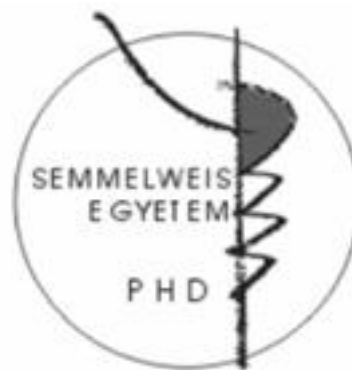


Gén kópiaszám és mikroRNS kötőhely polimorfizmusok vizsgálata

Doktori tézisek

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. Trepper László egyetemi tanár, D.Sc.

Budapest
2013

Bevezetés

Komplex öröklődésű tulajdonság vagy rendellenesség kialakulásában az öröklött és környezeti tényezők egyaránt szerepet játszanak. Az öröklött tényezők kutatásánál különböző polimorfizmusok, mint például az egy pontos nukleotid variációk (SNP) és a fenotípusos jelleg összefüggését szokás vizsgálni. Az SNP-k közül a molekuláris funkció szempontjából igen érdekesek a mikroRNS-ek kötődését befolyásoló SNP-k (miRSNP), melyek a kandiáns gén 3' nem kódoló szakaszában (3' UTR) találhatóak. Az utóbbi időszak másik, gyakran vizsgált polimorfizmus típusa egy nagyobb kiterjedésű ismétlődési polimorfizmus, a kópiaszám variáció (copy number variations, CNV).

Mivel mind a CNV-k, mind a miRSNP-k vizsgálata viszonylag új, mérésükkel kapcsolatban számos technikai probléma merül fel. A bemutatott PhD munka egyik fő célja ennek megfelelően két miRSNP és egy CNV vizsgálatával kapcsolatban felmerülő módszertani kérdések megoldása. A beállított eljárásokat a wolframin (*WFS1*) és a *SNAP-25* gén feltételezett miRSNP-inek valamint a glikogén szintetáz kináz B (*GSK3B*) CNV-jének molekuláris genetikai és pszichológiai-pszichiátriai asszociáció elemzésére alkalmaztuk.

A dolgozat alapját egy interdiszciplináris kollaborációs tevékenység képezi, melyben a pszichológiai és pszichiátriai fenotípusok jellemzését pszichiáter és pszichológus kollégáink végezték. Doktori disszertációmban az általam végzett molekuláris genetikai munka kapja a hangsúlyt, a vizsgált fenotípusokkal kapcsolatos ismereteket csupán röviden kívánom összefoglalni.

Célkitűzés

Két, viszonylag új polimorfizmus-típust vizsgáltunk: a néhány éve felfedezett kópiaszám variáció csoportjába tartozó *GSK3B* gén CNV-t, valamint a funkcionális szempontból új csoportnak számító, a *SNAP-25* és *WFS1* gének kifejeződését feltételezhetően befo-

lyásoló miRSNP-eket. A bemutatásra kerülő munka konkrét célkitűzései a következők voltak:

1. A 3-as kromoszómán található, az *Nr112* 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 fehérje exocitózisban 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 polimorfizmusai 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 kapcsolatának elemzését.**

Módszerek

A vizsgálatokban 432 depresszióban szenvedő, valamint 801 kontroll személy vett részt. A major és a bipoláris depresszió diagnózisa a DSM (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) IV. kritériumai alapján történt a Semmelweis Egyetem Pszichiátriai és Pszichoterápiás Klinikáján és a Kútvölgyi Klinikai Tömb Klinikai és Kutatási Mentálhigiénés Osztályán. A vizsgálatokat és az aláírt beleegyezési nyilatkozatokat az Egészségügyi

Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (ETT-TUKEB) hagyta jóvá. A pszichológiai vizsgálatok során felhasznált kérdőívek: Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS), Buss-Perry Agresszió Kérdőív, Barratt Impulzivitás Skála.

A DNS mintákat szájnyalkahártya-sejtek dörzsölésével nyertük, a DNS izolálása a fehérjék kimosásával illetve a DNS izopropanollal és etanollal történő kicsapásával hagyományos protokoll szerint történt. A CNV és a miRSNP-k genotípusának meghatározásához szekvencia specifikus, fluoreszcensen jelölt TaqMan próbákat alkalmaztunk, a detektálás valós idejű PCR-rel történt. Egyes kísérletekben az azonos elven működő, miniatürizált, nagy hatékonyságú OpenArray genotipizáló rendszert használtuk. A mikroRNS kötőhely vizsgálatok pGL3 és pMIR Report vektorok segítségével, a megfelelő gének teljes 3' UTR régiójának beklónozásával történtek. A genetikai variánsokat irányított mutagenézissel hoztuk létre, a tranziens transzfekcióhoz HEK293T sejtvonalat használtunk. A relatív luciferáz aktivitás mérés során a luminometriával kapott adatokat β -galaktozidáz transzfekciós kontrollhoz viszonyítottuk.

Rövidítések

SNP: egy pontos nukleotid variációk, miRSNP: mikroRNS-ek kötődését befolyásoló SNP-k, CNV: kópiaszám variáció (copy number variation), GSK3B: glikogén szintetáz kináz 3B, SNAP-25: synaptosomal-associated protein, 25kDa WFS1: wolframin gén

Eredmények

A GSK3B kópiaszám polimorfizmusa és a depresszió eset-kontroll vizsgálata

Irodalmi adatok szerint a *GSK3B* gént is magába foglaló CNV a major depresszió, illetve a bipoláris depresszió rizikófaktora lehet, azonban az eredmények ellentmondásosak. 410 depresszióban szenvedő, valamint 410 kontroll személy vizsgálatával **szignifikáns asszociációt ($p = 0,00001$) mutattunk ki a *GSK3B* kópiaszám variánsai és a bipoláris depresszió előfordulása között.** Kimutattuk továbbá, hogy a *GSK3B* gén 3' végének **amplifikációja a legtöbb esetben az 5' vég deléciójával párosul.**

miRSNP-k genotipizálása a SNAP-25 génben

A *SNAP-25* gén *in silico* vizsgálatával két olyan SNP-t azonosítottunk (rs3746544 és rs1051312), melyek hatással lehetnek mikroRNS-ek kötődésére. Ezen SNP-k genotípus és haplotípus meghatározásához megbízható módszereket fejlesztettünk ki. Több mint 1000 fő haplotípusát határoztuk meg, és megállapítottuk, hogy a vizsgált populációból a G–C haplotípus hiányzik.

miRSNP-k genotipizálása a WFS1 génben

In silico vizsgálatokkal két, feltételezett mikroRNS kötőhely polimorfizmust azonosítottunk a *WFS1* génben (rs1046322 és rs9457). Ezen miRSNP-k vizsgálatára kétféle genotipizáló rendszert dolgoztunk ki (PCR-RFLP és valós idejű PCR), melyekkel meghatároztuk a genotípus gyakoriságokat kontroll populációban.

Az agresszió és a WFS1 gén miRSNP variánsai

801 személy DNS mintáin a *WFS1* gén összesen 17 db SNP-jét vizsgáltuk, mely 2 db miRSNP-t foglalt magába. Valamennyi genotípus eloszlás megfelelt a Hardy–Weinberg-egyensúlynak. A személyek pszichológiai jellemzésére 3 féle kérdőív 4 skáláját használtuk (impulzivitás, agresszió, szorongás, depresszió). A

mért fenotípusos jellegek és SNP-k közti asszociáció analízis **szignifikáns ($p = 0,0005$) összefüggést mutatott a kérdőíves eljárással mért agresszió mértéke és az egyik miRSNP (rs1046322) között.** Ez az eredmény a többszörös tesztelésre való korrekció (17×4 teszt) után is szignifikáns maradt.

A WFS1 gén miRSNP-jének funkcionális vizsgálata

Az rs1046322 polimorfizmus *in silico* adatok szerint megváltoztatja a miR-668 kötődését: G allél esetében tökéletes a komplementaritás a miRNS „seed” szekvenciája és a WFS1 mRNS között, míg A allél esetén a kötődés várhatóan gyengébb. Ezt a feltételezést kívántuk alátámasztani molekuláris módszerekkel, luciferáz riportergén rendszer használatával. Ezért a *WFS1* gén 3' UTR szakaszát (vagy egy kontroll szekvenciát) a luciferáz gén mögé klónoztuk, majd irányított mutagenézissel létrehoztuk a másik allélvariánst tartalmazó rekombináns DNS-t. A konstrukciókat HEK293T sejtekbe transzfektáltuk miR-668-cal együtt. Eredményeink alapján **a *WFS1* gén 3' UTR szakaszához kötődő miR-668 gátolja a riportergén transzlációját. Bizonyítottuk továbbá, hogy az A variáns gátló hatása kisebb, mint a G változaté.** Eredményeink igazolják az rs1046322 SNP funkcionális szerepét a *WFS1* gén működésében.

Következtetések

Különböző kandidáns gének miRSNP-it és CNV-jét vizsgáltuk egészséges, illetve major vagy bipoláris depresszióban szenvedő populációkban. A *GSK3B* – irodalmi adatok alapján – a major és/vagy a bipoláris depresszió kandidáns génje, azonban a gént érintő CNV esetében eltérő eredmények születtek. Munkánk során szignifikáns összefüggést mutattunk ki a BP előfordulása és a *GSK3B* CNV variánsai között. Érdekes módon, a *GSK3B* 5' végének deléciója a legtöbb esetben a 3' vég amplifikációjával társult, amely esetenként igen magas kópiaszámot is elért. Ennek az érdekes kombinációnak egy lehetséges magyarázata a deléció miatt csökkent *GSK3B* génextpresszió kompenzálása a mikroRNS-sel

történő gátlás csökkentésével, mely az amplifikált kötőhely miatt alakulhat ki.

A *SNAP-25* és *WFS1* gének esetében miRSNP-eket vizsgáltunk. *In silico* elemzésekkel 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 bázispár távolságban található egymástól. Ezért kidolgoztunk egy hatékony, valós idejű PCR-en alapuló haplotipizáló módszert, mellyel több, mint 1000 fő haplotípusát határoztuk meg, és megállapítottuk, hogy a vizsgált populációból hiányzik a G–C haplotípus.

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. Éppen ezért valószínűsíthető, hogy a *WFS1* gén polimorfizmusai szerepelhetnek a hangulati és az agresszióval valamint 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 szakaszában elhelyezkedő rs1046322 hatással van a miR-668 kötődésére, azaz molekuláris–funkcionális szempontból megfelel a miRSNP kritériumának.

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

Saját publikációk jegyzéke

A dolgozat témakörében megjelent 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 Wolfram 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. SNAP-25. (2009) A novel candidate gene in psychiatric genetics. *Neuropsychopharmacol Hung*, XI, (2): 89-94.
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*, 2011, 32, (15): 2013-20. (IF: 3,303)

A dolgozat témájához szorosan 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.
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.
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.
4. Nagy G, **Kovács-Nagy R**, Kereszturi E, Somogyi A, Szekely A, Nemeth N, Hosszufalusi N, Panczel P, Ronai Z, Sasvari-Szekely M. (2009) Association of hypoxia inducible factor-1 alpha gene polymorphism with both type 1 and type 2 diabe-

- tes 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.
 6. Székely A, **Kovács-Nagy R**, Bányai ÉI, Gősi-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, Szabolcs A, Takács T, Farkas G, **Kovács-Nagy R**, Szántai E, Sasvári-Székely M, Mándi Y. Polymorphisms of beta defensins are associated with the risk of severe acute pancreatitis. Pancreatology. 2010:10(4), 483-90. (IF: 2,128)

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Rónai Zsoltnak, és Prof. Sasvári Máriának, a Molekuláris Genetikai Laboratórium vezetőjének, valamint Mandl József professzor úrnak, a Pathobiokémia program vezetőjének, hogy a bemutatott munkámat támogatásuk mellett végezhettem. Köszönöm munkatársaimnak, Dr. Szántai Eszternek, Brauswetter Diánának, Elek Zsuzsannának és a laboratórium valamennyi dolgozójának a szakmai segítségét és a jó légkört, amiben dolgozhattam.

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

Köszönöm a kollaboráló pszichiátereknek és pszichológusok munkáját, valamint a vizsgálati személyek részvételét.

* Névváltozás előtt megjelent közlemény