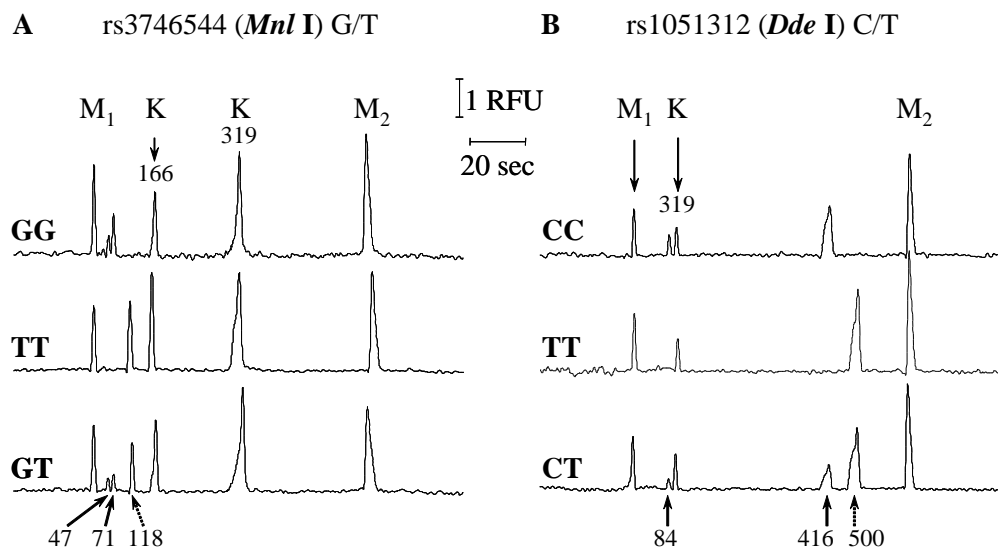
MikroRNS kötőhely polimorfizmusokat két új kandidáns gén, a *SNAP-25* és a *WSF1* gének esetében vizsgáltunk. A mikroRNS kötőhelyeket *in silico* módszerekkel azonosítottuk, és ennek funkcionális jelentőségét a *WFS1* gén esetében molekuláris módszerekkel is bizonyítottuk.

4.2.1 A *SNAP-25* gén mikroRNS kötőhelyének polimorfizmusai

A *SNAP-25* gén SNP-inek *in silico* vizsgálata azt mutatta, hogy az rs3746544 és az rs1051312 SNP-k elméletileg befolyásolhatják a *SNAP-25* mRNS-hez kapcsolódó mikroRNS-ek kötéseerősségét. Ez a két polimorfizmus igen közel van egymáshoz, ezért a két SNP genotípusának meghatározásán kívül haplotípusuk meghatározása is szükségessé vált. A kidolgozott haplotipizáló technikák megbízhatóságát több módszerrel igazoltuk.

4.2.1.1 Az rs3746544 és rs1051312 polimorfizmusok genotipizálása

A két vizsgált polimorfizmus (rs3746544 és rs1051312) PCR-RFLP-vel történő genotipizálásához a korábban használt módszer (Barr és mtsai 2000) módosítására volt szükség a nagyobb megbízhatóság érdekében. Új primer párokat terveztünk úgy, hogy a keletkezett PCR termék tartalmazzon kontroll (nem polimorf) hasító helyet is. Az így kapott PCR termékeket kétfelé választottuk a két RFLP elvégzéséhez. Az rs3746544 SNP genotipizálására *Mnl* I emésztést végeztünk. A 603 bp hosszú PCR terméket ez az enzim minden esetben kétszer elhasította a kontroll helyeken, egy 166 és egy 319 bp hosszú terméket eredményezve. A maradék 118 bp hosszú szakasz T allél jelenlétében nem vágódott tovább, míg G allél esetében két kisebb termékre hasadt (47 és 71 bp). Így a két kontroll csík mellett homozigóta TT genotípus esetében egy 118 bp hosszú DNS-t, GG esetében egy 47 és egy 71 bp hosszú emésztett fragmentumot kaptunk, heterozigóta GT mintákban pedig mindhárom termék jelenléte megfigyelhető volt. (11A. ábra) A PCR termék másik felében *Dde* I emésztéssel vizsgáltuk az rs1051312 SNP-t. Ebben az esetben az amplikont az enzim egy kontroll helyen hasította el. T allél esetében csak itt vágott az endonukleáz, két terméket eredményezve (500 + 103 bp), C variáns jelenlétekor pedig az 500 bp-os DNS-molekula tovább hasadt egy 416 és egy 84 bp hosszú fragmentumra. Heterozigóta CT mintákban mind a három allélspecifikus termék megjelent (11B. ábra).

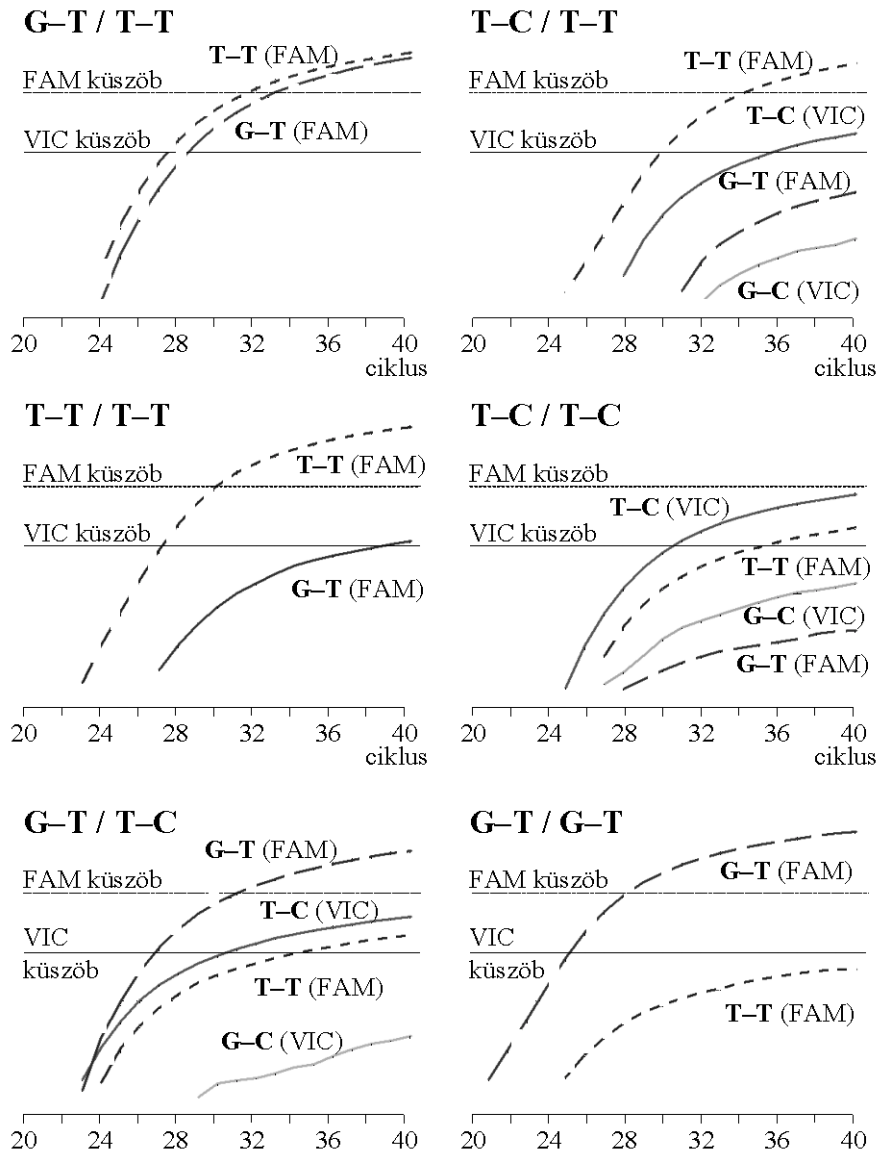


11. ábra. SNP-k genotipizálása. A: rs3746544 G/T SNP B: rs1051312 C/T SNP. M_1 és M_2 az alsó és a felső marker, amikhez a 12 párhuzamos elválasztás során a termékek hosszát hasonlítjuk. A kontroll (nem polimorf) emésztési termékek „K” rövidítéssel vannak jelölve, az elektroferogramok alatt lévő folyamatos és szaggatott nyilak az emésztett, illetve az emésztetlen termékeket jelölik. A minták genotípusai a görbék bal oldalán láthatók. Az alul lévő számok az allél-specifikus, a fönt láthatók pedig a kontroll termékek méretét mutatják bázispárban.

4.2.1.2 Az rs3746544 és rs1051312 polimorfizmusok haplotipizálása

A bemutatott genotipizáló módszer mellett kidolgoztunk egy új real-time PCR alapú eljárást a két polimorfizmus (rs3746544 és rs1051312) haplotípusának vizsgálatára. Ez a módszer nem csak a genotipizálás hatékonyságát növelte, hanem extra információt is szolgáltatott, mivel segítségével meghatározható az SNP-k haplotípusa, azaz a két allél relatív kromoszomális elhelyezkedése is. Ez az új módszer négy TaqMan próba alkalmazásán alapul, amelyek a négy lehetséges haplotípusra specifikusak (G–C, G–T, T–C és T–T, ahol az első betű a rs3746544 SNP, a második betű pedig az rs1051312 SNP megfelelő allélja). A „kétcsöves” módszert az előkísérletek során alkalmaztuk két különböző riporter festékkel (FAM és VIC). Minden mintát két csőben analizáltunk, melyek közül mindegyikben egy FAM-mal és egy VIC-kel jelölt próba volt jelen: az első reakcióelegy a T–T (FAM)- és T–C(VIC)-, a második reakcióelegy a G–T(FAM)- és G–C(VIC)-specifikus próbákat tartalmazta. A két reakciót együtt értékeltük a keletkezett amplifikációs görbék alapján. Mintánként egy vagy két próba kötött be specifikusan, és adott megfelelő, a küszöböt meghaladó jelet. Mivel a FAM erősebb

jelet ad, mint a VIC, a két festéknek két különböző küszöböt állítottunk be. A fentiek figyelembe vételével egyértelműen meg tudtuk határozni a minták haplotípusát. (12. ábra).



12. ábra. Real-time PCR alapú haplotípusizálás. Vonalak típusai: röviden szaggatott: T-T (FAM), hosszan szaggatott: G-T (FAM), folyamatos: T-C (VIC), szürke folyamatos: G-C (VIC). Egy jelet akkor fogadtunk el haplotípusra specifikusnak, ha a görbe elérte a megfelelő (FAM vagy VIC) küszöbértéket (vízszintes vonal). Az így megállapított haplotípus a görbék bal felső sarkában látható. (A „kétcsöves” rendszer két reakcióját egy grafikonon közösen ábrázoltuk.)

A „kétcsöves” módszerrel végzett előkísérleteink során a haplotípus frekvenciák meglepő eredményt mutattak (5. táblázat).

5. táblázat. Az rs3746544–rs1051312 SNP-k által képzett haplotípusok gyakorisága. Első oszlop: kisebb mintaszámon nyert adatok a „kétsőves” módszerrel ($N = 482$). Második oszlop: számolt haplotípus frekvenciák. Harmadik oszlop: A gazdaságosabb „egysőves” módszer eredményei (nagy mintaszám $N = 1376$)

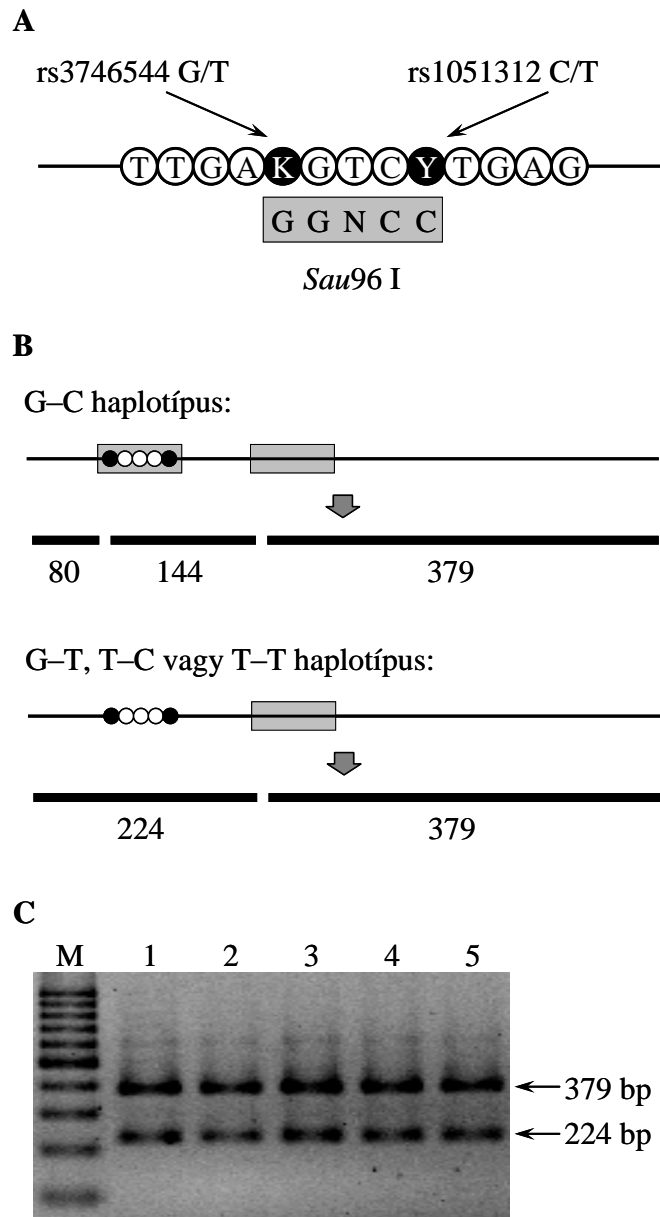
Haplotípus	Mért adatok („kétsőves” rendszer, $N = 482$)	Számolt adatok (PHASE)	Mért adatok („egysőves” rendszer, $N = 1376$)
GT	0,325	0,326	0,356
GC	0	0,000084	0
TT	0,415	0,414	0,400
TC	0,260	0,260	0,243

A két SNP esetében a ritka allél gyakorisága 0,35 (rs3746544 G allél) ill. 0,26 (rs1051312 C allél), így az egyes haplotípusok matematikai valószínűsége: G–C: 0,09, T–C: 0,17, G–T: 0,26 és T–T: 0,48. Ezzel szemben a G–C haplotípust egyetlen mintában sem sikerült azonosítani. A két SNP közelségére való tekintettel nem meglepő, hogy esetleges kapcsoltáguk miatt a mért értékek eltérnek a várttól. Eredményeink a kapcsoltág (LD) jellegzetes típusát mutatták. Teljes LD esetében a G–C haplotípussal együtt a T–T haplotípusnak is hiányoznia kéne, méréseink során viszont ez mutatta a leggyakoribb előfordulást (0,415, 5. táblázat)

4.2.1.3 A G–C haplotípus hiányának igazolása független módszerekkel

Két független módszert dolgoztunk ki annak igazolására, hogy a G–C haplotípus a vizsgált populációban valóban nem fordul elő, és hiánya nem a kidolgozott real-time PCR technika hibájából adódik. Elsőként a későbbre tervezett funkcionális mérésekhez készített konstrukciókat a „kétsőves” módszerrel haplotipizáltuk, és minden alkalommal – a G–C haplotípus esetében is – egyértelmű jelet kaptunk. Emelett a G–C haplotípus jelenlétét specifikus emésztéssel is vizsgáltuk. A *Sau96* I enzim a PCR terméket csak G–C haplotípus esetén emésztí (13A. ábra). Ahogy a 13C. ábrán láthajtuk, a *Sau96* I emésztéssel csak a kontroll fragmentum (379 bp) keletkezett a mintáinkban, ami igazolta az emésztés hatékonyságát, de a G–C esetén várt két kisebb termék (84 + 144 bp) egy minta esetében sem jelent meg (13C. ábra). Ezekkel a

kísérletekkel igazoltuk, hogy a G–C haplotípus valóban nem fordul elő az általunk vizsgált populációban.



13. ábra. A G–C haplotípus jelenlétének vizsgálata *Sau96 I* RFLP-vel. **A:** A módszer elve. A *Sau96 I* felismerési helye a G–C haplotípusban van jelen (szürke téglalap). **B:** A PCR amplicon egy kontroll hasítási helyet tartalmaz, így egy genotípustól független termék (379 bp) és G–T, T–C vagy T–T haplotípus esetén egy emésztetlen (224 bp) haplotípus specifikus fragmentum keletkezik. G–C haplotípus esetén két emésztett termék (80 bp, 144 bp) megjelenése várható. **C:** 5 minta reprezentatív agaróz gél elektroforetikus képe.

4.2.1.4 A három haplotípus egy reakcióelegyben történő vizsgálata

Az elméleti haplotípus gyakoriságok meghatározására Bayes-i statisztikai módszert alkalmaztunk a PHASE v2.1 software segítségével, ami a populáció genotípus adataiból állít elő információt a haplotípusra vonatkozóan (Stephens és Donnelly 2003). A számítások azon eredményeinken alapultak, amiket 482 fő esetén kaptunk a „kétcsöves” rendszerrel. A kapott értékeket mutatja be az 5. táblázat 2. oszlopa. A G–C haplotípus számított frekvencia értéke igen alacsonynak (0,000084) bizonyult, ami azt jelenti, hogy ez a kombináció – várhatóan – heterozigóta formában minden 5952. személynél fordul csak elő. Ezen adat ismeretében a haplotípus meghatározó technikát továbbfejlesztettük úgy, hogy a – gyakorlatilag nem létező – G–C haplotípus elemzését kihagytuk a rendszerből. Az alkalmazott real-time berendezés lehetővé tette, hogy a ROX fluoreszcens festék mellett, ami belső referenciaként szolgál, további három riporter festéket detektáljunk egyidejűleg. Ezért egy multiplex, idő- és költséghatékony módszerrel egyszerre vizsgáltuk a három lehetséges haplotípust három különböző riporter festékekkel: a TT-specifikus próbát FAM-mal, TC-specifikust VIC-kel, a GT-specifikust pedig NED-del jelöltük. Az így beállított „egycsöves” rendszerrel 1376 minta haplotipizálását végeztük el, eredményünket az 5. táblázat utolsó oszlopa tartalmazza. Látható, hogy a kapott haplotípus frekvenciák jól egyeznek mind a PHASE-zel számolt, mind a „kétcsöves” módszerrel mért értékekkel. A χ^2 -statisztika nem mutatott szignifikáns különbséget a három módszerrel kapott eredmény között ($\chi^2 = 2,62$, $df = 6$, $p = 0,85$). Meg kell azonban jegyezni, hogy az „egycsöves” módszernél, habár nagyon kis százalékban, de előfordulhat a G–C haplotípus elvesztése. Ennek kiküszöbölésére két lehetőség van. Megfelelő real-time PCR készülékkel, ami öt festék egyidejű detektálására alkalmas, elméletileg vizsgálható a négy haplotípus egyszerre, amennyiben négy különböző festékekkel vannak jelölve a specifikus próbák. A másik lehetőség a real-time PCR termékek *Sau96* I RFLP analízise, hiszen ezzel a módszerrel specifikusan azonosítani lehet a G–C haplotípus jelenlétét. Meg kell jegyezni, hogy ez a lépés csak a homozigóta minták esetében szükséges (T–T/T–T; G–T/G–T vagy T–C/T–C – kb. a minták egyharmada), mert az összes többi esetben két jel detektálható, tehát a G–C variáció jelenléte nem lehetséges (nem lehet három különböző haplotípusa egy személynek).

4.2.2 A *WFS1* gén mikroRNS kötőhelyeinek polimorfizmusai

4.2.2.1 Az rs1046322 pszichogenetikai asszociáció analízise

A pszichogenetikai vizsgálat egészséges, fiatal személyekkel történt. A vizsgálat során szájnyalakahártya mintákat vettünk, és minden résztvevő három különböző kérdőívet töltött ki, melyek kiértékelése során az agresszió (Buss-Perry agresszió kérdőív), az impulzivitás (BIS-11 impulzivitás kérdőív), és a hangulati élet (szorongás és depresszió skálák a HADS kérdőív alapján) kvantitatív mérőszámait kaptuk meg. A szájnyalakahártyákból DNS-t izoláltunk a résztvevők *WFS1* polimorfizmusainak meghatározása céljából.

6. táblázat. A vizsgálatban szereplő SNP-k. MAF: Minor allél (a kevésbé gyakori allél) gyakorisága (minor allele frequency).

dbSNP szám	Genomi pozíció	SNP-k távolsága (bp)	SNP típusa	MAF
rs10002743	6276581		1. intron	0,191
rs6824720	6278647	2066	1. intron	0,159
rs752854	6281961	3314	2. intron	0,310
rs4689393	6287241	5280	2. intron	0,435
rs10010131	6292915	5674	3. intron	0,391
rs13147655	6293474	559	5. intron	0,384
rs4467645	6294305	831	6. intron	0,394
rs13128674	6294517	212	6. intron	0,409
rs6446482	6295693	1176	6. intron	0,398
rs4689395	6295985	292	6. intron	0,359
rs28716718	6301910	5925	7. intron	0,053
rs1801208	6302889	979	8. exon (p.R456H)	0,050
rs734312	6303354	465	8. exon (p.H611R)	0,462
rs1046316	6304087	733	8. exon (p.S855S)	0,341
rs1046320	6304344	257	3' UTR	0,403
rs1046322	6304448	104	3' UTR	0,099
rs9457	6304799	351	3' UTR	0,433

A *WFS1* gén területén számos SNP található, a jelen vizsgálatra 17 polimorfizmust választottunk ki (6. táblázat). Az SNP szelekció egyik fontos kritériuma a gén maximális lefedettsége volt. Másrészt fontos szempont volt annak a két miRSNP-nek (rs1046322 és rs9457) a vizsgálata, melyek *in silico* adatok szerint két, különböző

mikroRNS (miR-668 és miR-185) kötődését változtatják meg. Lényeges kritérium volt továbbá, hogy a ritkább allél frekvenciája (MAF, minor allele frequency) 5% felett legyen, az ennél ritkábban előforduló allélok vizsgálatának ugyanis nincs elég erős statisztikai ereje az alkalmazott elemszámnál. Ha volt olyan exon polimorfizmus, melynek várható MAF értéke 5% felett volt, azokat is igyekeztük beválasztani.

7. táblázat. A vizsgált SNP-k genotípus eloszlása. N: esetszám, %: genotípus gyakoriság %-os értéke, p: a Hardy-Weinberg egyensúlynak megfelelés valószínűsége.

<i>dbSNP szám</i>	<i>genotípus</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>Hardy–Weinberg egyensúly</i>	<i>Genotipizálás hatékonysága</i>
rs10002743	AA	452	66,3%	$p = 0,33$	85,14%
	AG	199	29,2%		
	GG	31	4,5%		
rs10010131	GG	242	38,3%	$p = 0,44$	78,78%
	AG	285	45,2%		
	AA	104	16,5%		
rs1046316	GG	221	44,4%	$p = 0,61$	62,17%
	AG	214	43,0%		
	AA	63	12,6%		
rs1046320	AA	294	36,8%	$p = 0,40$	99,75%
	AG	366	45,8%		
	GG	139	17,4%		
rs1046322	GG	652	81,4%	$p = 0,89$	100,00%
	AG	140	17,5%		
	AA	9	1,1%		
rs13128674	TT	193	36,0%	$p = 0,61$	66,92%
	CT	248	46,3%		
	CC	95	17,7%		
rs13147655	GG	251	38,7%	$p = 0,76$	81,02%
	AG	298	45,9%		
	AA	100	15,4%		
rs1801208	GG	630	90,5%	$p = 0,21$	86,89%
	AG	62	8,9%		
	AA	4	0,6%		
rs28716718	CC	622	89,9%	$p = 0,32$	86,39%
	CG	66	9,5%		
	GG	4	0,6%		
rs4467645	TT	262	37,9%	$p = 0,47$	86,39%
	CT	315	45,5%		
	CC	115	16,6%		

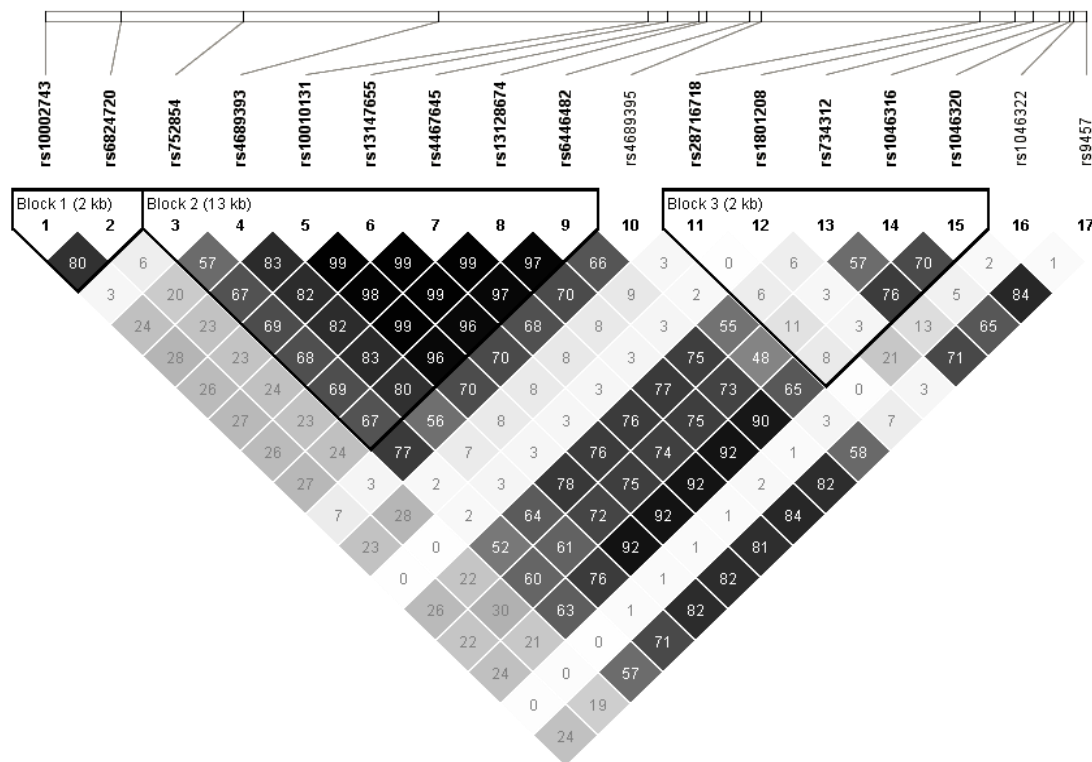
rs4689393	CC	218	32,9%	$p = 0,59$	82,77%
	CT	313	47,2%		
	TT	132	19,9%		
rs4689395	AA	280	41,9%	$p = 0,62$	83,40%
	AG	296	44,3%		
	GG	92	13,8%		
rs6446482	GG	243	37,1%	$p = 0,68$	81,77%
	CG	303	46,3%		
	CC	109	16,6%		
rs6824720	GG	482	71,2%	$p = 0,70$	84,52%
	AG	175	25,8%		
	AA	20	3,0%		
rs734312	AA	196	29,0%	$p = 1,00$	84,39%
	AG	336	49,7%		
	GG	144	21,3%		
rs752854	TT	262	48,0%	$p = 0,89$	68,16%
	CT	229	41,9%		
	CC	55	10,1%		
rs9457	CC	253	34,1%	$p = 0,11$	92,63%
	CG	336	45,3%		
	GG	153	20,6%		

A polimorfizmusok genotipizálását real-time PCR elven működő OpenArray rendszerrel végeztük összesen 801 mintán. A vizsgálatban szereplő 17 polimorfizmus fő jellemzőit a 6. táblázat foglalja össze. Két mért SNP közti átlagos távolság 1764 bp volt. A legtöbb SNP intronban helyezkedett el, de a leghosszabb (8.) exonból sikerült 3 olyan SNP-t választanunk, melynek várható MAF értéke 5% felett volt. A 6. táblázatban feltüntetett MAF értékeket a 7. táblázatban bemutatásra kerülő genotípus gyakoriságokból számoltuk.

A 7. táblázatban az egyes SNP-k mért genotípus gyakorisága látható. Ezen értékek alapján számítottuk ki az allél frekvenciákat, a 6. táblázatban a ritkább allél gyakoriságát (MAF) tüntettük fel (a gyakoribb allél frekvenciája = $1 - \text{MAF}$). Az így kapott adatokból számoltuk ki az elméletileg várható genotípus gyakoriságokat, a Hardy–Weinberg egyensúly alapján. A 7. táblázat p értékei azt mutatják meg, hogy szignifikáns-e az eltérés a várható és a mért genotípus gyakoriságok között. Amint az adatokból látható, egyik esetben sem kaptunk szignifikáns eltérést, ami a genotípus adatok megbízhatóságát és a populáció homogenitását mutatja. A 7. táblázatban szerepelnek még a genotipizálási hatékonyságok, melyek egyrészt az OpenArray rendszeren mért eredményekből származnak, másrészt kiegészültek egyedi valós-idejű

PCR mérésekkel azokban az esetekben, ahol fontos volt a maximális hatékonyság a statisztikai analízis szempontjából. Ilyen volt például az rs1046322 miRSNP, melynek ritka homozigóta formájának jelentősége indokolta a 100%-os genotipizálási hatékonyság elérését.

A polimorfizmusok kapcsoltsági viszonyait (LD) a Haploview 4.2 program segítségével jellemeztük. A 14. ábrán látható, hogy a *WFS1* gén régióban vizsgált polimorfizmusok többsége három blokkba csoportosul, azonban a feltételezett miRSNP-k egyikbe sem esnek bele.



14. ábra. A *WFS1* gén vizsgált SNP-inek kapcsoltsági viszonyai. A számok az SNP párok R^2 % értékét mutatják, a szürke skála színei a kapcsoltság erősségét jelölik (fekete: teljes kapcsoltság: $R^2 = 100\%$, fehér: nem kapcsolts: $R^2 = 0\%$).

A genetikai asszociáció vizsgálat során az egyes genotípus kategóriákban kapott pszichológiai paraméterek átlagát vetettük össze a genotípussal minden SNP esetében. A 8. táblázatban szerepelnek az egyes genotípusokhoz tartozó átlagpontszámok, valamint az ANCOVA statisztikai módszerrel kapott eredmények. Az ANCOVA analízis során a nemet és a kort használtuk kovariánsként. Minden polimorfizmus esetében – a recesszív modellt követve – a ritka homozigóták átlagpontszámait

hasonlítottuk a gyakori allélt hordozók értékeihez. A táblázatban a polimorfizmusok a kapott szignifikanciaszint szerinti sorrendben szerepelnek.

Az első haploblokkból két, szorosan kapcsolt SNP adott szignifikáns asszociációt a depresszióval: rs10002743 [$F(1,678) = 6,777, p = 0,009, \eta^2 = 0,01, er\ddot{o} = 0,739$] és rs6824720 [$F(1,673)=6,789, p = 0,009, \eta^2 = 0,01, er\ddot{o} = 0,740$].

A két miRSNP közül csak az rs1046322 esetében kaptunk szignifikáns kapcsolatot a genotípus és a mért fenotípus között. Az AA homozigóta genotípussal rendelkező személyek magasabb pontszámot értek el valamennyi skálán, mint a gyakoribb G allélt hordozók, statisztikailag szignifikáns asszociációt adva az agresszióval [$F(1,797) = 12,241, p = 0,0005, \eta^2 = 0,015, er\ddot{o} = 0,938$], impulzivitással [$F(1,791)=6,362, p=0,012, \eta^2 = 0,008, er\ddot{o} = 0,712$], szorongással [$F(1,797) = 7,801, p = 0,005, \eta^2 = 0,010, er\ddot{o} = 0,797$] és depresszióval [$F(1,797) = 5,074, p = 0,025, \eta^2 = 0,006, er\ddot{o} = 0,614$].

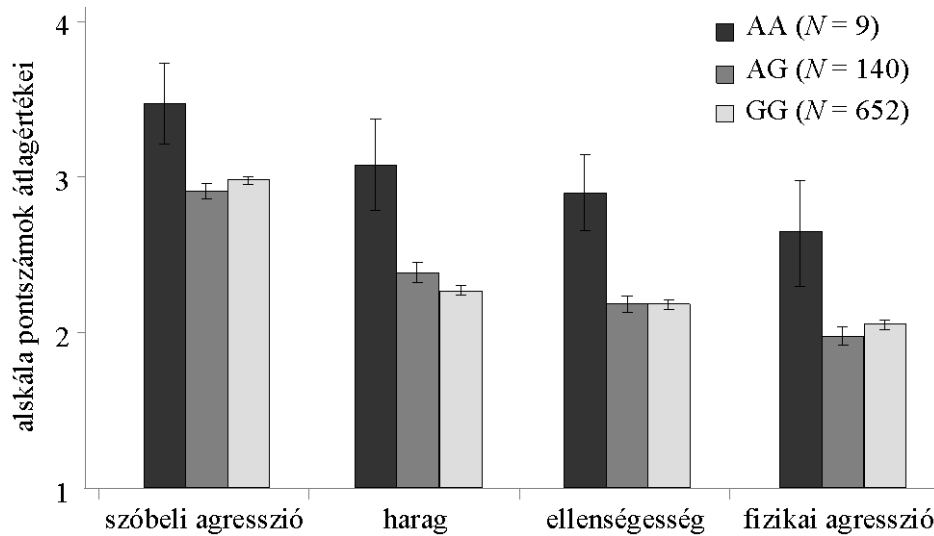
Megjegyzendő, hogy a vizsgált négy pszichológiai paraméter között meglehetősen szoros kapcsolat áll fenn. Az agresszió erős korrelációt mutatott az impulzivitással ($r = 0,43$) és szorongással ($r = 0,41$), és valamivel gyengébb kapcsolat a depresszióval ($r = 0,37$) is megfigyelhető volt. Az impulzivitás a szorongással ($r = 0,27$) és a depresszióval ($r = 0,25$) mutatott összefüggést. A legerősebb korrelációt a szorongás és depresszió adta ($r = 0,57$). Így nem meglepő, hogy ugyanaz az SNP mind a négy fenotípusra hatással van.

Mivel 17 SNP-t és 4 fenotípust vizsgáltunk, a többszörös tesztelésből adódó álpozitív hiba elkerülése céljából az eredmények értékelése során a Bonferroni-korrekción alkalmaztuk: $p = 0,05$ helyett $0,05 / (17 \cdot 4) = 0,0007$ -et használtunk a szignifikancia küszöbértékeként. A többszörös tesztelés figyelembe vétele után csak az rs1046322 polimorfizmus agresszióval mutatott asszociációja maradt statisztikailag szignifikáns. Azon személyek, akik homozigóták az rs1046322 miRSNP ritka alléljára nézve, szignifikánsan magasabb pontszámot értek el az agresszió kérdőíven (átlagpontszám: 85,8) a gyakori allélt hordozókhöz képest (átlagpontszám: 66,4). Annak tisztázásához, hogy ez a szignifikáns eredmény az agresszió mely alszkalájával függ össze, a statisztikai analízist az agresszió alszkaláira is elvégeztük. Mind a 4 dimenzió esetében lényegesen magasabb értékeket kaptunk az AA genotípussal rendelkezők között a G allélt hordozókhöz képest (15. ábra).

8. táblázat. Asszociáció vizsgálat a WFSI genotípusok és személyiségjegyek között. A 17 vizsgált SNP mind a négy jellemző esetében a kapott szignifikancia értékek sorrendjében látható. A szignifikáns eredményeket vastag betűvel emeltük ki. A számok az adott kérdőív átlagpontszámai genotípusonként feltüntetve. **MM:** gyakori allél homozigóta **Mm:** heterozigóta **mm:** ritka allél homozigóta. **p**:** ANCOVA (Analysis of Covariance) módszerrel számolt nominális p érték (recesszív modell), *****: szignifikáns érték Bonferroni korrekció után.

AGRESSZIÓ (Buss-Perry)					IMPULZIVITÁS (BARRAT)				
WFSI SNP	(MM)	(Mm)	(mm)	p**	WFSI SNP	(MM)	(Mm)	(mm)	p**
rs1046322	66,4	66,3	85,8	0,0005*	rs1046322	58,6	59,1	66,9	0,0119
rs10010131	66,8	66,2	64,8	0,3542	rs10002743	58,3	59,8	61,1	0,2133
rs28716718	66,5	66,8	72,2	0,496	rs6824720	58,8	59,7	61,6	0,2611
rs9457	66,3	67,3	65,8	0,5462	rs1046316	58,8	58,2	59,7	0,3845
rs6824720	66,4	67,1	64,1	0,5821	rs4689393	58,0	59,4	59,4	0,518
rs1801208	66,6	68,5	72,5	0,598	rs752854	58,6	58,8	57,9	0,5744
rs13147655	66,6	67,4	66,1	0,7131	rs10010131	58,1	59,8	58,5	0,6086
rs4467645	66,5	67,2	66,2	0,7985	rs1046320	58,1	59,3	58,4	0,6323
rs6446482	66,3	67,3	67,0	0,8364	rs13128674	58,1	58,8	59,0	0,6345
rs4689395	66,6	66,6	67,0	0,8654	rs9457	57,8	59,2	58,2	0,6403
rs10002743	66,2	68,1	66,1	0,8711	rs6446482	57,8	59,4	59,1	0,6555
rs752854	67,5	66,5	66,8	0,8727	rs28716718	58,8	59,9	57,0	0,6773
rs13128674	66,9	67,4	67,2	0,8759	rs734312	58,7	58,8	58,9	0,8644
rs1046316	67,3	67,5	66,4	0,879	rs4689395	58,6	59,2	59,0	0,9261
rs1046320	66,9	66,5	66,3	0,8793	rs1801208	59,0	58,0	59,0	0,938
rs734312	66,0	67,4	66,5	0,9215	rs4467645	58,3	59,4	58,9	0,9656
rs4689393	66,2	67,5	66,6	0,9975	rs13147655	57,9	59,4	58,7	0,9993

SZORONGÁS (HADS)					DEPRESSZIÓ (HADS)				
WFSI SNP	(MM)	(Mm)	(mm)	p**	WFSI SNP	(MM)	(Mm)	(mm)	p**
rs1046322	5,6	5,8	8,8	0,0053	rs10002743	2,5	2,7	3,8	0,0094
rs1801208	5,6	5,9	7,8	0,1544	rs6824720	2,5	2,7	4,1	0,0094
rs1046320	5,7	5,8	5,3	0,1697	rs1046322	2,6	2,7	4,7	0,0246
rs10010131	5,8	5,9	5,4	0,207	rs28716718	2,6	2,8	3,8	0,3753
rs10002743	5,7	5,7	6,5	0,3196	rs734312	2,6	2,6	2,8	0,4407
rs6824720	5,7	5,6	6,7	0,3235	rs6446482	2,5	2,6	2,8	0,4933
rs13147655	5,7	5,7	5,5	0,4438	rs1046320	2,7	2,7	2,5	0,5612
rs28716718	5,6	5,7	7,0	0,5337	rs13128674	2,7	2,7	2,9	0,6256
rs9457	5,4	5,8	5,5	0,6373	rs4689393	2,4	2,7	2,7	0,6312
rs752854	5,7	5,5	5,3	0,6456	rs4467645	2,6	2,6	2,7	0,6657
rs4467645	5,6	5,8	5,6	0,6563	rs13147655	2,6	2,7	2,8	0,7246
rs4689395	5,7	5,7	5,5	0,7063	rs10010131	2,6	2,5	2,7	0,7347
rs13128674	5,5	5,6	5,6	0,851	rs1046316	2,7	2,7	2,8	0,836
rs6446482	5,5	5,7	5,6	0,853	rs4689395	2,6	2,6	2,7	0,9011
rs734312	5,6	5,7	5,7	0,9185	rs1801208	2,6	2,7	2,8	0,9045
rs4689393	5,5	5,7	5,6	0,9226	rs9457	2,6	2,8	2,7	0,9249
rs1046316	5,5	5,6	5,6	0,9628	rs752854	2,7	2,6	2,6	0,9468



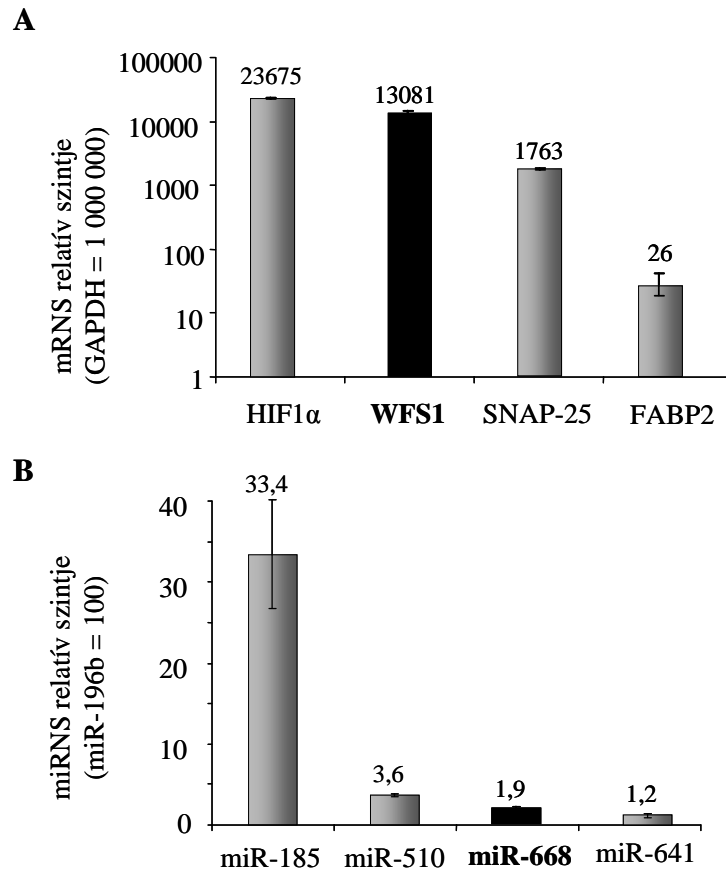
15. ábra. Az rs1046322 SNP ritka homozigóta (AA) genotípusának hatása a Buss-Perry agresszió kérdőív alskáláira. Az Y tengelyen az agresszió négy alskálájának genotípus kategóriánként számolt átlagértékei szerepelnek, az átlag szórását függőleges vonalakkal jelöltük.

4.2.2.2 Az rs1046322 funkcionális vizsgálata

Az rs1046322 polimorfizmus és az agresszió közötti asszociáció alapján feltételezhető, hogy a *WFS1* gén szerepet játszik a fenotípus kialakításában: Ezzel kapcsolatban felvetődik a kérdés, hogy mi lehet az SNP biológiai szerepe. *In silico* eredmények azt mutatták, hogy ez a polimorfizmus a miR-668 kötődését érinti, de funkcionális vizsgálatok ezirányban korábban nem születtek. Ezért igazolni kívántuk, hogy az SNP hatására valóban megváltozik-e a mikroRNS kötődése a 3' UTR-hez. Ennek vizsgálatára luciferáz riporter gén rendszert alkalmaztunk. Kétféle vektorral (pMIR és pGL3C) létrehoztunk négy-négy különböző konstrukciót, melyek közül három tartalmazta a *WFS1* gén 3' UTR szakaszát a luciferáz gén mögött, a negyedik pedig egy teljesen más, hasonló hosszúságú DNS szakaszt. Az első három konstrukció közül kettő csak egyetlen bázisban, az általunk vizsgált SNP-ben különbözött egymástól, a harmadikban a mikroRNS seed szekvenciájával komplementer 7 bázist cseréltük ki. Ezen túlmenően egy további konstrukciót is létrehoztunk, ami az általunk vizsgált miR-668-at expresszálta.

Elsőként a transzfektálandó HEK293 sejtek endogén mRNS és miRNS szintjére voltunk kíváncsiak. Irodalmi adatok alapján tudtuk, hogy ezen sejtek expresszálják a wolframint, amit mi is detektáltunk (16A. ábra), de a mikroRNS vonatkozásában nem

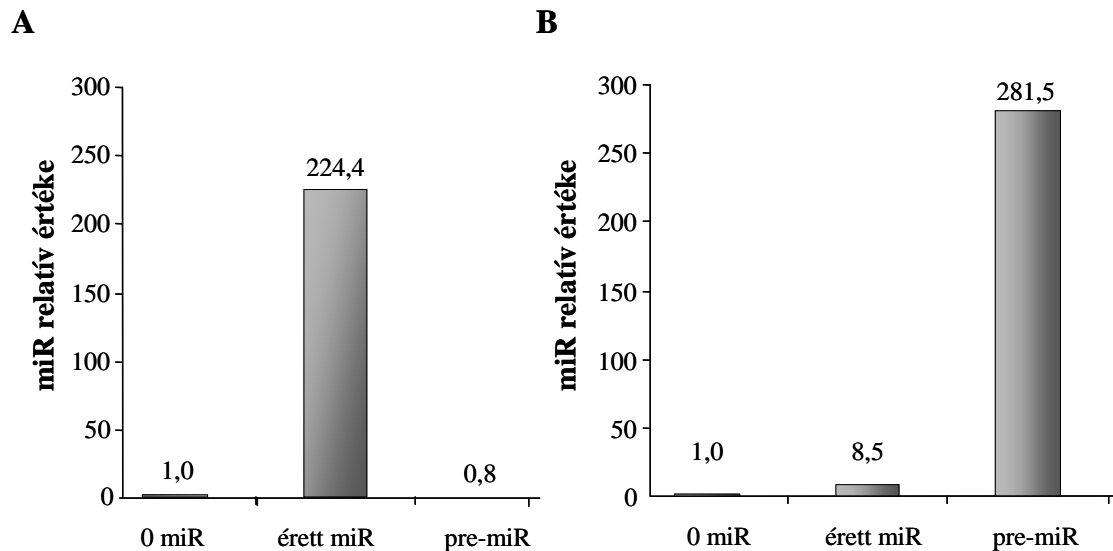
születtek eredmények, így tudnunk kellett, hogy a sejtek expresszálják-e, és ha igen, akkor milyen relatív mennyiségben. A 16. ábrán látható, hogy a mikroRNS detektálható, de a miR-196b szintjéhez viszonyítva kis mennyiségben.



16. ábra. Endogén mRNA és miRNA szintek a HEK-293 sejtvonalban. A: endogén mRNA szintek a *GAPDH* (glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz) szintjéhez viszonyítva. *HIF1 α* : hipoxia indukált faktor 1 α , *FABP2*: fatty acid binding protein 2, *WFS1*: Wolfram syndrome 1, *SNAP-25*: synaptosomal-associated protein, 25kDa. B: endogén mikroRNS szintek a miR-196b-hez viszonyítva.

Ezen túlmenően fontos volt annak tisztázása, hogy ha kívülről juttatjuk be a mikroRNS-t, akkor annak hogyan változik meg a szintje. miRNS-t kétféle képpen lehet a sejtbe juttatni: (1) vagy magát a prekursor miRNS-t transzfektáljuk, vagy (2) egy pre-miRNS-t expresszáló vektort. Mi mindkét lehetőséget kipróbáltuk, és a transzfekció után mértük mind a prekursor, mind az érett miR-668 szintjét. (17. ábra). Abban az esetben, amikor pre-miRNS-sel transzfektáltuk a sejteket, az érett miR-668 szintje az endogén szinthez képest több, mint 200-szorosára emelkedett és a prekursor szint

elhanyagolható volt (17A. ábra). Tehát a sejtek felvették a pre-miRNS-t, és érett miRNS-sé alakították. Ezzel ellentétben a miRNS-t expresszáló vektor transzfektálása után a prekursor szint nőtt többszázszorosra, de alig keletkezett érett miRNS (17B. ábra). Ennek ismeretében a továbbiakban a miRNS-t expresszáló vektort nem, csak pre-miRNS-t alkalmaztuk transzfektáláskor.

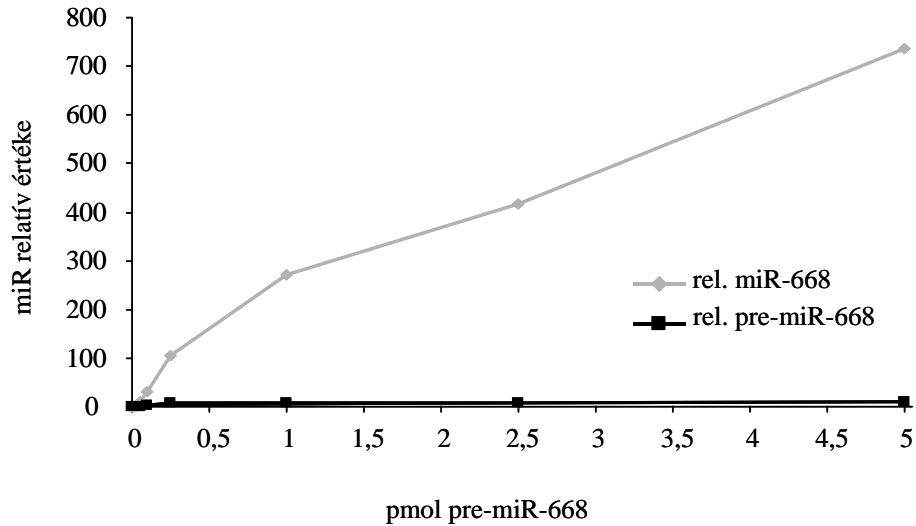


17. ábra. Prekursor és érett miR-668 szintek miRNS transzfektálása után.

A: pre-miR transzfekció. 1. oszlop: nem transzfektáltuk a sejteket, az endogén miR-668 szint 1 egység. 2. oszlop: transzfekció után az érett miR-668 szint 224,4-szeresre emelkedik. 3. oszlop: pre-miR szint alig mérhető, az endogén szint 0,8-szorosa. B: miRNS-t expresszáló vektor transzfekciója. 1. oszlop: nem transzfektáltuk a sejteket, az endogén miR-668 szint 1 egység. 2. oszlop: transzfekció után az érett miR-668 szint 8,5-szörösre emelkedett. 3. oszlop: A pre-miR szint 281,5-szörösre emelkedett.

A transzfekciós kísérletek során fontos volt annak ismerete, hogy mennyi az az ideális konstrukció és miRNS mennyiség, amivel a transzfektálás során a sejteket a lehető legkevésbé terheljük meg, de értékelhető eredményt kapunk. Ehhez hígítási sort készítettünk mind a mikroRNS-ből (18. ábra), mind a transzfektálandó konstrukciókból (19. ábra). A pre-miR-668-ból 0 pmol és 5 pmol közötti tartományban 6 hígítást készítettünk, majd transzfektálás után mértük a sejt pre-miR és érett miR szintjét. A 18. ábrán látható, hogy az érett miRNS szint lineárisan emelkedik ebben a tartományban, míg a prekursor szint gyakorlatilag nulla marad. A későbbi transzfekciós kísérletekhez

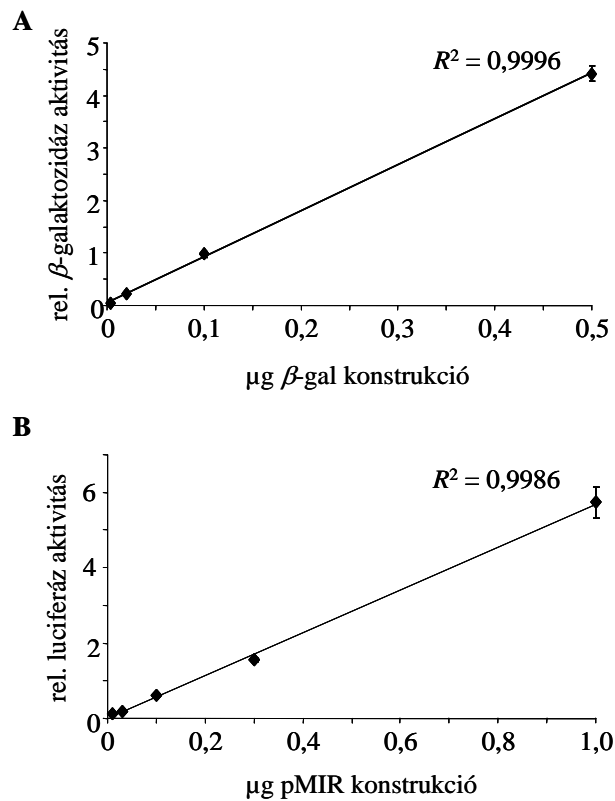
az 5 pmol mennyiséget választottuk, mely megfelel az irodalomban általánosan használt mennyiségnek.



18. ábra. Pre-miR-668 hígítási sor. Szürke görbe: érett miR-668 relatív szintje, fekete görbe: prekursor miR-668 relatív szintje az egyre emelkedő mennyiségű pre-miR-668 transzfektálása során.

A luciferáz riporter gént tartalmazó pMIR konstrukció esetén öt hígítási pontot készítettünk 0 és 1 μg között. A belső kontrollként használt β -galaktozidázt tartalmazó konstrukciót pedig 0–0,5 μg tartományban vizsgáltuk. A 19. ábrán látható, hogy mindkét esetben a lineáris tartományba estek a vizsgált pontok, tehát ebben a tartományban megbízható eredményekhez juthatunk. (Hasonló eredményt kaptunk a pGL3C tartalmú konstrukciók esetében is.) A luciferáz gént tartalmazó konstrukció esetében a 0,1 μg -t, míg a β -galaktozidázt tartalmazó konstrukciónál 0,2 μg -ot választottuk a további kísérleteinkhez.

Elsőként arra a kérdésre kerestünk választ, hogy a miR-668 valóban bekötődik-e a *WFS1* 3' UTR-hez, és hatással van-e a transzlációra. Ehhez háromféle, pMIR vektort tartalmazó konstrukcióval valamint a pre-miR-668-cal transzfektáltuk a sejteket. Az egyik konstrukció a seeddel teljesen komplementer target szekveniciát tartalmazta (G allélt tartalmazó vad típus), a második konstrukció a mutált targetet (seed mutáns), a harmadik pedig a *WFS1*-től független 3' UTR-t tartalmazta.

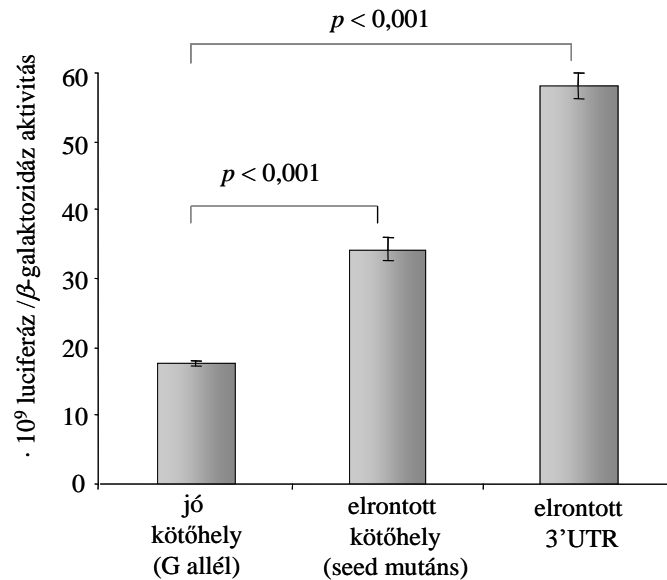


19. ábra. β -galaktozidáz és luciferáz gént tartalmazó konstrukciók hígítási sora. A: β -galaktozidáz B: luciferázt tartalmazó pMIR konstrukció.

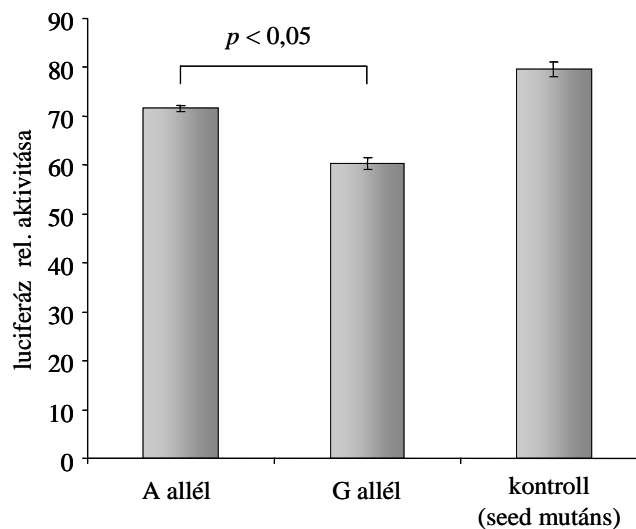
A 20. ábrán láthatjuk, hogy a jó kötőhelyet tartalmazó konstrukció (vad típus) esetében mértük a legalacsonyabb relatív luciferáz aktivitást, míg a 8 bázisban eltérő seed mutáns közel kétszeres jelet adott és a teljesen más szekvenciát tartalmazó konstrukció pedig a vad típus háromszorosát. Ez alapján elmondhatjuk, hogy a miR-668 valóban beköt a WFS1 mRNS-hez és csendesíti a transzlációt. Amennyiben a kötődésért felelős 8 bázist elrontjuk, a miRNS hatása gyengül, több fehérje keletkezik (20. ábra középső oszlopa), de még így is valamennyire képes az mRNS-hez kötődni, mert abban az esetben, ha a kötőhely és környéke nincs jelen, még magasabb luciferáz aktivitás mérhető (20. ábra jobb oldali oszlopa).

Számunkra azonban – ezen túlmenően – az volt a fő kérdés, hogy az SNP által létrejött egyetlen bázis cseréje okoz-e különbséget a miRNS mRNS-hez való kötődésében. Ennek vizsgálatára szintén három különböző pMIR tartalmú konstrukcióval és a miR-668-cal transzfektáltuk a sejteket. A konstrukciók közül kettő csak egyetlen bázisban tért el egymástól: a vizsgált polimorfizmus G (vad) illetve A allélját tartalmazták. A harmadik, kontroll pedig a seed mutáns volt. (21. ábra) A két

allél között szignifikáns különbséget kaptunk, miszerint A allélnál magasabb relatív luciferáz jel mérhető, mint G allél esetén.

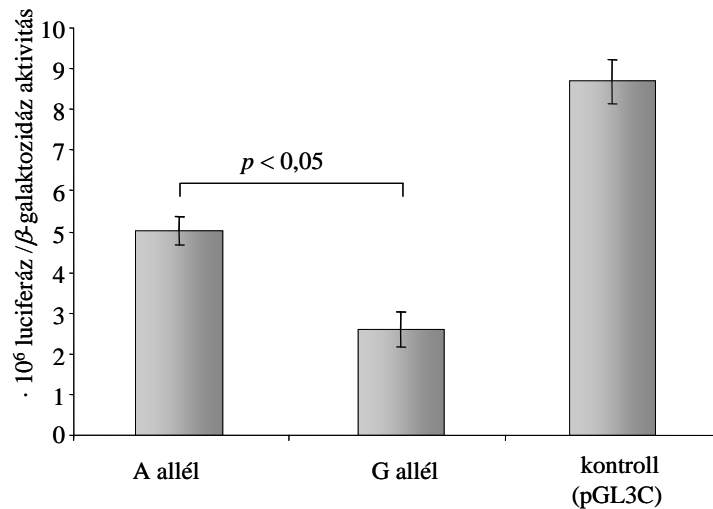


20. ábra. miR-668 kötődése a WFS1 3' UTR-hez *in vitro* riporter gén rendszerben. 3 különböző pMIR riporter vektort tartalmazó konstrukció (jó és elrontott kötőhelyet valamint elrontott 3' UTR-t tartalmazó) és 5 pmol miR-668 transzfektálása után kapott relatív luciferáz aktivitás értékek.



21. ábra. Rs1046322 SNP hatása a miR-668 kötődésére a WFS1 3' UTR-hez luciferáz riporter rendszerben. 3 különböző pMIR riporter vektort tartalmazó konstrukció (A allélt, G allélt és seed mutánst tartalmazó) és 5pmol miR-668 transzfektálása után kapott relatív luciferáz aktivitás értékek.

A jelenséget megvizsgáltuk más riporter vektort tartalmazó konstrukciókkal is. Hasonlóan a fenti elrendezéshez, három különböző konstrukcióval (A allél, G allél, kontroll) transzfektáltuk a sejteket, csak itt pGL3C vektort tartalmaztak a konstrukciók. (22. ábra) Ebben az esetben is szignifikáns eltérés mutatkozott a két allélt hordozó konstrukciónál: az A allélnál közel kétszer akkora relatív luciferáz jelet mértünk, mint G allél jelenlétében.



22. ábra. rs1046322 SNP hatása a miR-668 kötődésére a WFS1 3' UTR-hez luciferáz riporter rendszerben. 3 különböző pGL3C riporter vektort tartalmazó konstrukció (A allélt, G allélt és seed mutánst tartalmazó) és 5pmol miR-668 transzfektálása után kapott relatív luciferáz aktivitás értékek.

A kapott eredmények azt mutatják, hogy a vizsgált polimorfizmus által okozott egyetlen bázis cseréje – az *in silico* adattal összhangban – megváltoztatja a miR-668 kötődését a WFS1 3' UTR-jéhez. A ritkább A allél elrontja a miRNS felismerési helyét, és így kevésbé kötődik a target szekvenciájához. G allél esetén tökéletes a kapcsolódás, és a miRNS nagyobb mértékben képes kifejteni a translációra gyakorolt gátló hatását.

5 Megbeszélés

5.1 A *GSK3B* gén kópiaszám variációi és a bipoláris depresszió

A major és bipoláris depresszió egyre gyakoribb a fejlett országokban: az Egészségügyi Világszervezet (WHO) előrejelzése szerint 2020-ra a kóros kedélyállapot a második leggyakoribb munkaképtelenséget okozó betegségnek számít majd. Ezen becslés is alátámasztja, mennyire fontos a kórkép biológiai hátterének megismerése, hiszen ez jelentősen segítené a patomechanizmus megismerését, mely a gyógyítás és a prevenció hatékonyságának növeléséhez szükséges. Az elmúlt évek során genetikai vizsgálatokkal számos, a depresszió létrejöttéhez kapcsolódó biológiai útvonalat azonosítottak, köztük kiterjedten vizsgálták a *GSK3B* gén polimorfizmusait is (Hur és Zhou 2010). A gén leggyakrabban vizsgált SNP-je az rs334558 C/T promoter polimorfizmus. Egyes tanulmányokban kimutatták, hogy a C allélt hordozó bipoláris depressziós betegeknél a betegség később manifesztálódik (Benedetti és mtsai 2004). Azt is leírták, hogy a C allélt hordozók jobban reagáltak a lítium terápiára (Adli és mtsai 2007). A C allél védő szerepével ellentétes eredményeket kapott Szczebankiewicz csoportja, akik arról számoltak be, hogy ez az allél gyakoribb a II. típusú bipoláris depresszióban szenvedő nők körében (Szczebankiewicz és mtsai 2006). A fenti polimorfizmus haplotípus vizsgálata során asszociációt mutattak ki az rs334558 polimorfizmus és az 5. intronban lévő rs6438552 SNP T–T haplotípusa és a Parkinson-kór között (Kwok és mtsai 2005). Alzheimer-kórral állt asszociációban a 2. intronban található A/G SNP A allélja (Schaffer és mtsai 2008). Az 1. intronban lévő rs334555 SNP a major depresszió manifesztációjával mutatott összefüggést, a G allélt hordozók között fiatalabb korban jelentkezett a betegség (Saus és mtsai 2010). Az 1. intron a gén promoterével kapcsolatos, így az rs334558 SNP-vel is, ami a transzkripciós aktivitást befolyásolja, illetve az rs334558 a 3' irányban lévő rs6438552 SNP-vel mutat kapcsoltságot ($D' = 0,67$), ami pedig splice-variánst eredményez, és az A allélját hordozó major depressziós betegek kétoldali gyrus temporalis superiorában, valamint a jobb oldali hippocampus-ában csökkent szürkeállomány mennyiséget találtak (Inkster és mtsai 2009).

Az egyponos polimorfizmus vizsgálatok mellett egyre több figyelem irányul a hosszabb régiókat érintő kópiaszám variációkra is (Stankiewicz és Lupski 2010). Ezen variánsok szintén jelentős szerepet játszhatnak a betegségek kialakulásában, hiszen

gének duplikálódhatnak, vagy kivágódhatnak általuk (Fanciulli és mtsai 2010). Méretük és komplexitásuk miatt azonban vizsgálatuk csak az utóbbi években történt jelentős laboratórium technikai és informatikai fejlődésnek köszönhetően vált lehetségessé. A pszichogenetika területén született egyik első, ilyen jellegű asszociáció vizsgálat a *CHRFAM7A* gén kópiaszám variációját vizsgálta 208 szkizofrén, 217 bipoláris és 28 egyéb pszichiátriai rendellenességben szenvedő betegben (Flomen és mtsai 2006). Gyenge asszociációt ($p = 0,04$) találtak a pszichózis és a gén deléciója között, de a többszörös tesztelésre történő korrekció után az összefüggés statisztikailag nem volt szignifikáns. Egy másik csoport teljes genom analízissel 35 CNV-t talált (22 amplifikáció, 13 deléció) 30 szkizofrén beteg vizsgálata során (Moon és mtsai 2006). Mindegyik CNV jelen volt a betegek 13–52%-ában, ami alátámasztja, hogy inkább polimorfizmusnak tekinthetők, mint betegséget okozó mutációknak, annál is inkább, hiszen a CNV-k az egészséges populációban is megtalálhatók. Lachman és munkacsoportja a *GSK3B* gént is érintő CNV-ről mutatta ki, hogy asszociál a bipoláris depresszióval (Lachman és mtsai 2007). Vizsgálatuk során a *GSK3B* gén melletti, a régiót érintő CNV-ben szintén szereplő *NR1I2* gén 1. exonjának kópiaszám változása alapján írták le az amplifikáció és BD közötti kapcsolatot. Egy későbbi tanulmány szintén ezt a CNV-t vizsgálta, de egy másik régiót tesztelt: a *GSK3B* gén 10. exonját. Ők is találtak amplifikációt és deléciót, de ezek nem mutattak szignifikáns összefüggést a depresszióval (Saus és mtsai 2010). Ezeknek az ellentmondó adatoknak az egyik oka az lehet, hogy a szerzők két különböző gént (*NR1I2* és *GSK3B*) teszteltek. Jelen munkánk egyik célja az volt, hogy MDD és BD betegekben, valamint egy megfelelő kontroll csoportban a *GSK3B* génrégió kópia státuszát pontosabban felmérjük.

A Database of Genomic Variants alapján a *GSK3B* gént érintő kromoszóma régió 5 különböző CNV ismert eddig, melyet vizsgálataink 3 új variánssal egészítenek ki (9. táblázat). A variánsok kromoszomális lokalizációját a 9. táblázat mutatja.

Kísérleteink során kimutattuk, hogy a *GSK3B* gén 9. exonjában szignifikánsan gyakrabban fordul elő génszám variáció depressziós betegek között a kontroll csoporthoz képest ($p = 0,00051$). A beteg mintát MDD és BD csoportokra felbontva az is kiderült, hogy ez az eltérés a BD csoportból származik, a bipoláris csoportban ugyanis 7,3%-ban fordult elő magasabb kópiaszám ebben a régióban, míg a kontroll csoportban ez mindössze 1,7% volt ($p = 0,00001$). Ez az eltérés nagyobb, mint

8-szoros kockázati tényezőt jelentett a hangulati rendellenesség előfordulása szempontjából abban az esetben, ha a *GSK3B* gén 3' vége (9. exon) amplifikált.

9. táblázat. A 3q13.33 kromoszómarégió kópiaszám polimorfizmusai. *Az amplifikációt és a deléciót ugyanabban a személyben azonosítottuk.

Minta	Elnevezés	Amplifikáció / deléció	Érintett régió	Hivatkozás
kontroll, N = 39	variation_0035	1 (kontroll) / 1 (kontroll)	<i>C3orf15</i> 3' régió, <i>NR1I2</i> teljes gén, <i>GSK3B</i> 3' régió	Iafate et al., 2004
kontroll, N = 36	variation_6205	0 / 1 (kontroll)	<i>NR1I2</i> 5' régió	Mills et al., 2006
	variation_12326	0 / 1 (kontroll)	<i>NR1I2</i> 5' régió	Mills et al., 2006
kontroll, N = 1 (J.D. Watson)	variation_39343	0 / 1 (kontroll)	<i>NR1I2</i> 1. intron	Wheeler et al., 2008
kontroll, N=1 (nigériai férfi)	variation_98419	0 / 1 (kontroll)	<i>GSK3B</i> 7. intron	McKernan et al., 2009
	variation_HU1	2 (1MDD, 1BD) / 0	<i>GSK3B</i> teljes gén	
kontroll, N = 414 MDD, N = 172 BD, N = 260	variation_HU2	7 (2MDD, 5 BD) / 0	<i>NR1I2</i> 3' régió, <i>GSK3B</i> 3' régió	Ronai et al, 2013
	variation_HU3	17* (4 kontroll, 13 BD) / 1*	<i>NR1I2</i> 3' régió és <i>GSK3B</i> 3' régió; deléció: <i>GSK3B</i> 5' régió	

A gén régió részletesebb vizsgálatából az is kiderült, hogy a fent említett **amplifikáció csupán a gén 3' régióját érintette, mely igen gyakran társult az 5' régió deléciójával.** Az amplifikációnak és a deléciónak ez a furcsa párosulása legjobb tudásunk szerint eddig ismeretlen volt a pszichiátriai genetika területén. A kérdést tovább bonyolítja az a tény, hogy a **3' régió kópiaszáma esetenként igen magas lehet: 20-nál magasabb kópiaszám is mérhető volt bipoláris betegek körében (4. táblázat).** Az általunk kapott adatok és a szakirodalomból ismert eredmények eltérései részben a kromoszóma különböző helyeihez kötődő próbákból adódhatnak. Hozzá kell tenni azt

is, hogy az általunk kidolgozott módszerekben a kontroll (*RNáz P* kópiaszámot mérő) és a vizsgált régió kópiaszámát mérő próbákat ugyanabban a reakcióelegyben alkalmaztuk, mely pontosabb meghatározást tett lehetővé (Szántai és mtsai 2009).

Mindenképpen komplex kérdés, hogy mi lehet a fenotípusos következménye annak, hogy a *GSK3B* gén 5' végének deléciója a 3' vég amplifikációjával társul. A közelmúltban kimutatták, hogy a *GSK3B* gén kifejeződése transzlációs szinten is szabályozódik a miR-26a miRNS-sel (Suh és mtsai 2012). Ez a felismerés egy érdekes hipotézist vet fel: a 3' vég amplifikációs számának növelése esetleg a gén részleges delécióját kompenzáló mechanizmus is lehet. Az 5' végén deleteálódott *GSK3B* gén feltehetőleg nem tud kifejeződni, tehát ezekben a *GSK3B* gén expressziója jelentősen csökken. Ugyanakkor ha az amplifikálódott miRNS kötő régió transzlálódik, a sok példányban jelen levő miRNS kötőhely csökkentheti a miRNS géncsendesítő hatását (mivel a miRNS-kötőhely / miRNS arány nő), ami növelheti az ép gének expresszióját. Ilyen jellegű kompenzációs mechanizmust jelenleg még nem ismer a szakirodalom, és ennek bizonyítása sem egyszerű.

A *GSK3B* CNV eddigi kutatása azokon a CNV variánsokon alapult, melyeket összehasonlító genomi hibridizációval (aCGH) végeztek hosszú DNS próbákat (bakteriális mesterséges kromoszóma (BAC) formájában klónozott humán DNS darabokat) alkalmazva (Iafate és mtsai 2004). Ezekben a vizsgálatokban a CNV kiterjedését a BAC klónban található DNS-ek hosszával lehetett azonosítani, így a *GSK3B* régió CNV-jét a szomszédos két génre (*C3ORF15*, *NR1I2*) is kiterjesztették. Később azonban leírtak kisebb kiterjedésű variánsokat is (McKernan és mtsai 2009, Mills és mtsai 2006, Wheeler és mtsai 2008), melyeket egészséges genomokban azonosítottak. Az itt bemutatott munkában megfigyelt *GSK3B* CNV variánsok eltérnek az eddig azonosítottaktól, aminek legvalószínűbb oka a kisméretű próbák sorozatának alkalmazása a vizsgált kromoszomális régióban. **Méréseink szerint valamennyi CNV variáns tartalmazza a *GSK3B* és az *NR1I2* gének 3' régióját, de egyik sem foglalja magában a *C3ORF15* gént. Mindössze 2 mintában (mindkettő major depressziós beteg volt) találtuk meg a *GSK3B* gén teljes hosszban amplifikált formáját, a génekópia szám ezekben az esetekben 3 volt (HU1-es variáns).** Jellemzőbb volt a 3' vég amplifikációjának és az 5' vég deléciójának kombinációja elsősorban bipoláris betegekben. Sajnos az eddig elvégzett vizsgálatokból nem derül ki, hogy az

amplifikáció és a deléció ugyanazt a kromoszómát érinti-e, ehhez családvizsgálatra lett volna szükségünk.

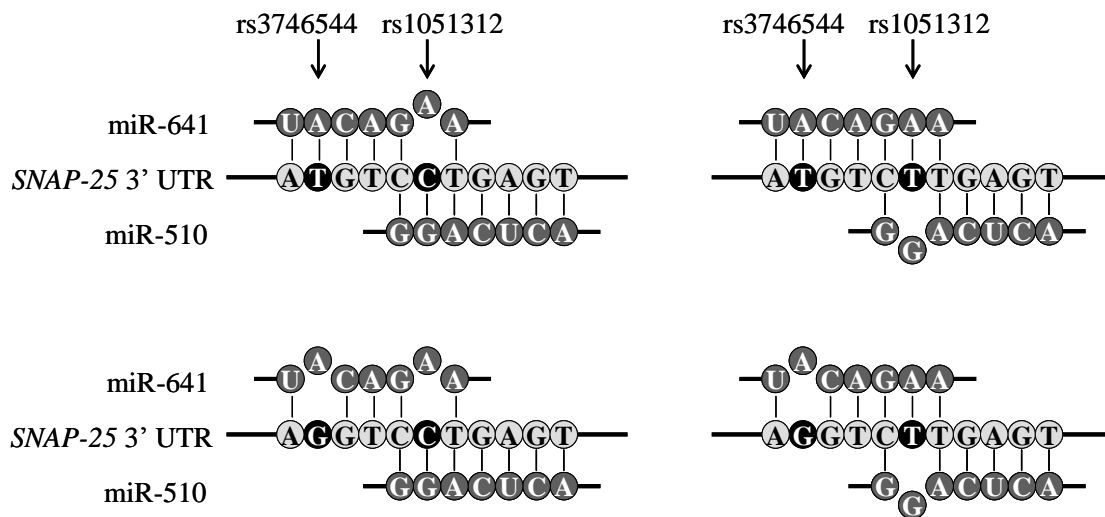
A CNV-k kutatása nagy intenzitással folyik, mert nagyobb kromoszomális régiók amplifikációja vagy deléciója feltehetően jelentős hatású lehet a fenotípusra (Lachman 2008). Ugyanakkor a bemutatott vizsgálatok azt mutatják, hogy egy adott CNV esetében nem csak az ismétlődési szám, de a kiterjedése is variabilis lehet (9. ábra). Ez megnehezíti azoknak az asszociáció elemzéseknek az értékelhetőségét, ahol mindössze egy régió amplikon számával mérik a CNV előfordulását. Nyilvánvaló, hogy eltérő funkcionális hatású lehet az, ha a *GSK3B* gén teljes egésze, vagy csupán egy része amplifikálódik. A jelen eredmények fontos módszertani tanulsága, hogy egy adott kromoszomális régió szűk területén is igen eltérő kópiaszám variánsok fordulnak elő, melyek egyetlen próbával nem azonosíthatók. A *GSK3B* gén teljes területének amplifikációjáról például az általunk C-vel és F-fel jelzett primerpár-próba szettekkel kaptunk felvilágosítást, de ez a variáns nagyon ritka volt. Ugyanakkor az is lehetséges, hogy a kromoszomális doménszerkezet megváltozása önmagában is létrehozhat funkcionális változást (De és Babu 2010).

5.2 MikroRNS kötőhely polimorfizmusok vizsgálatai

A mikroRNS-ek jelentős szerepet töltenek be a fehérjeszintézisben, a fehérjét kódoló gének már 60%-áról feltételezik, hogy expressziójuk miRNS-ek szabályozása alatt áll. (Friedman és mtsai 2009). Ha megváltozik a miRNS cél mRNS-éhez való kötődése, akkor a fenotípus is módosulhat a fehérjeszint változásán keresztül, adott esetben a következmény akár betegség kialakulása is lehet. A kötődést megváltoztathatják olyan polimorfizmusok, amik a miRNS target mRNS-én elrontják vagy létrehozzák a miRNS felismerő helyét. Ez a felismerő hely a miRNS 5' végén található 6–8 bázis hosszú seed régióval komplementer szekvencia az mRNS 3' UTR-jében. Mivel ez a szekvencia nagyon rövid, érthető, hogy a tökéletes komplementaritás elengedhetetlen a miRNS hatásának kialakulásához és akár egyetlen bázis cseréje is hatással lehet a kötődésre. Az ilyen polimorfizmusok, melyeket miRSNP-nek nevezünk, jelentős hatással lehetnek a fenotípusra, és asszociációt mutathatnak különböző betegségekkel.

5.2.1 Molekuláris haplotipizáló módszerek

A miRSNP-k néha halmozottan fordulhatnak elő, és ha 2 miRSNP egymáshoz olyan közel van, hogy mindkettő befolyásolhatja egy adott mikroRNS kötődését, akkor a genotípus helyett a haplotípus vizsgálata szükséges. A molekuláris haplotípus meghatározása azonban eléggé munkaigényes módszer, ezért általában inkább számításokkal igyekeznek meghatározni az egyes haplotípusok valószínűségét. Ugyanakkor munkacsoportunk már korábban is kidolgozott molekuláris haplotipizáló módszereket (Szantai és mtsai 2005), melyek segítségével a haplotípus egyértelműen meghatározható.



23. ábra. A két SNP feltételezett hatása a miRNS-ek kötődésére. A négy panel a négy lehetséges haplotípust ábrázolja. A világos szürke körök fekete betűvel a *SNAP-25* 3' UTR-jének bázisai, közöttük a polimorfizmusok allélvariánsai fekete körök fehér betűvel. A két miRNS seed szekvenciája (sötét szürke körökben fehér betű) a 3' UTR alatt és fölött látható. Ahol egy allél elrontja az mRNS–miRNS komplementaritást (függőleges vonal hiánya), a miRNS bázisa kiemelkedik a többi bázis vonalából.

A *SNAP-25* gén két miRSNP-je (rs3746544 és rs1051312) *in silico* vizsgálataink alapján két különböző miRNS (miR-510 és miR-641) kötődését is érintheti. A polimorfizmusok közelsége miatt mindkettő befolyásolja a miR-641 kötőhelyét, ami a genotípusok ismeretén túlmenően, a haplotípus meghatározásának jelentőségét emeli ki. A T–T haplotípus esetén tökéletes a miR-641 seed szekvenciájának kötődése, míg a T–

C és G–T haplotípusok egy bázist változtatnak meg a kötőhelyben. Érdekes módon a G–C haplotípus, ami két helyen is elrontja a miR-641 kötődését, nem található meg a populációban. A másik miRNS, a miR-510 seed szekvenciájának kötődését csak az rs1051312 SNP érinti, C allél esetén figyelhető meg a tökéletes kapcsolat a miRNS és a *SNAP-25* gén 3' UTR-je között (23. ábra).

Elméletileg mindkét SNP-nek szerepe lehet a *SNAP-25* szintézis komplex szabályozásában, aminek ismerete közelebb vihet a polimorfizmusok és az ADHD között kimutatott asszociáció (Barr és mtsai 2000, Kim és mtsai 2007) molekuláris magyarázatához. A két polimorfizmus lehetséges közös hatása a miRNS-ek kötődésére rávilágít a haplotípus meghatározás fontosságára, hiszen nem az önálló polimorfizmusok, hanem inkább az általuk alkotott haplotípusok befolyásolják a miRNS-ek kötődését. Korábbi tanulmányunk is alátámasztotta, hogy molekuláris haplotipizáló módszerek hasznos eszközei a genetikai vizsgálatoknak (Szantai és mtsai 2005), mert plusz információval szolgálnak. Jelen munkánkkal is alátámasztottuk a haplotípusok ismeretének fontosságát, **kimutattuk, hogy a G–C haplotípus nem létezik az általunk vizsgált magyar populációban.** Ez a jelenség több módon is magyarázható. Lehetséges, hogy az rs3746544 G/T SNP az evolúció során régebben jött létre, míg az rs1051312 C/T egy új variáns, aminek az ősi allélja a T változat, míg a C allél *de novo* mutáció révén jött létre egy olyan kromoszómán, ami T allélt tartalmazott az rs3746544 G/T lókuszon. Feltételezve, hogy az új rs1051312 C/T SNP semmilyen súlyos biológiai hatást nem okoz, az új T–C haplotípus elterjedhetett a populációban. Másrészt, a két polimorfizmus közelsége miatt, crossing-over nem jött még létre a két SNP között, ezért a G–C variáns nem tudott még kialakulni. Egy másik lehetséges magyarázat a G–C haplotípus hiányára az lehet, hogy ez a haplotípus teljesen elrontja a miR-641 és *SNAP-25* mRNS kapcsolódását, ami által a miRNS hatása megszűnik. Ennek a kiesésnek olyan következménye lehet, ami miatt ez a variáns nem tudott elterjedni a populációban. Bárhogy is van, ezek a szempontok kiemelik a molekuláris haplotipizálás fontosságát, mert haplotipizáló módszerekkel jobban megérthetjük szomszédos SNP-k biológiai hatását.

5.2.2 *MikroRNS kötőhely polimorfizmusok funkcionális vizsgálata*

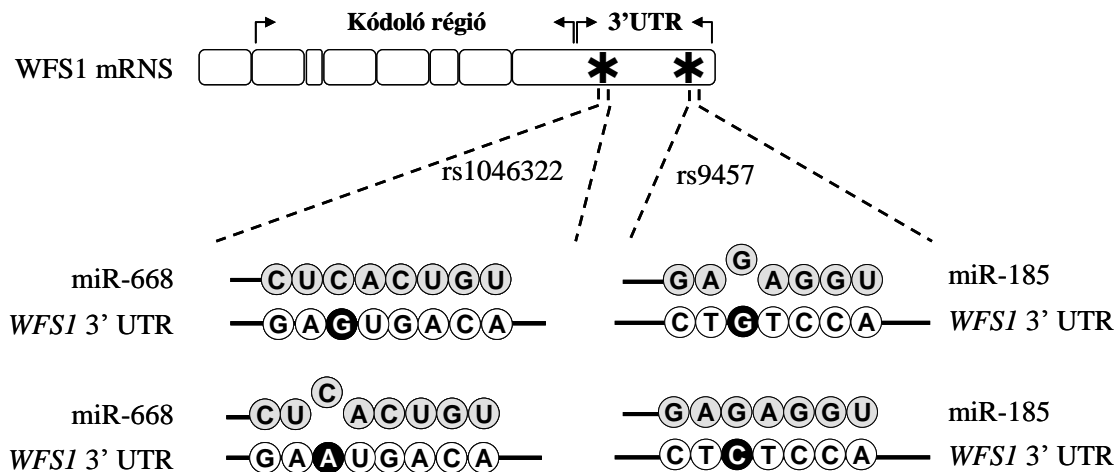
Az *in silico* adatbányászással nyert miRSNP-k csak feltételezeten befolyásolják a miRNS kötődését, ezért hatásukat hasznos funkcionálisan is igazolni. Erre alkalmas módszer a riporter-gén rendszer, ahol a vizsgált 3' UTR-t riporter gén mögé kell klónozni. Az így létrehozott konstrukciót a miRNS-sel kotranszfektálva a riporterfehérje transzlációjának esetleges gátlását lehet vizsgálni. Leggyakrabban luciferáz riporter gént alkalmaznak, mely mögé ligálják a kétféle inszertet, amik csak az SNP két alléljában térnek el egymástól. Amennyiben a kötőhelyet tartalmazó konstrukcióval alacsonyabb relatív luciferáz aktivitás mérhető, mint az elrontott kötőhelyet tartalmazó forma esetében, a polimorfizmus valóban funkcionális miRSNP-nek tekinthető.

Ilyen módszerrel több tanulmány igazolta miRSNP-k szerepét betegségekben. A legtöbb eredmény daganatos megbetegedések vizsgálata során született (Chin és mtsai 2008, Saetrom és mtsai 2009), de vannak más funkcionális példák is kardiovaszkuláris (Sethupathy és mtsai 2007) vagy autoimmun (Tan és mtsai 2007) kórképekben.

Neuropszichiátriai betegségek esetében is születtek asszociáció vizsgálatok feltételezett miRSNP-ekkel kapcsolatban. Az rs13212041 A/G polimorfizmus, ami a szerotonin receptor 1B- (*HTR1B*) génben feltehetően a miR-96 felismerő helyét változtatja meg, asszociációt mutatott az agresszív viselkedéssel (Jensen és mtsai 2008, Sethupathy és Collins 2008). Abelson és mtsai a Tourette szindrómával hoztak összefüggésbe egy kereteltolódással járó mutációt az *SLITRK1* génben. Itt a mutáns variáns (var321-*SLITRK1*) szekvencia adatok alapján megerősíti a miR-189 felismerési helyét (Abelson és mtsai 2005).

5.2.2.1 *A wolframin fehérjeszint transzlációs szabályozásának valószínűsítése*

Munkacsoportunk *in silico* kutatással két feltételezett miRSNP-t talált a *WFS1* gén 3' UTR-jében, amik ismert miRNS-ek kötőhelyét hozzák létre (rs9457) illetve szüntetik meg (rs1046322). Ezt mutatja be a 24. ábra.



24. ábra. A WFS1 gén két miRSNP-je. Az ábra felső része a *WFS1* mRNS-ét ábrázolja, csillag jelöli a két miRSNP-t (rs1046322 és rs9457). Az ábra alsó részén a mRNS 3' UTR két, az SNP-eket tartalmazó részletének kinagyítása látható. Szürke körökkel a miRNS-ek seed szekvenciája van kiemelve, alattuk fehér körökkel az mRNS-en található kötőhely, ahol az SNP-k fekete háttérrel kaptak. Bal oldalon az rs1046322 SNP hatása látható a miR-668 kötődésére: A allél elrontja, G allél létrehozza a miRNS kötőhelyet. A jobb oldalon pedig a miR-185 kötődését láthatjuk az SNP függvényében: az rs9457 G allélja elrontja a kötőhelyet, a C allél létrehozza.

Egészséges populáció pszichológiai jellemzésének céljából a *WFS1* gén 17 SNP-jét érintő kutatás keretein belül vizsgáltuk a gén két miRSNP-jét. Három kérdőív adatai alapján vetettük össze az agresszióra, impulzivitásra, szorongásra és depresszióra való hajlamot a 17 SNP genotípusaival. A fenti négy pszichológiai dimenzió egymással összefügg és gyakran társulnak egyéb tünetekkel, mint például pánik roham, kényszerbetegség, öngyilkosság és erőszak. Az impulzív-agresszív viselkedés hátterében legtöbbször szerotonerg diszfunkciót feltételeznek. Emellett a dopamin mint a jutalmazó rendszer eleme is szerepet játszik a folyamatban. A *WFS1* gén polimorfizmusait eddig leginkább major depresszió, bipoláris depresszió és öngyilkossági hajlam vonatkozásában vizsgálták, azonban sokszor születtek ellentétes eredmények (Sequeira 2003), melynek egyik oka lehet a vizsgálatokban szereplő viszonylag kis esetszám.

Vizsgálatunk során 801 személy *WFS1* gén polimorfizmusait analizáltuk a hangulati jellemzők, impulzivitás és agresszió vonatkozásában. Ezeknek a pszichológiai jellemzőknek a szélső értékei esetenként megtalálhatók wolfram szindrómás

betegekben, ezért felmerült, hogy a *WFS1* gén polimorfizmusai hatással lehetnek ezen pszichológiai paraméterek normál variációira is. Az agresszió, az impulzivitás, a depresszió és a szorongás bizonyos mértékben korrelál egymással (Apter 1990), ezért vizsgálatainkban mind a 4 pszichológiai fenotípust felmértük. A 17 SNP és 4 fenotípus vizsgálata miatt használtuk a többszörös tesztelésre való korrekciót is, és ezt követően egyetlen szignifikáns eredményt kaptunk: az **rs1046322 miRSNP genetikai státusza összefüggött az agresszió mértékével. Az AA genotípussal rendelkező személyek szignifikánsan magasabb pontszámot kaptak az agresszió skálán a többi genotípus csoportba tartozókhöz képest. Ez a különbség kimutatható volt az agresszió valamennyi alskáláján is.** Az rs1046322 kapcsoltsági vizsgálata során megállapítottuk, hogy ez az SNP nem kapcsolt sem a többi haploblokkal, sem pedig a 3' UTR-ben vizsgált további SNP-ekkel. Ezen adatok birtokában feltételezhetjük, hogy az rs1046322 miRSNP nem markerként szerepel, hanem ténylegesen szerepel az agresszió örökletes hátterének meghatározásában.

Annak eldöntésére, hogy ennek a polimorfizmusnak milyen funkcionális hatása lehet, az irodalomban elfogadott riporter gén rendszerben vizsgáltuk a két allél közötti különbséget. Luciferáz riporter gén mögé klónoztuk a *WFS1* gén 3' UTR-jét, majd irányított mutagenezissel létrehoztunk 3 különböző konstrukciót. Ezen konstrukciók csak a miRNS kötőhelyében különböztek egymástól, miszerint az első a G allélt tartalmazta, a második az A allélt, a harmadik pedig az ún. seed-mutáns volt, amiben a miRNS egész kötőhelyét elrontottuk. HEK293 sejteket transzfektáltunk a fenti konstrukciókkal valamint a miR-668-cal. **Eredményeink igazolták a polimorfizmus szerepét a miR kötődésében.** A G allélt tartalmazó konstrukció esetében kaptuk a legalacsonyabb relatív luciferáz aktivitást, az A alléllal transzfektált sejtekben magasabb jelet mértünk, míg a teljesen elrontott kötőhelyet tartalmazó seed-mutáns adta a legmagasabb jelet. Mindez azt jeleneti, hogy az **A allél valóban csökkenti a miR-668 kötődésének valószínűségét**, ami a transláció gátlásának csökkenését, tehát magasabb fehérje szintet eredményez.

A miRSNP-k funkcionalitásának ilyen módú bizonyítása elfogadott, bevált módszer az irodalomban. Több munkacsoport vizsgálta különböző miRNS-ek kötődését riporter gén rendszer segítségével. Az esetek többségében a vizsgált gén teljes 3' UTR-jét klónozzák a riporter gén mögé, hogy jobban tükrözze az *in vivo* körülményeket. Chin

és mtsai nem kis sejtes tüdőrákkal asszociáló polimorfizmust vizsgáltak a *KRAS* gén 3' UTR-jében, ami a let-7 miRNS kötődését változtatja meg. Kísérleteik során több, mint 50%-os különbséget tudtak kimutatni riporter gén rendszerrel a két allél között, kontroll plazmival való összehasonlításról nem számoltak be (Chin és mtsai 2008). Az általunk kapott eredményekhez hasonlóan közöl egy újabb tanulmány. A dopamin D1 receptor (*DRD1*) génjében lévő rs686 polimorfizmus hatását vizsgálták a miR-296 és miR-504 kötődésére luciferáz riporter gén rendszerben. Kísérleteik során a polimorfizmus a miR-296 kötődését nem befolyásolja, csak a miR-504 esetében mértek különböző relatív luciferáz aktivitást a génvariánsok között. A különbség itt is szignifikáns, de csak 5% körüli. Kontrollnak az általunk is használt seed-mutánsot választották. A miR-504 seed szekvenciájával komplementer régióban cseréltek ki 3 bázist. Ezen csere lecsökkentette a miR kötődését a vad típushoz képest, de nem jobban, mint az egyetlen bázis cseréje, amit az SNP hozott létre (Huang és Li 2009). Az általunk tervezett seed-mutáns a teljes seed-régiót érintette, tehát mind a nyolc bázist kicseréltük, ami során a miRNS kötődése még gyengébb lett, és magasabb relatív luciferáz aktivitást mértünk, mint az SNP által elrontott kötőhellyel. Valószínűleg még ebben az esetben sem szűnik meg teljesen a miRNS bekötődése, amire Wang eredményéből következtethetünk, ahol a 3' UTR-ből teljesen deletálták a miRNS-nek megfelelő 21 bázist és ezáltal közel négyszer nagyobb jelet mértek, mint a kötőhelyet tartalmazó konstrukciók esetében (Wang és mtsai 2008). Látható, hogy a különböző kísérleti rendszerek eredményei jelentősen eltérhetnek egymástól, ami az alkalmazott sejtvonalak és miRNS-ek különbözőségéből adódhat. A miRNS-ek érési folyamatához, valamint a miRNS-ek mRNS-hez való kapcsolódásához szükséges faktorok széles skáláját nem lehet ellenőrizni a sejtes rendszerekben. Előfordulhat például, hogy valamely sejtvonal nem processzálja az adott miRNS-t, ezért másik rendszerben kell a riporter génen alapuló kísérleteket elvégezni. Ezért fontos *in vivo* vizsgálni mind a miRNS, mind a cél mRNS jelenlétét az adott szövetben. Amennyiben mindkettőt expresszálja a vizsgált szövet, valószínűsíthető, hogy a riporter rendszerben kapott hatások a szervezetben is lejátszódnak. Egy miRSNP *in situ* vizsgálata elméletben lehetséges volna homo- és heterozigóta egyedekben a fehérje mennyiségének összehasonlításával, de a fehérje termelést sok egyéb faktor befolyásolhatja, amiket ki kellene zárni a vizsgálathoz, ezért a gyakorlatban ez nem kivitelezhető.

Eset–kontroll vizsgálattal kapott fenotípus és feltételezett miRSNP közötti összefüggést *in vivo* funkcionális vizsgálattal kiegészítve megfelelő bizonyítékát kapjuk a polimorfizmus tényleges hatásának. A pszichogenetika területén a fent említett *DRDI* polimorfizmus mellett Jensen és mtsai különböző emberi viselkedésjegyek kandidáns génei között kerestek funkcionális miRSNP-eket. 22 kandidáns gén mRNS-ét vizsgálva 11-nél találtak olyan polimorfizmust, melyek miRNS kötődést befolyásolhatnak, ezek nagy része a seed kötődését érinti. Három gén esetében végeztek luciferáz riporter gén vizsgálatot. A *CNRI* (cannabinoid receptor 1), az *SLC6A4* (szerotonin transzporter) és a *HTR1B* (szerotonin receptor 1B) gének 3' UTR régiójának érintett szakaszát klónozták luciferáz gén mögé, és a két allélvariáns hatását hasonlították össze egymással illetve inszertet nem tartalmazó vektorral. Az első két gén esetében nem kaptak különbséget a variánsok között. A *HTR1B* gén rs13212041 A/G polimorfizmus viszont funkcionálisan is miRSNP-nek bizonyult. A G allél 64%-kal nagyobb relatív luciferáz jelet adott, ami alátámasztotta a feltételezést, miszerint ez a variáns elrontja a miR-96 kötődését. A munkacsoport pszichogenetika eset–kontroll vizsgálattal is igazolta az eredmény fontosságát, kimutatták az asszociációt a polimorfizmus és az agresszív viselkedés között (Jensen és mtsai 2008). A *WFSI* funkcionális miRSNP-inek vizsgálata az irodalomban új irányvonalnak tekinthető.

5.2.2.2 *A wolframin fehérjeszint transzlációs szabályozásának feltételezett funkciója*

A wolframin az endoplazmás retikulum transzmembrán fehérjéje és az eddigi közlemények alapján fontos szerepet tölt be az ER stressz szabályozásában. A sejtorganelum fő feladata a sejt által termelt fehérjék megfelelő konformációjának kialakítása. Amennyiben a folding megfelelő működéséhez szükséges ER környezetet bármely hatás megváltoztatja, az ER-ben megemelkedik a nem vagy hibásan feltekeredett fehérjék mennyisége, ami ER stresszt okoz. Ilyen hatások lehetnek vírus infekciók, toxinok, gyulladáscsökkentő citokinek, chaperon fehérjék hiánya, fehérje szállítási hiba, mutáns fehérje, vagy az ER fehérje-túltöltése (pl. étkezés utáni inzulin termelés) (Fonseca és mtsai 2009). Ezen állapot helyreállítására az organelum a selejtférférválással (UPR) reagál, ami az ER stressz megszüntetése révén megvédi a sejtet az apoptózistól, vagy ha erre nem képes, akkor elindítja a sejthalál felé vezető útvonalat. Az UPR három fő módon szabályozza az ER stresszt, az IRE1, PERK és ATF6 ER

transzmembrán fehérjékről elnevezett útvonalakon. Ezek lényege, hogy transzkripciós faktorok révén az ER stresszt csökkentő fehérjék, chaperonok átíródását segítsék. A képződő fehérjék a transláció gátlása révén az ER túltöltését is megelőzik és a selejtfehérjék lebontását segítik, ugyanakkor ha a funkciók széles körben károsodtak, akkor apoptózist indítanak el. Amennyiben az UPR megfelelő egyensúlyban van, csökkenteni tudja az ER stresszt és képes fenntartani a sejt fehérje homeosztázisát. De ha az UPR károsodott és tartósan fennáll az ER stressz, akkor irreverzibilis károsodások érik a sejtet és a folyamat a sejt halálához vezet.

A wolframin vizsgálata során kimutatták, hogy a fehérje mindhárom UPR útvonalban szerepet játszik (Fonseca és mtsai 2005, Fonseca és mtsai 2010). ER stressz indukáló ágensek hatására a *WFS1* mRNS szintje megemelkedik a sejtben, és negatív visszacsatolással csökkenti az ER stresszt. Ezt igazolja, hogy amennyiben a wolframin nincs vagy csak csökkent mennyiségben van jelen a sejtben, akkor az ER stressz gátlása is csökken és megemelkedik az ER stressz markerek koncentrációja (pl: BiP, Ero1 α , hasított XBP-1, Chop) (Fonseca és mtsai 2005). Ez a modell megfelel a Wolfram-szindrómának, aminek háttérében a *WFS1* gén fehérje-vesztő mutációi állnak. A Wolfram-szindróma első korai tünete a nem inzulin függő diabetes mellitus (Rigoli és mtsai 2011). Mivel a pancreas β -sejtjei igen nagy mennyiségben termelik az inzulint, nagyon fontos a megfelelő ER működés a sejt funkciója szempontjából. A diabetes mellitus ezen csoportjának jellemzője az inzulinrezisztencia után kialakuló β -sejt diszfunkció és mennyiségi csökkenés. Ez a jelenség azzal magyarázható, hogy az inzulin iránti megemelkedett igényt a β -sejtek egy idő után nem tudják fedezni. A folyamatosan emelkedett mennyiségben termelt fehérje krónikus ER stresszt vált ki a β -sejtekben, amit az UPR nem tud kezelni, és ezért sejthalálhoz vezet a folyamat. A diabetes mellitus háttérében tehát az ER stressz valószínűsíthető. Feltételezhető, hogy a wolframin ezen folyamatokban is szerepet játszik. A diabetes ob/ob egér modelljében megfigyelték, hogy a szigetsejtek glükóz hatásra történő *WFS1* mRNS indukciója szignifikánsan alulmarad a kontroll egyedekhez képest. Ez azt sugallja, hogy a beteg β -sejtek már krónikus ER stressz állapotában vannak (Fonseca és mtsai 2005). Szintén egérkísérletekkel bizonyították a *WFS1* hiány és ER stressz kapcsolatát *in vivo*. *WFS1* hiányos mutáns egerek szigetsejtjeiben az ER stressz megemelkedett és ezzel együtt a sejtek apoptózisa is (Yamada, et al., 2006). A fenti példák jól szemléltetik a wolframin

fontosságát az ER stressz szabályozásában. Egy sejt túlélésének szempontjából fontos, hogy az ER stressz válasz jól szabályozott legyen, ha szükség van rá, akkor hatékonyan kiküszöbölje a kóros fehérje túltöltést, de idővel le is kell csengenie, különben a sejt halálához vezet a folyamat. Ebben a finom szabályozásban a wolframin feltehetőleg fontos szerepet tölt be az ER homeosztázis helyreállításában (Oslowski és Urano 2011). Mennyisége az ER stressz válasz során transzkripciós szinten szabályozódik, az mRNS szintje 3–5-szörösére emelkedik (Fonseca és mtsai 2005). Ezután hatása az idő függvényében folyamatosan lecseng. ER stresszt kiváltó DTT kezelésre a wolframin disszociál az ATF6 α -ról, de pár óra elteltével elkezdi helyreállni az alapállapot (Fonseca és mtsai 2010). Ha túl sok wolframin van jelen a sejtben, akkor ez a lecsengés elnyújtottabb lehet, ami a sejt kóros állapotához vezethet. Valószínűsíthető, hogy a fehérje mennyisége nem csak transzkripciós, hanem translációs szinten is befolyásolható és ennek a szabályozásnak is fontos szerepe lehet a megfelelő ER stressz válaszban. A miRNS-ek translációs szintű szabályozó szerepét még keveset vizsálták ER stresszben. Dai munkacsoportja hepatocelluláris carcinoma sejtvonalon bizonyította, hogy miR-221/222 mimetikumok hatására az ER stressz indukálta apoptózis megemelkedik (Dai és mtsai 2010). A wolframin esetében ez idáig nem vizsgálták a miRNS-ek szerepét, ezért legjobb tudomásunk szerint **munkacsoportunk** az első, aki a **WFS1** gén feltételezett miRNP-jéről funkcionális vizsgálatokkal **bebizonyította, hogy valóban megváltoztatja egy miRNS kötődését**. További kérdés, hogy ez a hatás a szervezetben is megfigyelhető-e és szerepe van-e a wolframin ER stresszben betöltött szerepében.

6 Következtetések

Multifaktoriális betegségek hátterében a környezeti tényezők mellett a genetikai faktorok is jelentős szerepet játszanak. Ezek a genom 0,5%-t adó polimorfizmusok között keresendők, melyek önmagukban nem okoznak betegséget, de a kórkép kialakulásának rizikófaktorai lehetnek.

Az elmúlt évtizedben kezdték el behatóbban tanulmányozni a már régóta vizsgált egy pontos polimorfizmusok csoportjába tartozó új funkcionális SNP típust, a mikroRNS-ek kötődését befolyásoló SNP-eket (miRSNP), mert hatással lehetnek a keletkezett fehérjék mennyiségére. Mivel a fehérjét kódoló gének 60%-áról kiderült, hogy transzlációjuk miRNS szabályozás alatt áll, ez az SNP család jelentősen hozzájárulhat a fenotípusos különbségek kialakításához. Szintén az utóbbi években irányult figyelem egy másik polimorfizmus-család, a több százezer bázispárt, és ezáltal akár több gént érintő kópiaszám variációk (CNV) felé. Ezek a variánsok nagy változatosságot mutatnak, határvonalaik nem egyértelműek, ezért sok esetben nehéz vizsgálni őket.

Munkacsoportunk ezt a két, új típusú polimorfizmust tanulmányozta behatóbban a pszichogenetika területén. Három kandidáns gén miRSNP-it és CNV-jét vizsgáltuk egészséges, illetve major depresszióban szenvedő populációkban. A *GSK3B* irodalmi adatok alapján a major és/vagy a bipoláris depresszió kandidáns génje. Több SNP-je mutatott szignifikáns asszociációt a rendellenességgel, azonban a gént érintő CNV esetében eltérő eredmények születtek. Az eddigi tanulmányok a CNV határvonalainak vizsgálata nélkül kutatták a kapcsolatot a kópiaszám és fenotípus között. Ezért **munkacsoportunk az asszociáció vizsgálatán túlmenően a CNV genomi kiterjedését is kutatta.** Ezzel a módszerrel **három új *GSK3B* CNV variánst sikerült azonosítanunk,** melyek előfordulása több, mint nyolcszorosára emelte a bipoláris depresszió rizikóját. Érdekes módon, a *GSK3B* 5' végének deléciója a legtöbb esetben társult a 3' vég amplifikációjával, amely esetenként igen magas (akár 20 fölötti) kópiaszámot is elért. Ennek az érdekes kombinációnak egy lehetséges magyarázata a deléció miatt csökkent *GSK3B* génexpresszió kompenzálása a mikroRNS-sel történő gátlás csökkentése által az amplifikált kötőhelyen keresztül.

A *SNAP-25* és *WFS1* gének esetében miRSNP-eket vizsgáltunk. *In silico* elővizsgálatokkal mindkét **génben két miRSNP-t azonosítottunk.** A *SNAP-25*

esetében ez a két polimorfizmus (rs3746544 és rs1051312) két miRNS kötődését is érinti és mindössze három bázisra található egymástól. Közelségük miatt a miR-641 seed régiójának kötődését mindkettő befolyásolja, míg a miR-510-ét csak az rs1051312. Lokalizációjuk miatt genotipizálásukon túlmenően a haplotípus meghatározása ad érdemi információt funkciójukat tekintve. Ezért **kidolgoztunk egy költséghatékony valós idejű PCR-en alapuló haplotipizáló módszert, mellyel több, mint 1000 fő haplotípusát határoztuk meg, és megállapítottuk, hogy a magyar polpulációban a G–C haplotípus nem létezik.**

A *WFS1* gén mutációiról ismert, hogy nagy részük monogénes homozigóta formában súlyos neurodegeneratív betegséghez vezet, melyet gyakran kísérnek pszichiátriai rendellenességek. A betegséget nem mutató hordozók között szintén gyakori a pszichiátriai kórképek megjelenése, és 26-szor nagyobb valószínűséggel szorulnak pszichiátriai kezelésre, mint a nem-hordozók (Swift és Swift 2000). Épp ezért valószínűsíthető, hogy a *WFS1* gén polimorfizmusai szerepelhetnek a hangulati és az agresszióval, impulzivitással kapcsolatos pszichológiai jellegek hátterében is, azonban idáig nem születtek egyértelmű adatok ezen a területen. **A dolgozatban bemutatott eredmények igazolják a *WFS1* gén mikroRNS kötő régiójában azonosított SNP (rs1046322) és az agresszió közötti összefüggést,** mely a többszörös tesztelésre történő (Bonferroni) korrekció után is statisztikailag szignifikáns hatásnak bizonyult. Ezen túlmenően, **molekuláris vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a *WFS1* gén 3' UTR-jében lévő rs1046322 hatással van a miR-668 kötődésére,** azaz megfelel a miRSNP kritériumának.

A betegségekkel asszociációt mutató polimorfizmusok funkcionális hatásainak vizsgálata fontos az adott kórkép patomechanizmusának feltérképezése szempontjából. Amennyiben sikerül pontosítani a genetikai variánsok biológiai és orvosi vonatkozású hatásait, ezek az ismeretek elősegítik a hatékony prevenció és terápia kialakítását.

7 Összefoglalás

A genetikai faktorok – a környezeti hatásokkal együtt – jelentős szerepet játszanak a multifaktoriális jellegek és rendellenességek kialakulásában. Az elmúlt évtizedben kezdtek el behatóbban tanulmányozni a már régóta vizsgált egy pontos polimorfizmusok csoportjába tartozó új funkcionális SNP típust, a mikroRNS-ek kötődését befolyásoló SNP-eket (miRSNP). Szintén az utóbbi időszakban irányult a figyelem egy másik polimorfizmus-család, a több ezer bázispártól akár több gént is magában foglaló kópiaszám variációk (CNV) felé.

Jelen munkában három kandidáns gén miRSNP-it és CNV-jét vizsgáltuk egészséges, illetve major vagy bipoláris depresszióban szenvedő betegcsoportokban. A *GSK3B* gént is magába foglaló CNV irodalmi adatok alapján összefüggést a major depresszió, illetve a bipoláris depresszió rizikójával, azonban az eredmények ellentmondásosak. Vizsgálatainkban szignifikáns asszociációt ($p = 0,00001$) mutattunk ki a *GSK3B* kópiaszám variánsai és a bipoláris depresszió között. Kimutattuk továbbá, hogy a *GSK3B* gén 3' végének amplifikációja a legtöbb esetben az 5' vég deléciójával párosul. A *SNAP-25* és *WFS1* gének esetében miRSNP-eket vizsgáltunk. *In silico* elővizsgálatokkal mindkét génben két-két feltételezett miRSNP-t azonosítottunk. A *SNAP-25* miRSNP-k (rs3746544 és rs1051312) két miRNS kötődését is érintik, és mindössze három bázisra találhatók egymástól. Ezért kidolgoztunk egy PCR alapú haplotipizáló módszert, mellyel több, mint 1000 fő haplotípusát határoztuk meg, és megállapítottuk, hogy a vizsgált populációból a G–C haplotípus hiányzik. A *WFS1* gén egyik feltételezett miRSNP-jéről (rs1046322) *in vitro* riporter rendszerben igazoltuk, hogy befolyásolja a riporter fehérje képződését miR-668 kotranszfekció mellett. Emellett statisztikailag szignifikáns ($p = 0,0005$) összefüggést találtunk az rs1046322 genotípus és az agresszió kérdőíves módszerrel meghatározott mértéke között.

A bemutatott eredmények multifaktoriális jellegekkel és rendellenességekkel asszociációt mutató polimorfizmusok molekuláris vizsgálatára vonatkoznak. A kapott eredmények fontosak lehetnek egyes kórképek molekuláris pathomechanizmusának tisztázásában.

8 Summary

Both genetic factors as well as environmental effects play a significant role in the development of multifactorial traits and disorders. More and more studies have been focused on a new functional SNP-variant, the miR-SNPs in the last decade. These polymorphisms might influence the binding efficiency of miRNAs to their target sequences in the 3' UTR of protein coding genes. Much attention has also been paid recently to another type of genetic variants, called copy number variations (CNV). These polymorphisms can expand to several thousand kilobasepairs and thus can include several genes.

In this study the miR-SNPs and CNVs of three candidate genes have been investigated in healthy subjects and patients with major or bipolar depression. Based on data from the literature the CNV containing the *GSK3B* gene might be in connection with an increased risk to major depression or bipolar disease, but results are conflicting. In our study we found a significant association between the copy number variants of the *GSK3B* gene and the bipolar depression ($p = 0.00001$). Furthermore we found, that in most cases the amplification of the 3' end of the *GSK3B* gene was interestingly coupled to a deletion in the 5' region.

MiR-SNPs were investigated in the *SNAP-25* and the *WFS1* genes. Based on our *in silico* analysis we identified two putative miR-SNPs in both genes, respectively. The miR-SNPs of the *SNAP-25* gene (rs3746544 and rs1051312) are only three bases apart from each other, and they influence the binding efficiency of two miRNAs. Therefore we invented a PCR-based haplotyping method and determined the haplotypes of more than 1000 subjects. It was demonstrated that the G–C haplotype was absent in our population.

We also proved from one of the putative miR-SNPs (rs1042322) of the *WFS1* gene in an *in vitro* reporter system, that the polymorphism influences the production of the reporter protein when cotransfected with miR-668. Moreover, a statistically significant association ($p = 0.0005$) was found between this polymorphism and aggression phenotype, measured by a questionnaire-based protocol.

9 Irodalomjegyzék

- Abelson JF, Kwan KY, O'Roak BJ, Baek DY, Stillman AA, Morgan TM, Mathews CA, Pauls DL, Rasin MR, Gunel M, Davis NR, Ercan-Sencicek AG, Guez DH, Spertus JA, Leckman JF, Dure LS 4th, Kurlan R, Singer HS, Gilbert DL, Farhi A, Louvi A, Lifton RP, Sestan N, State MW. (2005) Sequence variants in *SLITRK1* are associated with Tourette's syndrome. *Science*, 310, (5746): 317-320.
- Adli M, Hollinde DL, Stamm T, Wiethoff K, Tshauridu M, Kirchheiner J, Heinz A, Bauer M. (2007) Response to lithium augmentation in depression is associated with the glycogen synthase kinase 3-beta -50T/C single nucleotide polymorphism. *Biol Psychiatry*, 62, (11): 1295-1302.
- Ambros V. (2003) MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. *Cell*, 113(6): 673-6.
- Bao L, Zhou M, Wu L, Lu L, Goldowitz D, Williams RW, Cui Y. (2007) Response to lithium augmentation in depression is associated with the glycogen synthase kinase 3-beta -50T/C single nucleotide polymorphism. *Biol Psychiatry*, 62, (11): 1295-1302.
- Bark C, Bellinger FP, Kaushal A, Mathews JR, Partridge LD, Wilson MC. (2004) Developmentally regulated switch in alternatively spliced SNAP-25 isoforms alters facilitation of synaptic transmission. *J Neurosci*, 24, (40): 8796-805.
- Barr CL, Feng Y, Wigg K, Bloom S, Roberts W, Malone M, Schachar R, Tannock R, Kennedy JL. (2000) Identification of DNA variants in the SNAP-25 gene and linkage study of these polymorphisms and attention-deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry*, 5, (4): 405-9.
- Barrett TG, Bunday SE, Macleod AF. (1995) Neurodegeneration and Diabetes - Uk Nationwide Study of Wolfram (Didmoad) Syndrome. *Lancet*, 346, (8988): 1458-1463.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21, (2):263-265.
- Bartel DP, Chen CZ. (2004) Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat Rev Genet*, 5 (5): 396-400.

- Benedetti F, Serretti A, Colombo C, Lorenzi C, Tubazio V, Smeraldi E. (2004) A glycogen synthase kinase 3-beta promoter gene single nucleotide polymorphism is associated with age at onset and response to total sleep deprivation in bipolar depression. *Neurosci Lett*, 368, (2): 123-126.
- Berezikov E., Guryev V., van de Belt, J., Wienholds E., Plasterk R. H. és Cuppen, E. (2005). Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell*, 120, (1): 21-24.
- Brophy K, Hawi Z, Kirley A, Fitzgerald M, Gill M. (2002) Synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25) and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): evidence of linkage and association in the Irish population. *Mol Psychiatry*, 7, (8): 913-7.
- Bu X, Rotter JI. (1993) Wolfram syndrome: a mitochondrial-mediated disorder? *Lancet*. 1993 Sep 4;342(8871):598-600.
- Buch I, Fishelovitch D, London N, Raveh B, Wolfson HJ, Nussinov R. (2010) Allosteric regulation of glycogen synthase kinase 3beta: a theoretical study. *Biochemistry*, 49, (51): 10890-10901.
- Buss AH, Perry M. (1992) The aggression questionnaire. *J Pers Soc Psychol*, 63, (3): 452-459.
- Calin GA, Croce CM. (2007) Investigation of microRNA alterations in leukemias and lymphomas. *Methods Enzymol*, 427: 193-213.
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. (2004) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, (9): 2999-3004.
- Catterall WA. (1999) Interactions of presynaptic Ca²⁺ channels and snare proteins in neurotransmitter release. *Ann N Y Acad Sci*, 868: 144-59.
- Chiang HR, Schoenfeld LW, Ruby JG, Auyeung VC, Spies N, Baek D, Johnston WK, Russ C, Luo S, Babiarz JE, Blelloch R, Schroth GP, Nusbaum C, Bartel DP. (2010) Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes Dev*, 24, (10): 992-1009.

- Check E. (2005) Human genome: Patchwork people. *Nature*, 437, (7062): 1084-1086.
- Chin LJ, Ratner E, Leng S, Zhai R, Nallur S, Babar I, Muller RU, Straka E, Su L, Burki EA, Crowell RE, Patel R, Kulkarni T, Homer R, Zelterman D, Kidd KK, Zhu Y, Christiani DC, Belinsky SA, Slack FJ, Weidhaas JB. (2008) A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. *Cancer Res*, 68, (20): 8535-8540.
- Collier DA, Barrett TG, Curtis D, Macleod A, Arranz MJ, Maassen JA, Bunday S (1996) Linkage of Wolfram syndrome to chromosome 4p16.1 and evidence for heterogeneity. *American Journal of Human Genetics*, 59, (4): 855-863.
- Congdon E., Canli, T. (2008) A neurogenetic approach to impulsivity. *J Pers*, 76, (6): 1447-1484.
- Craig IW, Halton KE. (2009) Genetics of human aggressive behaviour. *Hum Genet*, 126, (1): 101-13.
- Cryns K, Sivakumaran TA, Van den Ouweland JM, Pennings RJ, Cremers CW, Flothmann K, Young TL, Smith RJ, Lesperance MM, Van Camp G. (2003) Mutational spectrum of the WFS1 gene in Wolfram syndrome, nonsyndromic hearing impairment, diabetes mellitus, and psychiatric disease. *Hum Mutat*, 22, (4): 275-287.
- Dai R, Li J, Liu Y, Yan D, Chen S, Duan C, Liu X, He T, Li H. (2010) miR-221/222 suppression protects against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis via p27(Kip1)- and MEK/ERK-mediated cell cycle regulation. *Biol Chem*, 391, (7): 791-801.
- d'Annunzio G, Minuto N, D'Amato E, de Toni T, Lombardo F, Pasquali L, Lorini R. (2008) Wolfram syndrome (diabetes insipidus, diabetes, optic atrophy, and deafness): clinical and genetic study. *Diabetes Care*, 31, (9): 1743-1745.
- De S, Babu MM. (2010) Genomic neighbourhood and the regulation of gene expression. *Curr Opin Cell Biol*, 22, (3): 326-333.
- Doble BW, Woodgett JR. (2003) GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci*, 116, (Pt 7): 1175-1186.

- Duan S, Mi S, Zhang W, Dolan ME. (2009) Comprehensive analysis of the impact of SNPs and CNVs on human microRNAs and their regulatory genes. *RNA Biol*, 6, (4): 412-25.
- Eiberg H, Hansen L, Kjer B, Hansen T, Pedersen O, Bille M, Rosenberg T, Tranebjaerg L. (2006) Autosomal dominant optic atrophy associated with hearing impairment and impaired glucose regulation caused by a missense mutation in the WFS1 gene. *Journal of Medical Genetics*, 43, (5): 435-440.
- Eiring AM, Harb JG, Neviani P, Garton C, Oaks JJ, Spizzo R, Liu S, Schwind S, Santhanam R, Hickey CJ, Becker H, Chandler JC, Andino R, Cortes J, Hokland P, Huettner CS, Bhatia R, Roy DC, Liebhaber SA, Caligiuri MA, Marcucci G, Garzon R, Croce CM, Calin GA, Perrotti D. (2010) miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell*, 140, (5): 652-65.
- Emamian ES, Hall D, Birnbaum MJ, Karayiorgou M, Gogos JA. (2004) Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3beta signaling in schizophrenia. *Nat Genet*, 36, (2): 131-137.
- Fanciulli M, Petretto E, Aitman TJ. (2010) Gene copy number variation and common human disease. *Clin Genet* 77: 201-213.
- Fawcett KA, Wheeler E, Morris AP, Ricketts SL, Hallmans G, Rolandsson O, Daly A, Wasson J, Permutt A, Hattersley AT, Glaser B, Franks PW, McCarthy MI, Wareham NJ, Sandhu MS, Barroso I. (2010) Detailed investigation of the role of common and low-frequency WFS1 variants in type 2 diabetes risk. *Diabetes*, 59, (3): 741-746.
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*, 9, (2): 102-14.
- Flomen RH, Collier DA, Osborne S, Munro J, Breen G, St Clair D, Makoff AJ. (2006) Association study of CHRFAM7A copy number and 2 bp deletion polymorphisms with schizophrenia and bipolar affective disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 141B, (6): 571-575.

- Fonseca SG, Burcin M, Gromada J, Urano F. (2009) Endoplasmic reticulum stress in beta-cells and development of diabetes. *Current Opinion in Pharmacology*, 9, (6): 763-770.
- Fonseca SG, Fukuma M, Lipson KL, Nguyen LX, Allen JR, Oka Y, Urano F. (2005) WFS1 is a novel component of the unfolded protein response and maintains homeostasis of the endoplasmic reticulum in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem*, 280, (47): 39609-39615.
- Fonseca SG, Ishigaki S, Osowski CM, Lu S, Lipson KL, Ghosh R, Hayashi E, Ishihara H, Oka Y, Permutt MA, Urano F. (2010) Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *J Clin Invest*, 120, (3): 744-755.
- Fraser F C., Gunn T. (1977) Diabetes-Mellitus, Diabetes-Insipidus, and Optic Atrophy - Autosomal Recessive Syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 14, (3): 190-193.
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, 19, (1): 92-105.
- Gasparin MR, Crispim F, Paula SL, Freire MB, Dalbosco IS, Manna TD, Salles JE, Gasparin F, Guedes A, Marcantonio JM, Gambini M, Salim CP, Moisés RS. (2009) Identification of novel mutations of the WFS1 gene in Brazilian patients with Wolfram syndrome. *Eur J Endocrinol*, 160, (2): 309-316.
- Georges M, Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Hiard S, Tordoir X, Caiment F, Meish F, Bibé B, Bouix J, Elsen JM, Eychenne F, Laville E, Larzul C, Milenkovic D, Tobin J, Charlier AC. (2006) Polymorphic microRNA-target interactions: a novel source of phenotypic variation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 71: 343-350
- Giuliano F, Bannwarth S, Monnot S, Cano A, Chabrol B, Vialettes B, Delobel B, Paquis-Flucklinger V; French Group of WS. (2005) Wolfram syndrome in French population: characterization of novel mutations and polymorphisms in the WFS1 gene. *Hum Mutat*, 25, (1): 99-100.

- Gonelle-Gispert C, Halban PA, Niemann H, Palmer M, Catsicas S, Sadoul K. (1999) SNAP-25a and -25b isoforms are both expressed in insulin-secreting cells and can function in insulin secretion. *Biochem J*, 339, (Pt 1): 159-65.
- Gómez-Zaera M, Strom TM, Rodríguez B, Estivill X, Meitinger T, Nunes V. (2001) Presence of a major WFS1 mutation in Spanish Wolfram syndrome pedigrees. *Mol Genet Metab*, 72, (1): 72-81.
- Gould TD, Zarate CA, Manji HK. (2004) Glycogen synthase kinase-3: a target for novel bipolar disorder treatments. *J Clin Psychiatry*, 65, (1): 10-21.
- Griffiths-Jones S., Saini HK., van Dongen S. és Enright AJ. (2008) miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*, 36, (Database issue): D154-158.
- Gürtler N, Kim Y, Mhatre A, Schlegel C, Mathis A, Daniels R, Shelton C, Lalwani AK. (2005) Two families with nonsyndromic low-frequency hearing loss harbor novel mutations in Wolfram syndrome gene 1. *J Mol Med*, 83, (7): 553-560.
- Han X, Luo Y, Ren Q, Zhang X, Wang F, Sun X, Zhou X, Ji L. (2010) Implication of genetic variants near SLC30A8, HHEX, CDKAL1, CDKN2A/B, IGF2BP2, FTO, TCF2, KCNQ1, and WFS1 in type 2 diabetes in a Chinese population. *BMC Med Genet*, 11: 81.
- Hardy C, Khanim F, Torres R, Scott-Brown M, Seller A, Poulton J, Collier D, Kirk J, Polymeropoulos M, Latif F, Barrett T. (1999) Clinical and molecular genetic analysis of 19 Wolfram syndrome kindreds demonstrating a wide spectrum of mutations in WFS1. *American Journal of Human Genetics*, 65, (5): 1279-1290.
- Hayashi T, McMahon H, Yamasaki S, Binz T, Hata Y, Südhof TC, Niemann H. (1994) Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *EMBO J*, 13, (21): 5051-61.
- Hernández F, Gómez de Barreda E, Fuster-Matanzo A, Lucas JJ, Avila J. (2010) GSK3: a possible link between beta amyloid peptide and tau protein. *Exp Neurol*, 223, (2): 322-325.

- Hess EJ, Jinnah HA, Kozak CA, Wilson MC. (1992) Spontaneous locomotor hyperactivity in a mouse mutant with a deletion including the Snap gene on chromosome 2. *J Neurosci*, 12, (7): 2865-74.
- Hofmann S, Philbrook C, Gerbitz KD, Bauer MF. (2003) Wolfram syndrome: structural and functional analyses of mutant and wild-type wolframin, the WFS1 gene product. *Human Molecular Genetics*, 12, (16): 2003-2012.
- Hogewind BF, Pennings RJ, Hol FA, Kunst HP, Hoefsloot EH, Cruysberg JR, Cremers CW. (2010) Autosomal dominant optic neuropathy and sensorineural hearing loss associated with a novel mutation of WFS1. *Mol Vis*, 16: 26-35.
- Hong J, Zhang YW, Zhang HJ, Jia HY, Zhang Y, Ding XY, Zhou DY, Chen HP, Jiang XH, Cui B, Li XY, Ning G. (2009) The novel compound heterozygous mutations, V434del and W666X, in WFS1 gene causing the Wolfram syndrome in a Chinese family. *Endocrine*, 35, (2): 151-157.
- Huang W, Li MD. (2009) Differential Allelic Expression of Dopamine D1 Receptor Gene (DRD1) Is Modulated by microRNA miR-504. *Biological Psychiatry*, 65, (8): 702-705.
- Hur EM, Zhou FQ. (2010) GSK3 signalling in neural development. *Nat Rev Neurosci*, 11, (8): 539-551.
- Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C. (2004) Detection of large-scale variation in the human genome. *Nature Genetics*, 36, (9): 949-951.
- Inkster B, Nichols TE, Saemann PG, Auer DP, Holsboer F, Muglia P, Matthews PM. (2009) Association of GSK3beta polymorphisms with brain structural changes in major depressive disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 66, (7): 721-728.
- Inoue H, Tanizawa Y, Wasson J, Behn P, Kalidas K, Bernal-Mizrachi E, Mueckler M, Marshall H, Donis-Keller H, Crock P, Rogers D, Mikuni M, Kumashiro H, Higashi K, Sobue G, Oka Y, Permutt MA. (1998) A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nature Genetics*, 20, (2): 143-148.

- Inukai K, Awata T, Inoue K, Kurihara S, Nakashima Y, Watanabe M, Sawa T, Takata N, Katayama S. (2005) Identification of a novel WFS1 mutation (AFF344- 345ins) in Japanese patients with Wolfram syndrome. *Diabetes Res Clin Pract*, 69, (2): 136-141.
- Ishihara H, Takeda S, Tamura A, Takahashi R, Yamaguchi S, Takei D, Yamada T, Inoue H, Soga H, Katagiri H, Tanizawa Y, Oka Y. (2004) Disruption of the WFS1 gene in mice causes progressive beta-cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion. *Human Molecular Genetics*, 13, (11): 1159-1170.
- Jeans AF, Oliver PL, Johnson R, Capogna M, Vikman J, Molnár Z, Babbs A, Partridge CJ, Salehi A, Bengtsson M, Eliasson L, Rorsman P, Davies KE. (2008) A dominant mutation in Snap25 causes impaired vesicle trafficking, sensorimotor gating, and ataxia in the blind-drunk mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, (7): 2431-6.
- Jensen KP, Covault J, Conner TS, Tennen H, Kranzler HR, Furneaux HM. (2008) A common polymorphism in serotonin receptor 1B mRNA moderates regulation by miR-96 and associates with aggressive human behaviors. *Mol Psychiatry*, 14, (4): 381-389.
- Johansson C., Jansson M., Linner L., Yuan QP., Pedersen NL., Blackwood D., Barden N., Kelsoe J. Schalling, M. (2001) Genetics of affective disorders. *Eur Neuropsychopharmacol*, 11, (6): 385-394.
- Kakiuchi C, Ishigaki S, Osowski CM, Fonseca SG, Kato T, Urano F. (2009) Valproate, a mood stabilizer, induces WFS1 expression and modulates its interaction with ER stress protein GRP94. *PLoS One*, 4, (1): e4134.
- Kawamoto T, Horikawa Y, Tanaka T, Kabe N, Takeda J, Mikuni M. (2004) Genetic variations in the WFS1 gene in Japanese with type 2 diabetes and bipolar disorder. *Mol Genet Metab*, 82, (3): 238-245.
- Khanim F, Kirk J, Latif F, Barrett TG. (2001) WFS1/wolframin mutations, Wolfram syndrome, and associated diseases. *Hum Mutat*, 17, (5): 357-367.
- Kim JW, Biederman J, Arbeitman L, Fagerness J, Doyle AE, Petty C, Perlis RH, Purcell S, Smoller JW, Faraone SV, Sklar P. (2007) Investigation of variation in SNAP-25

- and ADHD and relationship to co-morbid major depressive disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 144B, (6): 781-90.
- Klein PS, Melton DA. (1996) A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, (16): 8455-8459.
- Koido K, Kõks S, Nikopensius T, Maron E, Altmäe S, Heinaste E, Vabrit K, Tammekivi V, Hallast P, Kurg A, Shlik J, Vasar V, Metspalu A, Vasar E. (2005) Polymorphisms in wolframin (WFS1) gene are possibly related to increased risk for mood disorders. *Int J Neuropsychopharmacol*, 8, (2): 235-244.
- Kovacs-Nagy R, Nagy G, Somogyi A, Szekely A, Sasvari-Szekely M, Ronai Z. (2010) A 2-es típusú diabetes mellitus lehetséges új genetikai rizikófaktora. *Magy Belorv Arch* (63): 133-141.
- Krol J, Loedige I, Filipowicz W. (2010) The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*, 11, (9): 597-610.
- Ku CS., Loy EY., Salim A., Pawitan Y. Chia K. S. (2010) The discovery of human genetic variations and their use as disease markers: past, present and future. *Journal of Human Genetics*, 55, (7): 403-415.
- Kudo T, Kanemoto S, Hara H, Morimoto N, Morihara T, Kimura R, Tabira T, Imaizumi K, Takeda M. (2008) A molecular chaperone inducer protects neurons from ER stress. *Cell Death Differ*, 15, (2): 364-375.
- Kwok JB, Hallupp M, Loy CT, Chan DK, Woo J, Mellick GD, Buchanan DD, Silburn PA, Halliday GM, Schofield PR. (2005) GSK3B polymorphisms alter transcription and splicing in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 58, (6): 829-839.
- Lachman HM. (2008) Copy variations in schizophrenia and bipolar disorder. *Cytogenet Genome Res* 123: 27-35.
- Lachman HM, Pedrosa E, Petruolo OA, Cockerham M, Papolos A, Novak T, Papolos DF, Stopkova P. (2007) Increase in GSK3beta gene copy number variation in bipolar disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 144B, (3): 259- 265.

- Lee RC., Feinbaum RL. és Ambros V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75, (5): 843-854.
- Lee YH, Kang ES, Kim SH, Han SJ, Kim CH, Kim HJ, Ahn CW, Cha BS, Nam M, Nam CM, Lee HC. (2008) Association between polymorphisms in *SLC30A8*, *HHEX*, *CDKN2A/B*, *IGF2BP2*, *FTO*, *WFS1*, *CDKAL1*, *KCNQ1* and type 2 diabetes in the Korean population. *Journal of Human Genetics*, 53, (11-12): 991-998.
- Lehmann U, Hasemeier B, Christgen M, Müller M, Römermann D, Länger F, Kreipe H. (2008) Epigenetic inactivation of microRNA gene *hsa-mir-9-1* in human breast cancer. *J Pathol*, 214, (1): 17-24.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120, (1): 15-20.
- Li WW, Alexandre S, Cao X, Lee AS. (1993) Transactivation of the *grp78* promoter by Ca^{2+} depletion. A comparative analysis with A23187 and the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase inhibitor thapsigargin. *J Biol Chem*, 268, (16): 12003-12009.
- Lin CH, Li LH, Ho SF, Chuang TP, Wu JY, Chen YT, Fann CS. (2008) A large-scale survey of genetic copy number variations among Han Chinese residing in Taiwan. *BMC Genet* 9: 92.
- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, 433, (7027): 769-73.
- Lucas JJ, Hernández F, Gómez-Ramos P, Morán MA, Hen R, Avila J. (2001) Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *EMBO J*, 20, (1-2): 27-39.
- McKernan KJ, Peckham HE, Costa GL, McLaughlin SF, Fu Y, Tsung EF, Clouser CR, Duncan C, Ichikawa JK, Lee CC, Zhang Z, Ranade SS, Dimalanta ET, Hyland FC, Sokolsky TD, Zhang L, Sheridan A, Fu H, Hendrickson CL, Li B, Kotler L, Stuart JR, Malek JA, Manning JM, Antipova AA, Perez DS, Moore MP, Hayashibara KC,

- Lyons MR, Beaudoin RE, Coleman BE, Laptewicz MW, Sannicandro AE, Rhodes MD, Gottimukkala RK, Yang S, Bafna V, Bashir A, MacBride A, Alkan C, Kidd JM, Eichler EE, Reese MG, De La Vega FM, Blanchard AP. (2009) Sequence and structural variation in a human genome uncovered by short-read, massively parallel ligation sequencing using two-base encoding. *Genome Res* 19: 1527-1541.
- Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A. (2004) High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 39, (2): 167-9.
- Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. (2003) Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res*, 1, (12): 882-91.
- Mills RE, Luttig CT, Larkins CE, Beauchamp A, Tsui C, Pittard WS, Devine SE. (2006) An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome. *Genome Res* 16: 1182-1190.
- Mishra PJ, Bertino JR. (2009) MicroRNA polymorphisms: the future of pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine. *Pharmacogenomics*, 10, (3): 399-416.
- Mishra PJ, Humeniuk R, Mishra PJ, Longo-Sorbello GS, Banerjee D, Bertino JR. (2007) A miR-24 microRNA binding-site polymorphism in dihydrofolate reductase gene leads to methotrexate resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, (33): 13513-8.
- Moon HJ, Yim SV, Lee WK, Jeon YW, Kim YH, Ko YJ, Lee KS, Lee KH, Han SI, Rha HK. (2006) Identification of DNA copy-number aberrations by array-comparative genomic hybridization in patients with schizophrenia. *Biochem Biophys Res Commun*, 344, (2): 531-539.
- Muiños-Gimeno M, Montfort M, Bayés M, Estivill X, Espinosa-Parrilla Y. (2010) Design and evaluation of a panel of single-nucleotide polymorphisms in microRNA genomic regions for association studies in human disease. *Eur J Hum Genet*, 18, (2): 218-26.

- Mukai F, Ishiguro K, Sano Y, Fujita SC. (2002) Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta. *J Neurochem*, 81, (5): 1073-1083.
- Must A, Kóks S, Vasar E, Tasa G, Lang A, Maron E, Väli M. (2009) Common variations in 4p locus are related to male completed suicide. *Neuromolecular Med*, 11, (1): 13-19.
- Muszbek K, Szekely A, Balogh ÉM, Molnár M, Rohánszky M, Ruzsa Á, Varga K, Szöllösi M, Vadász P. (2006) Validation of the Hungarian translation of hospital anxiety and depression scale. *Quality of Life Research*, 15: 761-766.
- O'Brien WT, Klein PS. (2009) Validating GSK3 as an in vivo target of lithium action. *Biochem Soc Trans*, 37, (Pt 5): 1133-1138.
- Ørom UA, Nielsen FC, Lund AH. (2008) MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell*, 30, (4): 460-471.
- Osowski CM, Urano F. (2011) The binary switch that controls the life and death decisions of ER stressed beta cells. *Current opinion in cell biology* 23(2):207-215.
- Osman AA, Saito M, Makepeace C, Permutt MA, Schlesinger P, Mueckler M. (2003) Wolframin expression induces novel ion channel activity in endoplasmic reticulum membranes and increases intracellular calcium. *J Biol Chem*, 278, (52): 52755-52762.
- Parrott DJ, Zeichner A. (2007) Determinants of anger and physical aggression based on sexual orientation: an experimental examination of hypermasculinity and exposure to male gender role violations. *Arch Sex Behav*, 37, (6): 891-901.
- Patton JH, Stanford MS, Barratt ES. (1995) Factor structure of the Barratt impulsiveness scale. *Journal of Clinical Psychology*, 51, 768-774.
- Player MS, Peterson LE. (2011) Anxiety disorders, hypertension, and cardiovascular risk: a review. *Int J Psychiatry Med*, 41 (4): 365-377.
- Pobbati AV, Stein A, Fasshauer D. (2006) N- to C-terminal SNARE complex assembly promotes rapid membrane fusion. *Science*, 313, (5787): 673-676.

- Polymeropoulos MH, Swift RG, Swift M. (1994) Linkage of the Gene for Wolfram-Syndrome to Markers on the Short Arm of Chromosome-4. *Nature Genetics*, 8, (1): 95-97.
- Ravindran LN, Stein MB. (2010) The pharmacologic treatment of anxiety disorders: a review of progress. *J Clin Psychiatry*, 71, (7): 839-854.
- Rigoli L, Lombardo F, Di Bella C. (2011) Wolfram syndrome and WFS1 gene. *Clin Genet*, 79(2):103-117.
- Ryan BM, Robles AI, Harris CC. (2010) Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nat Rev Cancer*, 10, (6): 389-402.
- Saetrom P, Biesinger J, Li SM, Smith D, Thomas LF, Majzoub K, Rivas GE, Alluin J, Rossi JJ, Krontiris TG, Weitzel J, Daly MB, Benson AB, Kirkwood JM, O'Dwyer PJ, Sutphen R, Stewart JA, Johnson D, Larson GP. (2009) A Risk Variant in an miR-125b Binding Site in BMPR1B Is Associated with Breast Cancer Pathogenesis. *Cancer Research*, 69, (18): 7459-7465.
- Salaün C, James DJ, Greaves J, Chamberlain LH. (2004) Plasma membrane targeting of exocytic SNARE proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1693, (2): 81-89.
- Saunders MA, Liang H, Li WH. (2007) Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 104, (9): 3300-3305.
- Saus E, Soria V, Escaramís G, Crespo JM, Valero J, Gutiérrez-Zotes A, Martorell L, Vilella E, Menchón JM, Estivill X, Gratacòs M, Urretavizcaya M. (2010) A haplotype of glycogen synthase kinase 3beta is associated with early onset of unipolar major depression. *Genes Brain Behav*, 9, (7): 799-807.
- Schaffer BA, Bertram L, Miller BL, Mullin K, Weintraub S, Johnson N, Bigio EH, Mesulam M, Wiedau-Pazos M, Jackson GR, Cummings JL, Cantor RM, Levey AI, Tanzi RE, Geschwind DH. (2008) Association of GSK3B with Alzheimer disease and frontotemporal dementia. *Arch Neurol*, 65, (10): 1368-1374.
- Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Månér S, Massa H, Walker M, Chi M, Navin N, Lucito R, Healy J, Hicks J, Ye K, Reiner A, Gilliam TC,

- Trask B, Patterson N, Zetterberg A, Wigler M. (2004) Largescale copy number polymorphism in the human genome. *Science*, 305, (5683): 525-528.
- Sethupathy P, Borel C, Gagnebin M, Grant GR, Deutsch S, Elton TS, Hatzigeorgiou AG, Antonarakis SE. (2007) Human microRNA-155 on chromosome 21 differentially interacts with its polymorphic target in the AGTR1 3' untranslated region: a mechanism for functional single-nucleotide polymorphisms related to phenotypes. *American Journal of Human Genetics*, 81, (2): 405-413.
- Sethupathy P, Collins FS. (2008) MicroRNA target site polymorphisms and human disease. *Trends Genet*, 24, (10): 489-497.
- Sequeira A, Kim C, Seguin M, Lesage A, Chawky N, Desautels A, Tousignant M, Vanier C, Lipp O, Benkelfat C, Rouleau G, Turecki G. (2003) Wolfram syndrome and suicide: Evidence for a role of WFS1 in suicidal and impulsive behavior. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 119B, (1): 108-113.
- Soutar MP, Kim WY, Williamson R, Pegg M, Hastie CJ, McLauchlan H, Snider WD, Gordon-Weeks PR, Sutherland C. (2010) Evidence that glycogen synthase kinase-3 isoforms have distinct substrate preference in the brain. *J Neurochem*, 115, (4): 974-983.
- Spellmann I, Müller N, Musil R, Zill P, Douhet A, Dehning S, Cerovecki A, Bondy B, Möller HJ, Riedel M. (2008) Associations of SNAP-25 polymorphisms with cognitive dysfunctions in Caucasian patients with schizophrenia during a brief trial of treatment with atypical antipsychotics. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 258, (6): 335-344.
- Stambolic V, Woodgett JR. (1994) Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta in intact cells via serine 9 phosphorylation. *Biochem J*, 303 (Pt 3): 701-704.
- Stankiewicz P, Lupski JR. (2010) Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu Rev Med*, 61: 437-455.
- Stephens M, Donnelly P. (2003) A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *American Journal of Human Genetics*, 73, (5): 1162-1169.

- Strom TM, Hörtnagel K, Hofmann S, Gekeler F, Scharfe C, Rabl W, Gerbitz KD, Meitinger T. (1998) Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein. *Human Molecular Genetics*, 7, (13): 2021-2028.
- Suh JH, Choi E, Cha MJ, Song BW, Ham O, Lee SY, Yoon C, Lee CY, Park JH, Lee SH, Hwang KC. (2012) Up-regulation of miR-26a promotes apoptosis of hypoxic rat neonatal cardiomyocytes by repressing GSK-3beta protein expression. *Biochem Biophys Res Commun* 423: 404-410.
- Swift M, Swift RG. (2000) Psychiatric disorders and mutations at the Wolfram syndrome locus. *Biological Psychiatry*, 47, (9): 787-793.
- Szantai E, Elek Z, Guttman A, Sasvari-Szekely M. (2009) Candidate gene copy number analysis by PCR and multicapillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 30, (7): 1098-1101.
- Szantai E, Kiraly O, Nemoda Z, Kereszturi E, Csapo Z, Sasvari-Szekely M, Gervai J, Ronai Z. (2005) Linkage analysis and molecular haplotyping of the dopamine D4 receptor gene promoter region. *Psychiatr Genet*, 15, (4): 259-270.
- Szczepankiewicz A, Skibinska M, Hauser J, Slopian A, Leszczynska-Rodziewicz A, Kapelski P, Dmitrzak-Weglarczyk M, Czerny PM, Rybakowski JK. (2006) Association analysis of the GSK-3beta T-50C gene polymorphism with schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychobiology*, 53, (1): 51-56.
- Tafoya LC, Shuttleworth CW, Yanagawa Y, Obata K, Wilson MC. (2008) The role of the t-SNARE SNAP-25 in action potential-dependent calcium signaling and expression in GABAergic and glutamatergic neurons. *BMC Neurosci*, 9: 105.
- Takeda K, Inoue H, Tanizawa Y, Matsuzaki Y, Oba J, Watanabe Y, Shinoda K, Oka Y. (2001) WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain. *Human Molecular Genetics*, 10, (5): 477-484

- Takei D, Ishihara H, Yamaguchi S, Yamada T, Tamura A, Katagiri H, Maruyama Y, Oka Y. (2006) WFS1 protein modulates the free Ca(2+) concentration in the endoplasmic reticulum. *Febs Letters*, 580, (24): 5635-5640.
- Tan Z, Randall G, Fan J, Camoretti-Mercado B, Brockman-Schneider R, Pan L, Solway J, Gern JE, Lemanske RF, Nicolae D, Ober C. (2007) Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. *American Journal of Human Genetics*, 81, (4): 829-834.
- Ueda K, Kawano J, Takeda K, Yujiri T, Tanabe K, Anno T, Akiyama M, Nozaki J, Yoshinaga T, Koizumi A, Shinoda K, Oka Y, Tanizawa Y. (2005) Endoplasmic reticulum stress induces Wfs1 gene expression in pancreatic beta-cells via transcriptional activation. *Eur J Endocrinol*, 153, (1): 167-176.
- Valéro R, Bannwarth S, Roman S, Paquis-Flucklinger V, Vialettes B. (2008) Autosomal dominant transmission of diabetes and congenital hearing impairment secondary to a missense mutation in the WFS1 gene. *Diabet Med*, 25, (6): 657-661.
- van Hoek M, Dehghan A, Witteman JC, van Duijn CM, Uitterlinden AG, Oostra BA, Hofman A, Sijbrands EJ, Janssens AC. (2008) Predicting type 2 diabetes based on polymorphisms from genome-wide association studies: a populationbased study. *Diabetes*, 57, (11): 3122-3128.
- Van Wauwe J, Haefner B. (2003) Glycogen synthase kinase-3 as drug target: from wallflower to center of attention. *Drug News Perspect*, 16, (9): 557-565.
- Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, 318, (5858): 1931-4.
- Vasudevan S, Steitz JA. (2007) AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell*, 128, (6): 1105-18.
- Wang G, van der Walt JM, Mayhew G, Li YJ, Züchner S, Scott WK, Martin ER, Vance JM. (2008) Variation in the miRNA-433 binding site of FGF20 confers risk for Parkinson disease by overexpression of alpha-synuclein. *American Journal of Human Genetics*, 82, (2): 283-289.

- Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M, Shen Y, Chen L, McGuire A, He W, Chen YJ, Makhijani V, Roth GT, Gomes X, Tartaro K, Niazi F, Turcotte CL, Irzyk GP, Lupski JR, Chinault C, Song XZ, Liu Y, Yuan Y, Nazareth L, Qin X, Muzny DM, Margulies M, Weinstock GM, Gibbs RA, Rothberg JM. (2008) The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature* 452: 872-876.
- Wightman B., Ha I. és Ruvkun G. (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75, (5): 855-862.
- Wilson MC. (2000) Coloboma mouse mutant as an animal model of hyperkinesia and attention deficit hyperactivity disorder. *Neurosci Biobehav Rev*, 24, (1): 51-7.
- Wolfram DJ., Wagener HP. (1938) Diabetes mellitus and simple optic atrophy among siblings: report on four cases. *Mayo Clin. Proc.*, (13): 715–718.
- Wong KK, deLeeuw RJ, Dosanjh NS, Kimm LR, Cheng Z, Horsman DE, MacAulay C, Ng RT, Brown CJ, Eichler EE, Lam WL. (2007) A comprehensive analysis of common copy-number variations in the human genome. *Am J Hum Genet*, 80, (1): 91-104.
- Yamada T, Ishihara H, Tamura A, Takahashi R, Yamaguchi S, Takei D, Tokita A, Satake C, Tashiro F, Katagiri H, Aburatani H, Miyazaki J, Oka Y. (2006) *WFS1*-deficiency increases endoplasmic reticulum stress, impairs cell cycle progression and triggers the apoptotic pathway specifically in pancreatic beta-cells. *Human Molecular Genetics*, 15, (10): 1600-1609.
- Yukitake H, Furusawa M, Taira T, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. (2002) *AAT-1*, a novel testis-specific *AMY-1*-binding protein, forms a quaternary complex with *AMY-1*, *A*-kinase anchor protein 84, and a regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase and is phosphorylated by its kinase. *J Biol Chem*, 277, (47): 45480-45492.
- Yurimoto S, Hatano N, Tsuchiya M, Kato K, Fujimoto T, Masaki T, Kobayashi R, Tokumitsu H. (2009) Identification and Characterization of Wolframin, the Product of the Wolfram Syndrome Gene (*WFS1*), as a Novel Calmodulin-Binding Protein. *Biochemistry*, 48, (18): 3946-3955.

- Zhang W, Khan A, Ostenson CG, Berggren PO, Efendic S, Meister B. (2002) Down-regulated expression of exocytotic proteins in pancreatic islets of diabetic GK rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 291, (4): 1038-44.
- Zhang H, Zhu S, Zhu Y, Chen J, Zhang G, Chang H. (2010) An association study between SNAP-25 gene and attention-deficit hyperactivity disorder. *Eur J Paediatr Neurol*, 15, (1): 48-52.
- Zhang B, Xie W, Krasowski MD. (2008) PXR: a xenobiotic receptor of diverse function implicated in pharmacogenetics. *Pharmacogenomics*, 9, (11): 1695-1709.
- Zhao WQ, Townsend M. (2009) Insulin resistance and amyloidogenesis as common molecular foundation for type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*, 1792, (5): 482-496.
- Zigmond AS., Snaith RP. (1983) The hospital anxiety and depression scale. *Acta Psychiatr Scand*, 67: 361-370.

10 Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

1. **Kovács-Nagy R**, Elek Z, Szekely A, Nanasi T, Sasvari-Szekely M, Ronai Z. (2013) Association of aggression with a novel microRNA binding site polymorphism in the Wolframin gene. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 162B, (4): 404-12 (IF: 3,705)
2. **Kovács-Nagy R**, Hu J, Ronai Z, Sasvari-Szekely M. (2009) SNAP-25: a novel candidate gene in psychiatric genetics. *Neuropsychopharmacol Hung*, XI, (2): 89-94. (IF: 0)
3. **Kovács-Nagy R**, Sarkozy P, Hu J, Guttman A, Sasvari-Szekely M, Ronai Z. (2011) Haplotyping of putative microRNA binding sites in the SNAP-25 gene. *Electrophoresis*, 32, (15): 2013-20. (IF: 3,303)

A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények

1. Elek Z, Brauswetter D, **Kovács-Nagy R**, Nagy G, Székely A, Somogyi A, Rónai Z, Sasvári-Székely M. (2010) Mikro-RNS kötőhelyek genetikai variabilitása és a diabetes mellitus. *Magyar Belorvosi Archivum*, 2: 99-103. (IF: 0)
2. Kotyuk E, **Kovács-Nagy R**, Faludi G, Urbán R, Rónai Z, Sasvári-Székely M és Székely A. (2009) A nikotin dependencia és a dopamine D4-es receptor -521 CT promoter polimorfizmusának asszociációja major depresszós betegcsoportban *Neuropsychopharmacologia Hungarica Neuropsychopharmacol Hung*, XI, (2): 59-67. (IF: 0)
3. **Kovács-Nagy R**, Nagy G, Somogyi A, Székely A, Sasvári-Székely M, Rónai Z. (2010) A 2-es típusú diabetes mellitus lehetséges új genetikai rizikófaktora. *Magyar Belorvosi Archivum*, 2: 91-98. (IF: 0)

4. Nagy G, **Kovács-Nagy R**, Kereszturi E, Somogyi A, Székely A, Nemeth N, Hosszúfalusi N, Panczel P, Ronai Z, Sasvári-Székely M. (2009) Association of hypoxia inducible factor-1 alpha gene polymorphism with both type 1 and type 2 diabetes in a Caucasian (Hungarian) sample. *BMC Med Genet*, 19, (10): 79. (IF: 2,840)
5. Nagy G, **Nagy R***, Székely A, Sasvári-Székely M, Somogyi A. (2010) A KCNA3 gén T-1645C polimorfizmusának vizsgálata diabetesben. *Magyar Belorvosi Archivum*, 63: 99-103. (IF: 0)
6. Székely A, **Kovács-Nagy R**, Bányai ÉI, Gósi-Greguss AC, Varga K, Halmai Z, Rónai Z, Sasvári-Székely M. (2010) Association Between Hypnotizability and the Catechol-O-Methyltransferase (COMT) Polymorphism. *Int J Clin Exp Hypn*, 58, (3): 301-315. (IF: 1,842)
7. Tiszlavicz Z, Szabócs A, Takács T, Farkas G, **Kovács-Nagy R**, Szántai E, Sasvári-Székely M, Mándi Y. (2010) Polymorphisms of beta defensins are associated with the risk of severe acute pancreatitis. *Pancreatology*, 10(4), 483-90. (IF: 2,128)

* Névváltozás előtt megjelent közlemény

11 Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Rónai Zsoltnak, a rengeteg segítségért, amit munkám során kaptam tőle, a kitartó türelméért, támogatásáért és barátságáért.

Köszönöm professzor Sasvári-Székely Máriának, a genetikai labor vezetőjének, a témaválasztásban nyújtott segítségét, az építő tanácsokat, amik munkám előmenetelét segítették és a – már gimnazista korom óta – belém vetett bizalmát.

Köszönetemet szeretném kifejezni Mandl József professzor úrnak, a Pathobiokémia program vezetőjének, hogy munkámat ebben az intézetben végezhettem.

Köszönöm Dr. Szántai Eszternek a szakmai segítségét és barátságát.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Székely Annának, az ELTE Pszichológiai Intézet docensének kollaborációjáért és a statisztikai számításokban nyújtott segítségéért.

Köszönöm professzor Faludi Gábornak, a Kútvölgyi Klinikai Tömb Klinikai és Kutatási Mentálhigiénés Osztály főorvosának a munka klinikai részében való részvételét.

Köszönöm Brauswetter Diánának és Elek Zsuzsannának a munka kísérleti részében való segítségét.

Köszönöm a labor összes dolgozójának a szakmai segítségét és a jó légkört, amiben dolgozhattam.