

***SNAP-25* GÉN IZOFORMÁINAK ÉS GENETIKAI VARIÁNSAINAK VIZSGÁLATA**

Doktori értekezés

Dr. Németh Nóra

Semmelweis Egyetem

Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Törőcsik Beáta, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Buza Krisztián, Ph.D., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tretter László, D.Sc, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Voszka István, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Vellainé Takács Krisztina, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest
2016

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1 Bevezetés	6
1.1 A SNAP-25	7
1.1.1 A SNAP-25 gén és fehérjetermékei	7
1.1.2 A SNAP fehérjecsald további tagjai	11
1.2 Komplex jellegek, betegségek genetikai hátterének a vizsgálata	13
1.2.1 Komplex jellegek, betegségek	13
1.2.2 Asszociációvizsgálatok	13
1.2.3 Fenotípus, endofenotípus, impulzivitás	14
1.3 Mikro-RNS-ek	16
2 Célkitűzések	22
3 Módszerek	24
3.1 Az izoformák vizsgálata	24
3.1.1 cDNS szintézis	24
3.1.2 DNS-konstrukciók előállítása	24
3.1.3 Izoformák detektálása PCR-RFLP-vel	26
3.1.4 Izoformák detektálása valós idejű PCR-rel	28
3.2 Az asszociációvizsgálat során alkalmazott módszerek	29
3.2.1 Etikai engedély, résztvevők jellemzése	30
3.2.2 Fenotípusos elemzés	30
3.2.3 DNS izolálása	31
3.2.4 A SNAP-25 gén 5' szabályozó régiójában található rs6039769 genotipizálása ...	32
3.2.5 A SNAP-25 gén 5' szabályozó régiójában található rs6077690 genotipizálása ...	32
3.2.6 A SNAP-25 gén 3' szabályozó régiójában lévő rs3756544 és rs1051312 poli- morfizmusok genotípusainak és haplotípusok közvetlen, molekuláris elemzése	33
3.2.7 A SNAP-25 5' szabályozó régiójában lévő rs6039769 és rs6077690 polimorfizmusok haplotípusainak számítása	34
3.2.8 Az impulzivitás és a SNAP-25 gén polimorfizmusai közötti összefüggés számítása	34
3.3 Az <i>in vitro</i> funkcionális vizsgálatokhoz használt módszerek	35
3.3.1 Plazmidkonstrukciók készítése	35
3.3.2 Alkalmazott sejtkultúra, a transzfekció körülményei	36

3.3.3 A sejtek begyűjtése és feltárása	36
3.3.4 Luciferáz és β -galaktozidáz mérés	37
3.3.5 mRNS mérés	37
3.3.6 mikro-RNS mérés	37
4 Eredmények	39
4.1 A SNAP-25 izoformáinak vizsgálata.....	39
4.1.1 A SNAP-25 <i>a</i> illetve <i>b</i> izoformáját kódoló expressziós konstrukciók készítése	39
4.1.2 PCR-RFLP módszer beállítása a SNAP-25 izoformák szemikvantitatív méréséhez.....	39
4.1.3 A SNAP-25 izoformák mérése valós idejű PCR módszerrel	43
4.1.4 A SNAP-25 izoformák előfordulási aránya különböző humán szövetekben.....	46
4.2 A SNAP-25 gén szabályozó variánsainak összefüggése az impulzivitással	47
4.2.1 A SNAP-25 gén 3' és 5' szabályozó régió polimorfizmusai	47
4.2.2 A SNAP-25 gén kiválasztott polimorfizmusainak genotipizálása és haplotipizálása.....	49
4.2.3 A SNAP-25 3' és 5' szabályozó SNP-k genotípus és haplotípus gyakorisága	52
4.2.4 A SNAP-25 SNP-k és az impulzivitás asszociációvizsgálata	54
4.3 A SNAP-25 gén 3' régió SNP-k funkcionális vizsgálata	56
5 Megbeszélés	60
5.1 A fehérjeizoformák mérésének jelentősége	60
5.2 A SNAP-25 mennyiségének kapcsolata neuropszichiátriai betegségekkel	61
5.3 Az impulzivitás: a pszichiátriai betegségek neurobiológiai tényezője	63
5.4 SNAP-25 polimorfizmusok és pszichiátriai megbetegedések	64
5.5 A mikro-RNS-ek megváltozott mennyisége és betegségek kapcsolata.....	67
5.6 A mikro-RNS-ek működését érintő genetikai variánsok	70
6 Következtetések	72
7 Összefoglalás	73
8 Summary	74
9 Irodalomjegyzék	75
10 Saját publikációk jegyzéke	88
11 Köszönetnyilvánítás	89

Rövidítések jegyzéke

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

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

AAA: ATPases associated with diverse cellulare activities

ACPA: citrullinált fehérjék elleni antitest (anti-citrullinated protein antibody)

ADHD: figyelemhiányos hiperaktivitás (attention deficit hyperactivity disorder)

ALG-1: Argonaute-szerű gén (argonaute like genes)

AMPA: alfa-amino-3-hidroxi-5-methyl-4-isoxazolpropionsav

AMPA receptor: AMPA-val gátolható glutamát receptor

ANOVA: varianciaanalízis (analysis of variance)

bp: bázispár

C. elegans: *Caenorhabditis elegans*

cDNS: complementary DNS

ce-RNA: competing endogenous RNA

CPMA: Cross phenotype meta-analízis program

D. melanogaster: *Drosophila melanogaster*

dATP: deoxiadenozintrifoszfát

dCTP: deoxicitozintrifoszfát

dGTP: deoxiguanozintrifoszfát

DHPLC: denaturáló, nagy nyomású folyékony kromatográfia (denaturing high pressure liquid chromatography)

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNS: deoxiribonukleinsav

dTTP: deoxitimidintrifoszfát

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

GAPDH: gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz

H. saimiri: *Herpesvirus saimiri*

HEK293T: humán embrionális vesesejtvonal (human embrionic kidney)

HIV: humán immundeficiencia vírus (human immunodeficiency virus)

HPLC: nagy nyomású folyadékkromatográfia (high pressure liquid chromatography)

IKK komplex: I κ B kináz komplex

kDA: kilo Dalton

LB: lysogeny broth

LTP: long term potentiation

miRISC: mikro-RNS indukálta csendesítő komplex

NSF: N-ethylmaleimid-szenzitív faktor

ONPG: orto-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid

PBS: Phosphate Buffered Saline

PC12 sejtvonala: phaeochromocytoma sejtvonala

PCR: polimeráz lánreakció (polymerase chain reaction)

Q-SNARE: katalitikus centrumában glutamint tartalmazó SNARE fehérje

RBP: RNS-t kötő fehérje (RNA binding protein)

RFLP: restrikciós fragmentumhossz polimorfizmus (restriction fragment length polymorphism)

RNS: ribonukleinsav

R-SNARE: katalitikus centrumában arginint tartalmazó SNARE fehérje

SNAP-23/25/29/47: synaptosomal-associated protein-23/25/29/47

SNARE komplex: soluble NSF attachment protein

SNP: egy pontos nukleotid polimorfizmus (single nucleotide polymorphism)

TAE: Tris-acetát-EDTA puffer

TAT fehérje: a HIV vírus transzkripció transzaktivátor fehérjéje

TDT: transmission disequilibrium test

TE: Tris EDTA

TMMP: target-mediated miRNA protection

Tris: Tris(hidroxymethyl)-aminometan

t-SNARE: célmembránhoz tartozó SNARE (target SNARE)

TUKEB: Tudományos és kutatásetikai bizottság

VEGF: vascular endothelial growth factor

v-SNARE: vezikulához tartozó SNARE (vesicule SNARE)

1 Bevezetés

2013-ban az orvosi Nobel-díjat három kutatónak, James E. Rothmannak, Randy W. Schekman-nak és Thomas C. Südhofnak ítelték oda. A Nobel-díjakról döntő bizottság indoklása alapján kutatásaiknak és felfedezéseiknek eredményeként ismerhetjük ma már **a sejtek közötti vezikuláris transzport mechanizmusát**, amely a sejtek egyik legfontosabb kommunikációs lehetősége, így felelős például az idegrendszeri szinapszisokban történő neurotranszmisszióért vagy a hasnyálmirigy β -sejtjeiben az inzulin szekréciójáért. Ezen folyamatok egyik alapvető komponense az általunk is vizsgált és a jelen dolgozatban bemutatott **SNAP-25**.

2003-ban, 50 évvel a DNS szerkezetének felfedezése után, megfejtették az emberi genom teljes szekvenciáját. Ezen újabb mérföldkő ellenére a remélt további felismerések, sarkalatos eredmények még váratnak magukra. Így például a népbetegségek iker-vizsgálatok alapján már igazolt genetikai hátterét máig sem sikerült pontosan meghatározni. Másfelől a genomszekvencia megfejtésekor az is kiderült, hogy a vártnál jóval kevesebb gént kódol a humán genom, a Mammalian Gene Collection projekt alapján a jelenlegi számítások szerint 18877 génünk van [1]. A viszonylag kis számú génkészlet a fehérjék szintjén ugyanakkor jóval nagyobb diverzitást eredményez, melynek hátterében egyebek mellett az azonos génről átíródó különböző izoformák jelensége áll. **Jelen dolgozatban a SNAP-25 két izoformájának mennyiségi előfordulását vizsgáltuk 10 különböző humán szövetben, amelyhez két, egymástól független módszert dolgoztunk ki.** A SNAP-25 izoformák vizsgálatának jelentősége abban is megnyilvánul, hogy számos kísérleti eredmény mutatja a transzkripciós variánsok mennyiségének megváltozását különböző neuropszichiátriai megbetegedések kapcsán.

Az asszociációvizsgálatok gyakori nehézsége az, hogy a klinikumban használt diagnosztikus kategóriák túl tágak és így nem alkotnak genetikailag homogén csoportot. Ezen nehézség kiküszöbölésére terjedt el az **endofenotípusok vizsgálata**, amelyek olyan, a pszichogenetikai kutatások esetében a személyiséget meghatározó jellemzők, amelyek genetikai meghatározottságot mutatnak, időben kevésbé változnak, standardizálhatóak és objektív módszerekkel mérhetőek. További előnyük, hogy olyan, egészségesekben is jelenlévő jellemzőkről van szó, amelyeknek normál értékei egy skála mentén elhelyezhetőek és a hipotézis szerint ezen skála extremitásai járhatnak együtt kóros

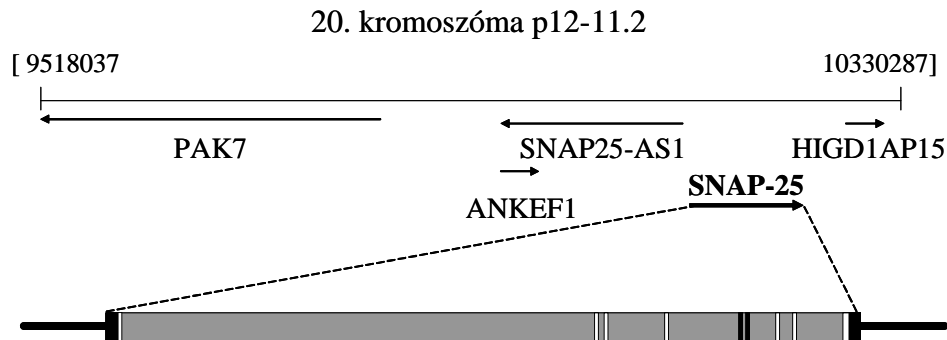
állapototok kialakulásával. Az általunk vizsgált és a dolgozatban bemutatott endofenotípus az **impulzivitás**. Mivel vizsgálatunk ezen része egy **interdiszciplináris, pszichogenetikai vizsgálat** volt, jelen dolgozatban a **munkacsoportunk** illetve általam végzett genetikai munkát szeretném elsősorban bemutatni. Az endofenotípusos jellemzés csak rövidebben kerül ismertetésre, mivel azt **Székely Anna és munkatársai, az ELTE Pszichogenetikai munkacsoportjának** tagjai végezték.

A **mikro-RNS**-ek az elmúlt két évtized egyik legbehatóbban vizsgált molekulái, jelen ismereteink szerint a humán fehérjék mintegy 60%-ának transzlációját befolyásolhatják. A mikro-RNS-ek 21–24 nukleotidból felépülő molekulák, amelyek a sejtmagban és a citoplazmában történő több lépéses érési folyamaton esnek át, majd Argonaute fehérjékhez kapcsolódva fejtik ki hatásukat. Különösen érdekes a mikro-RNS-eket kódoló génekben vagy az általuk felismert célszekvenciában található **genetikai variánsok** jelentőségének, lehetséges hatásainak a vizsgálata. Jelen munkában **in vitro funkcionális vizsgálatokkal** elemeztük a *SNAP-25* gén 3' nem transzlálódó régiójában található genetikai variánsok hatását, melyek *in silico* kutatás alapján mikro-RNS felismerési szekvenciákat érintenek.

1.1 A SNAP-25

1.1.1 A *SNAP-25* gén és fehérjetermékei

A *SNAP-25* fehérje génje emberben a 20. kromoszóma rövid karján található (1. ábra). A gén két izoformát kódol, amelyek mindössze az ötödik exonjukban különböznek egymástól és ez az eltérés a fehérjék szintjén kilenc aminosav különbségében mutatkozik meg. A fehérje teljes neve szinaptoszóma-asszociált fehérje-25 (synaptosomal-associated protein-25), utalva a fehérje alapvető szerepére a szinapszisokban, valamint molekulaszúlyára, amely 25 kDa. 1989-ben azonosították először és írták le a *SNAP-25* kódoló szekvenciáját [2]. Ekkoriban azonban még csak egy izoformát ismertek, egy fehérjét kódoló szakaszt azonosítottak, amely egy 206 aminosavból álló proteint kódol. Leírtak továbbá 4 egymáshoz közel elhelyezkedő ciszteint a fehérje szerkezetén belül, ennek alapján elsőként arra gondoltak, hogy a metalloproteázokhoz hasonlóan koordinatív kötéssel talán fémiont tud megkötni a *SNAP-25*.



1. ábra: A SNAP-25 gén környezete és felépítése. A gének két végén fekete színűen a 3' és 5' szabályozó régió látható, a sötét háttér az intronokat, a fehér csíkok az exonokat jelöli, míg a két fekete csík az alternatív 5a és 5b exonokat mutatja.

1992-ben publikálták azt a cikket, amely beszámol egy olyan kísérletesen létrehozott egérről, a *coloboma* egérről, amely a kettős kromoszómáján heterozigóta formában egy 4,2 Mb hosszúságú deléciót hordozott, ez a deléció érintette a *SNAP-25* gént és régióját is [3]. A delécióra homozigóta egerek nem voltak életképesek, általában még a 6. embrionális nap előtt elhaláloztak. A heterozigóta egerek életben maradtak és a *SNAP-25* mRNS és -fehérje termelésük fele volt a kontroll egerekének, ami azt mutatja, hogy a megmaradt egy *SNAP-25* gén nem volt elégséges, hogy kompenzálja a hiányzó gén hatását. A heterozigóta *coloboma* egerek fenotípusos jellemzése azt mutatta, hogy ezeknek az állatoknak a spontán lokomotoros aktivitása háromszorosa volt a normál egerekéhez képest. A motoros működés mennyiségi mérésére egy olyan rendszerben került sor, amelyben az állatokat 24 órán keresztül figyelték meg. Mind a *coloboma*, mind a kontroll állatok átlagosan 150 perc alatt szokták meg az új környezetüket. A *coloboma* egerek cirkadián ritmusa is azonos volt a kontroll állatokéval, azonban éjszaka valamint napközben az evésekhez köthető időszakokban jóval nagyobb aktivitást mutattak.

A *SNAP-25* két izoformájának jelentőségét számos vizsgálat támasztja alá. Fejlődő egémbriók és fiatal egerek agyát vizsgálva megállapították, hogy míg a prenatális korban az *a* izoforma a domináns, ez a születésük utáni 7. napon élesen megváltozik, és a *SNAP-25 b* változat mennyisége jelentősen megemelkedik [4].

Johansson és munkatársai olyan egereket vizsgáltak, amelyekben hiányzott a *SNAP-25 b* izoformája, azonban az *a* izoforma kétszeres mennyiségben fordult elő. Ezek az állatok fejlődésükben elmaradtak, spontán görcseik voltak és csökkent volt a rövid távú szinaptikus plaszticitásuk. A felnőtt egerek agyában továbbá morfológiai elváltozások

voltak észlelhetőek a hippokampusz területén, és a térbeli mozgás, eligazodás tanulásában is komolyan elmaradtak egészséges társaiktól [5].

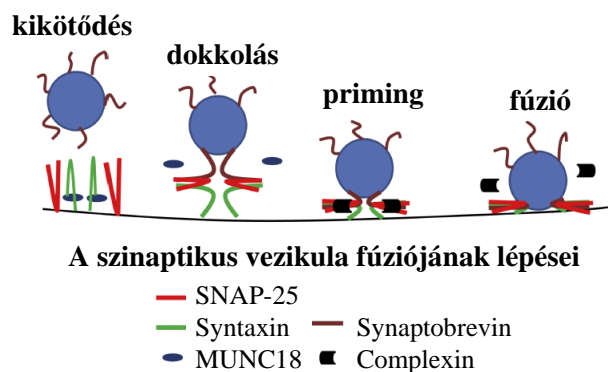
Ugyancsak egerek agyából származó mintákon vizsgálták a SNAP család különböző tagjainak eloszlását. Specifikus antitesteket készítettek a SNAP-25 *a* illetve *b* izoformái, valamint a SNAP-23 fehérjék ellen. Megállapították, hogy míg a SNAP-25 *b* izoformájának expressziója főként az agy egész területén a szinapszisokban gazdag régiókban volt magas, addig a SNAP-25 *a* variáns és a SNAP-23 egymást kiegészítve fordult elő az agyban, mégpedig a rostalis régiókban a SNAP-25 *a* izoforma dominált, míg a kaudális régióban, vagyis a kisagyban, az agytörzsben és a gerincvelőben a SNAP-23. Ezekben a mintákon vizsgálták az izoformák szubcelluláris elhelyezkedését is. Míg a SNAP-25 *b* izoformája és a SNAP-23 a membránfrakciókban gyarapodott fel, addig a SNAP-25 *a* izoformája a szolubilis frakcióban volt jelen nagyobb mennyiségben. Az egér aggyal ellentétben PC12 sejtekben (phaeochromocytoma sejt vonal) a SNAP-25 *a* és *b* izoformája közel azonos mennyiségben volt kimutatható, a lokalizáció ugyanakkor hasonló volt: míg a *b* izoforma a plazmamembránban helyezkedett el, addig az *a* izoforma a SNAP-23-mal együtt a citoplazmában fordult elő főként [6].

A SNAP-25 szinapszisban betöltött szerepét és az egész SNARE komplex (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein – oldékony N-ethylmaleimide-szenzitív faktorhoz (NSF-hez) kapcsolódó fehérje) feltételezett működését elsőként Soyler és munkatársai írták le 1993-ban [7]. Ők azonosították azt a három fehérjét, amelyek egységesen NSF-re érzékenyek és közösen a SNARE komplex képzésében vesznek részt. Az NSF egy olyan enzim, amelynek a génje emberben a 17. kromoszómán található, a fehérje maga pedig egy homo-hexamer formájában található meg a sejtek citoplazmájában. Az NSF enzim az úgynevezett AAA fehérjék családjába tartozik, melyek közös jellemzője, hogy ATP-ázhoz kapcsolódva különböző funkciókat látnak el (ATPases associated with diverse cellulare activities). Ezen enzimek közös szerkezeti eleme egy 230 aminosav hosszúságú konzervált modul. Feltételezések szerint az exocitózis lezajlása után az NSF enzim segítségével bomlik fel a SNARE komplex ATP terhére. Soyler és munkatársai megállapították, hogy az enzim működése gátolható N-ethylmaleimiddel, ami egy maleinsav származék, benne egy imid funkciós csoporttal, de legfőbb tulajdonsága, hogy alkénként reagál a tiolokkal és így gyakran alkalmazzák ciszteinek tartalmazó fehérjék módosítására. *Drosophilákban* az NSF gátlása

komatózus magatartást okozott, feltételezhetően a neuronális funkciók blokkolása révén [8]. Hasonlóképpen a *Dictyostelium* amőbában az azonos funkcióvesztést okozó mutációk az amőba mozgásának teljes megszűnéséhez vezetettek, ami pedig arra utal, hogy az intracelluláris membrántranszportnak szerepe lehet a migrációban is [9].

A SNARE komplex fő feladata a vezikulák exocitózisának mediálása (2. ábra). A SNARE komplexben résztvevő molekulák közös jellemzője, hogy rendelkeznek legalább egy 60–70 aminosavból álló SNARE-motívummal. Ezek a SNARE-alegységek állnak össze egy úgynevezett transz-SNARE komplex-szé, amit 4 SNARE motívum alkot.

Két különböző típusú SNARE-t különböztetünk meg, a v- és a t-SNARE-t, melyek az angol vesicle és target szó kezdőbetűi alapján a vezikuláris oldalon és a célmembrán oldalán elhelyezkedő fehérjéket jelentik. A vezikuláris oldalon helyezkedik el a szinaptobrevin, míg a célmembrán oldalán a SNAP-25 és a szintaxin 1.



2. ábra: A SNARE komplex működése a szinaptikus vezikula fúziójakor. A szinaptikus vezikula membránja összeolvad a sejtmembránnal. Ezek az események a v-SNARE és a t-SNARE fehérjék közötti magas-affinitású interakciók révén következnek be, amit a kalcium szintje és a kalcium-kötő fehérjék szabályoznak, a SNARE-komplex-szel való interakcióik által. Eredetiből magyarra fordítva: [10]

A legfrissebb nomenklatúra azonban már egy új csoportosítást vesz figyelembe, amelynél az a meghatározó, hogy a fehérje a működés szempontjából kitüntetett helyén milyen aminosav-oldalláncot tartalmaz: arginint (R-SNARE) vagy glutamint (Q-SNARE). Eszerint a csoportosítás szerint a szinaptobrevin R-SNARE, a szintaxin és a SNAP-25 pedig Q-SNARE.

A SNAP-25-öt két tulajdonsága különbözteti meg a legtöbb SNARE fehérjétől. Egyrészt két SNARE motívummal is rendelkezik, másrészt azonban nem rendelkezik transzmembrán doménnel, hanem csupán egy palmitinsav-oldallánccal kapcsolódik a membránhoz.

A *Clostridium* baktériumoknak mindezidáig 36 különböző botulinum neurotoxinját azonosították, amelyek 7 szerotípusba csoportosíthatóak, ezeket A-tól G-ig jelölik. Ezek közül a rendkívül veszélyes neurotoxinok közül az A, a C és az E szerotípusúak első sorban úgy fejtik ki a hatásukat, hogy széthasítják a SNAP-25 fehérjét, így a SNARE komplex felbomlik és lehetetlenné válik a neurotransmisszió (a C szerotípusúak a szintaxint is bontják) [11].

1.1.2 A SNAP fehérjecsald további tagjai

A SNAP-23 60%-ban azonos a SNAP-25 *b* izoformájával és testszerte igen nagy mennyiségben fordul elő, ennek megfelelően számos élettani folyamatban mutatták ki szerepét. Jelentőségét bizonyítja az is, hogy a gén kiütésekor egerekben az embrió már a preimplantációs korában, a 3. embrionális napon elhalálozik [12].

Suh és munkatársai azt találták, hogy a SNAP-23 mennyisége magasabb a dendritikus tuskékban valamint posztszinaptikusan is felhalmozódott, míg a SNAP-25 csak az axonokban volt megtalálható. Megállapításuk szerint a SNAP-23-nak fontos szerepe lehet a glutamát receptorok posztszinaptikus regulációjában [13].

A SNAP-23 szerepét kimutatták makrofágokban is a fagoszóma kialakítása során és annak érésében is [14]. Ennek bizonyítására elsőként egy olyan makrofág vonalat használtak, amely túlzott mennyiségben volt képes előállítani a monomer formátumú, Venus-jelöléssel ellátott SNAP-23-at. Ezek a sejtek az Fc-receptor által mediált fagocitózis fokozott mennyiségét mutatták, valamint következő lépésként a SNAP-23 gén kiütésekor ennek ellenkezőjét, vagyis a fagoszómák késleltetett kialakulását és a fagocitózis csökkent aktivitását tapasztalták.

A cukorbetegséggel hozták összefüggésbe a SNAP-23-at Boström és munkatársai, miután azt figyelték meg, hogy kettes típusú cukorbetegségben megbetegedett személyek vázizmából mintát véve a szövetükben szignifikánsan magasabb volt a SNAP-23 szintje egészséges kontroll személyek mintáival összehasonlítva. Leírták továbbá, hogy a

SNAP-23 sejten belüli elhelyezkedése is megváltozik cukorbetegség vázizomszövetében: a fehérje a plazmamembránból a mikroszómákba és a citoszólba tevődik át [15].

Hízósejtekben megállapították, hogy a SNAP-23 foszforilása az IKK komplex (I κ B kináz komplex) IKK2 alegysége által indukálja az IgE mediálta degranulációt [16].

További érdekesség, hogy Uriarte és munkatársai egy olyan fehérjét tudtak előállítani, amely tartalmazta a SNAP-23 N-etilmaleimid-szenzitív faktor kötőfehérje doménjét és a HIV vírus TAT-fehérjéjét (a transzkripció transzaktivátora) [17], majd ugyanez a munkacsoport miután megállapította, hogy a neutrofil granulociták exocitózisa szerepet játszik többek között az akut légzési elégtelenség és a szepszis kaskádmechanizmusában is, bizonyította, hogy ez a folyamat a TAT-SNAP-23 fehérjével megakadályozható és ezt mind *in vitro*, mind *in vivo* modellükben is alátámasztották [18].

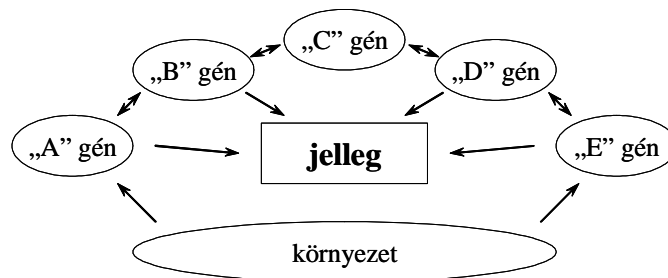
A SNAP-29 egyenletesen expresszálódik az emberi test különféle szöveteiben [19]. Saito és munkatársai asszociációvizsgálat keretében elemezte a gén polimorf variánsait, melynek során szkizofrén és bipoláris depresszióban szenvedő betegek DNS-mintáit hasonlították egészséges kontroll személyek mintáihoz. A *SNAP-29* gén kódoló régióját vizsgálva nem találtak aminosavcserét okozó polimorf variánst, azonban az 5' nem transzlálódó régióban és a promoterben 3 SNP-t azonosítottak, amelyek közül egy – 849 nukleotidnyi távolságban 5' irányban a transzkripció starttól elhelyezkedő – A/G polimorfizmus szignifikáns összefüggést mutatott a szkizofrénia előfordulásával. Wonodi és munkatársai ugyancsak ezen utóbbi polimorfizmust vizsgálták a SNAP-29 promoter régiójában és megállapították, hogy az összefüggés csak az európai származású amerikaiak körében mutatható ki, ezzel ellentétben az afrikai származású amerikai személyek vizsgálata során nem volt szignifikáns különbség az egészséges és a szkizofrén személyek genotípuseloszlásában [20].

A SNAP-47-et 2006-ban azonosították és leírták, hogy a különböző szövetekben egyenletesen oszlik el, de különösen magas a mennyisége az idegszövetekben [21]. Főleg az intracelluláris membránok mentén és a szinaptikus vezikuláknál található meg nagyobb mennyiségben. Ha a SNARE komplexben a SNAP-25-öt SNAP-47-re cserélték ki, akkor bár a SNARE komplex kialakult és működött, mégis kevésbé hatékonyan. Megállapították, hogy az aktivitás-függő AMPA receptorok exocitózisához a szinapszis-hatékonyság hosszútávú növeléséhez (LTP – long term potentiation) speciális SNARE komplexre van szükség, amelyben a SNAP-47 található meg [22].

1.2 Komplex jellegek, betegségek genetikai hátterének a vizsgálata

1.2.1 Komplex jellegek, betegségek

A manapság legtöbb embert érintő, a köznyelvben népbetegségeknek hívott megbetegedések tipikusan összetett hátterűek, ilyenek például a cukorbetegség, a magasvérnyomás-betegség, számos daganatos megbetegedés vagy a különböző pszichiátriai kórképek. Jellemzően nem követik a Mendeli-öröklődést, azonban a család- és ikervizsgálatok arra utalnak, hogy hátterükben a genetikai komponens mégis jelentős. Erre példa a különböző pszichiátriai megbetegedések előfordulásának konkordancia értékei egypetűjű illetve kétpetűjű ikrek között [23] [24], melyek minden vizsgált kórkép esetében jóval magasabbak az egypetűjű ikerpárok csoportjában. Ezen megbetegedések hátterében azonban hasonló fontosságúak a különböző környezeti tényezők is, például cukorbetegség esetén a mozgás hiánya, a nem megfelelő táplálkozás, vagy a pszichiátriai megbetegedések esetén az érintett egyén korai gyermekkori élményei vagy szociális hálója. Fontos azonban, hogy ezek a különböző genetikai és környezeti tényezők nem izoláltan hatnak egy-egy jelleg, megbetegedés kialakulására, hanem egymással kölcsönhatva, közösen alakítják ki azt (3. ábra).



3. ábra: A komplex jellegek kialakulásának multifaktoriális háttere. Az egyes gének egymással is kölcsönhatva, valamint a környezettel együtt közösen alakítják ki az adott jelleget

1.2.2 Asszociációvizsgálatok

A népbetegségek hátterében lévő genetikai komponensek azonosítása a kutatás jelen korszakának egyik nagy kihívása. Jelenleg két fő irányban szokás elindulni, az egyik az előzetes hipotézist nem igénylő teljes genom analízis. Ennek során a legfejlettebb tech-

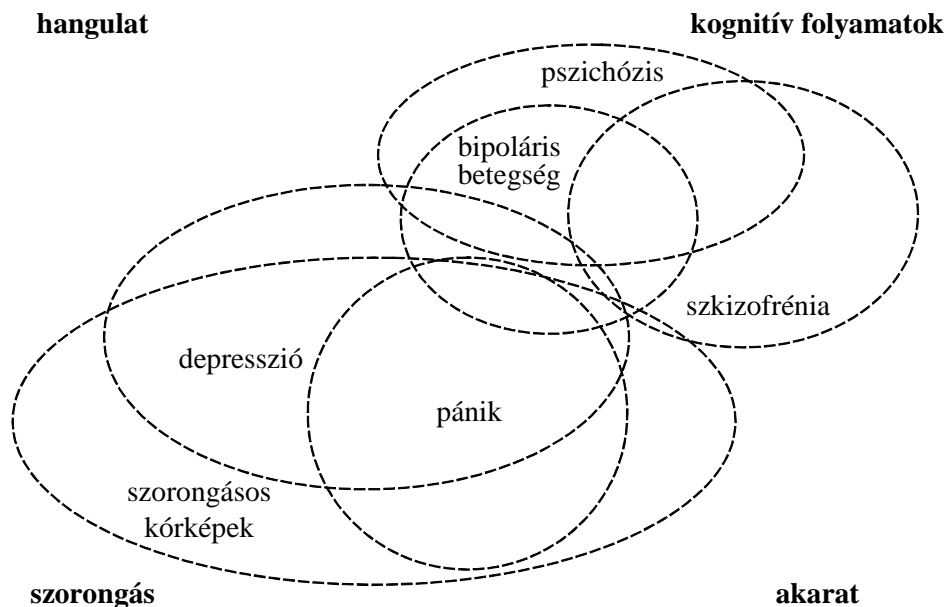
nikák alkalmazásával akár közel két millió SNP-t lehet megvizsgálni [25] és például eset-kontroll vizsgálattal megnézni, hogy bizonyos SNP-k előfordulása gyakoribb-e vagy éppen ritkább-e egy adott betegcsoportban a kontroll mintához képest. A másik lehetőség a kandidáns gének illetve az azokban található genetikai variánsok célzott vizsgálata. Kandidáns géneknek hívjuk azokat a géneket, amelyek olyan fehérjéket kódolnak, amelyek részt vesznek abban a biokémiai útvonalban, amelyet az adott betegség érint. Ilyenek például a cukorbetegség genetikai hátterének vizsgálatakor a szénhidrát-anyagcsere génjei, vagy a pszichiátriai megbetegedéseknél a különböző neurotranszmitterek vagy azok receptorainak vizsgálata.

Az asszociációvizsátokat egy másik szempont szerint csoportosítva megkülönböztethetünk eset-kontroll vizsátokat és varianciaanalízist. Előbbinél két csoportot hasonlítanak össze és ez a két csoport egy kiválasztott fenotípus szempontjából teljesen elkülönül egymástól, például magas vérnyomásbetegség esetén az egészséges kontrollcsoport vérnyomása 140/90 Hgmm alatti, míg a betegcsoport vérnyomás értéke 140/90 Hgmm feletti. A másik megközelítési mód, a varianciaanalízis esetében ugyanezen példán a két csoport nem különül el, hanem egy nagy csoportot alkot, ahol az egyes személyek vérnyomása egy skálán helyezkedik el és azt vizsgáljuk, hogy a skálán való elhelyezkedésük összefügg-e a vizsált genetikai variánssal.

1.2.3 Fenotípus, endofenotípus, impulzivitás

A fenotípus az embernek azon megfigyelhető illetve mérhető jellege, biokémiai, élettani tulajdonsága, amely a kifejeződő gének és a környezeti hatások összeségeként alakul ki. Douglas Falconer 1965-ban írta le multifaktoriális küszöbmodelljét a cukorbetegsége és más gyakori, nem-mendeli öröklődést mutató megbetegedésre. Az elméletet 1967-ben adaptálták a szkizofrénia kialakulásának magyarázatára [26]. Ebben az időben vált egyértelművé, hogy a pszichiátriai megbetegedések klinikai diagnózisok (szindrómák, tünetegyüttesek) szerinti osztályozása nem optimális genetikai, élettani, molekuláris szempontból, mivel ezen megbetegedések hátterében igen komplex genetikai struktúra és biológiai folyamatok összessége feltételezhető. Fontos figyelembe venni azt a tényt is, hogy a különböző neuropszichiátriai diagnózisok között nem húzható éles határ, valamint a tünetek sok esetben hasonlóak is lehetnek (4. ábra). Az érvelések hátterében egyik okként az emberi agy különlegesen bonyolult működését emelik ki, ami megkü-

lönbölteti ezt a szervezet más szerveitől. A máj esetében például szinte minden sejt identikus a fenotípus tekintetében, ezért hasonló a transzkriptomja és a proteomja is, valamint mindezek mellett az interakciói is homogének. Ezzel éles ellentétben az agy egyes sejtjei egymástól lényegesen különböznek, mind a transzkriptom, mint a proteom, mind a morfológiai fenotípusuk szerint, arról nem is beszélve, milyen sokrétű, szerteágazó a kapcsolati rendszerük a többi idegsejttel és a gliasejtekkel, amelyek az optimális működésükhöz elengedhetetlenek. A különféle események a sejtek életében biokémiai, epigenetikai szinteken öröködnék meg, így a sejt memóriája a fehérjemódosítások, morfometriai változások, epigenetikai változások által egyedülállóvá teszi az agyat az ember szervei között [27].



4. ábra: A neuropszichiátriai betegségek átfedései. A genetikai hajlam a különböző pszichiátriai megbetegedésekre az egészséges populációt jellemző faktorok kiengései mentén helyezkednek el. Az ábrán a különböző pszichiátriai kórképek a hangulat, a szorongás, a kognitív folyamatok és az akarat személyiségjegyek mentén helyezkedik el dimenzionálisan. Az eredeti ábra: [28].

Gottesman és Shields 40 évvel ezelőtti írásukban foglalták össze a legfontosabb adatokat a szkizofrénia genetikai hátteréről a tudomány akkori ismeretei alapján. Ők vezették

be a pszichiátriai genetikai kutatások területén az „endofenotípus” fogalmát, mint köztes, belső fenotípust, amit biokémiai, mikroszkópos vizsgálattal lehet karakterizálni [29].

Az endofenotípusok számos jellemzővel rendelkeznek. 1. A kiválasztott endofenotípus összefüggésben áll a vizsgálni kívánt megbetegedéssel a populáción belül. 2. Az endofenotípus bizonyítottan öröklődik. 3. Az endofenotípus állandó, statikus jellemző, mely manifesztálódik a betegben, akár aktív a betegsége, akár nem. 4. Családon belül az endofenotípus és a betegség együttesen különül el. 5. Az endofenotípus az érintett családon belül a nem-érintett személyekben is a populáció átlagánál magasabb százalékban nyilvánul meg [27].

Az általunk kiválasztott és vizsgált endofenotípus az impulzivitás, melyet a reakciókban, döntéshozatalokban való hirtelenség jellemez. A cselekedetek kevésbé átgondoltak, amelyek így gyakran nem kívánt következményekkel járnak. Az impulzivitás kóros megnyilvánulásait számos neuropszichiátriai betegséggel hozták összefüggésbe, így ADHD-val [30], szerhasználati zavarokkal (substance use disorder) [31], bipoláris megbetegedéssel [32], borderline személyiségzavarral [32], antiszociális személyiségzavarral [33].

1.3 Mikro-RNS-ek

A molekuláris biológia elmúlt évtizedeinek az egyik legfontosabb előrelépése volt annak felismerése, hogy a mikro-RNS-ek (miR) a legkülönbözőbb biológiai útvonalak szabályozásában esszenciális szereppel bírnak. 1990 előtt már ismert volt ugyan, hogy léteznek rövidebb, nem kódoló RNS molekulák, azonban nem nyilvánították nekik különösebb jelentőséget egészen mindaddig, amíg Lee és munkatársai 1993-ban le nem írták a lin-4 és a lin-14 gének termékei közötti kölcsönhatást *C. elegans*-ban [34]. Megállapították, hogy a lin-4 maga nem fehérjét, hanem egy 61 nukleotid hosszúságú RNS-terméket kódol, ami érett formájában 21 nukleotid hosszúságú marad. Ez az RNS molekula negatívan befolyásolja a lin-14 fehérje termelődését és ez a szabályozás esszenciális a *C. elegans* posztembrionális fejlődése során. 7 éven keresztül ezt egy anomáliaként tartották számon, amíg fel nem fedezték a második mikro-RNS-t a *C. elegans*-ban, a let-7-et, ami represszálta a lin-41, a lin-14, a lin-28, a lin-42 és a daf-12 expresszióját is a fejlődés során [35].

A mikro-RNS-ek 21–24 nukleotidból épülnek fel és egy több lépésből álló érési folyamaton mennek keresztül, mielőtt kifejthetnék hatásukat a célszekvenciákon. A mikro-RNS-ek transzkripcióját a II-es típusú RNS-polimeráz végzi. Az elsődleges transzkriptumot pri-mikro-RNS-eknek hívják, ezt a Drosha-komplex alakítja át még a sejtmagban, és így alakul ki a pre-mikro-RNS, amely az exportin-5 molekulához kötődve jut ki a citoplazmába. A citoplazmában ezután a Dicer-komplex levágja az ekkor még hajtű formájú molekuláról a hurkot, és így egy kétszálú, rövid molekula marad. Ez kettévál, az egyik szál maga az érett mikro-RNS, amely az Argonauta fehérjéhez kötődve kialakítja a miRISC komplexet (mikro-RNS indukálta csendesítő komplex), míg a másik szál a legtöbb esetben egyszerűen lebomlik [36]. Az utóbbi időkben ugyanakkor megfigyelték, hogy gyakran ez a másik szál is kapcsolódhat az Argonauta fehérjéhez, és leírták, hogy a szenz és antiszenz szálak relatív szintje a különböző szövetekben eltérő lehet [37].

A mikro-RNS-ek jelentőségét mutatja, hogy a jelenlegi becslések alapján a humán transzkriptom több, mint a fele áll mikro-RNS-ek szabályozása alatt [36]. Ezek a rövid, egyszálú, nem kódoló RNS molekulák, az mRNS-en lévő célszekvenciáikhoz kötődnek, amelyek leggyakrabban az mRNS-ek 3' nem transzlálódó régiójában találhatóak, és a legtöbb esetben az érintett gének expressziójának csökkenését okozzák. Számos különböző módon fejthetik ki ezen hatásukat, érinthetik az mRNS élettartamát vagy például represszálhatják a transzláció folyamatát [38]. Sok esetben az érett mikro-RNS kapcsolódik a célszekvenciához, ennek hatására az Argonauta fehérje endonukleázként működve hasítja az mRNS-t. Ez a folyamat növényekben igen elterjedt, állatokban azonban ritkábban fordul elő [39]. Állatokban gyakrabban tapasztalható az mRNS destabilizálása a mikro-RNS bekötődésének hatására [40]. A miRISC komplex tartalmazhat például egy GW182 nevű fehérjét, amely az mRNS-hez való bekötődésekor dezadenilációs faktorokat tud maga köré gyűjteni, így eltávolíttatja az mRNS poli-A farkát, ennek hatására az mRNS lebomlik [41, 42].

A mikro-RNS hatásának kifejtése szempontjából fontos befolyásoló tényező, hogy milyen távol helyezkedik el a *seed* szekvencia az mRNS-en a stop kodontól, mivel a stop kodon utáni első 15 nukleotid még a riboszomális komplex „árnyékába” esik, így a miRISC komplex ide nem tud hatékonyan bekötődni. Leírták emellett, hogy az AU bázispárokban gazdag régiók gyakran tartalmaznak mikro-RNS kötőhelyeket [43].

Ugyancsak megfigyelték, hogy sok esetben a *seed* szekvencia komplementaritása az 5' irányban nem teljes, de ezt a 3' irányban egy kiterjedtebb interakció kompenzálja, erre példa *C. elegans*-ban a lin-41 3' szabályozó régiója és a let-7 mikro-RNS közötti kapcsolat [44]. Ismert továbbá olyan kölcsönhatás is, amikor a mikro-RNS középső szakaszán található „centrális szakaszok” voltak komplementerek a célszekvenciával [45].

Érdekes, hogy az mRNS is visszahathat a mikro-RNS élettartamára. *D. melanogasterben* és human sejteken is kimutatták, hogy a mikro-RNS és a cél-mRNS összepárosodása következtében a mikro-RNS 3' végére uridin nukleotidok kötődhetnek. Ennek a mechanizmusnak az enzime egyelőre nem ismert, azonban tény, hogy az uridinek hozzáadása a legtöbb esetben a mikro-RNS stabilitásának csökkenését okozza [46, 47].

Az Argonauta fehérjék mennyisége önmagában is limitáló tényező a mikro-RNS-ek élettartamát tekintve, mivel a négy Argonauta fehérje közül bármelyiknek a megnövekedett mennyisége a sejtben megemeli az érett mikro-RNS-ek összes mennyiségét is [48]. Ezzel ellentétesen *C. elegans*-ban az ALG-1, Argonauta fehérjét kódoló gén kiütése a mikro-RNS szintjének csökkenésével járt [49], amit azzal magyaráztak, hogy az Argonauta fehérje kötésekor a mikro-RNS védett az XRN-1 és XRN-2 exonukleázok hasításával szemben és ez a védelem szűnik meg a gén kiütésével [50, 51]. A miRISC komplex tagjaként az Argonauta fehérje is pontos szabályozás alatt áll. Ebben játszik szerepet a TRIM-NHL család számos tagja, amelyek közvetlenül kapcsolódnak az Argonauta fehérjéhez, ezáltal befolyásolják, hogy a miRISC komplex milyen mértékben tudja kifejteni génexpressziót módosító hatását a célmolekulákon. Erre példa egérben a LIN41 fehérje, amely az Argonauta fehérje ubikvitinációját és proteozomális lebontását okozza [52]. Az ubikvitináció mellett azonban az Argonauta fehérje egyéb módon is szabályozható. Működését a prolil-4-hidroxiláz is befolyásolhatja, ami humán sejtekben – többek között – az AGO2 fehérjén módosít egy prolint a 700. pozícióban [53]. Hipoxiás körülmények között ezen hidroxiláz enzim expressziója megnövekszik, amelynek következményeként az AGO2 stabilizálódik [54].

Ismert, hogy bizonyos RNS-kötő fehérjék (RBP) mintegy „versenyezhetnek” a miRISC komplexszel az mRNS-ért és így védhetik a mikro-RNS által szabályozni kívánt mRNS-t a lebontódástól, erre példa a HuR, vagy másnéven ELAV1, amely igen széleskörben expresszálódik a szervezet különböző szöveteiben [55]. Hasonlóképp a

DND1 is egy olyan RNS-kötő fehérje, amely a 430-as mikro-RNS szomszédságában ismeri fel a célszekvenciáját és segíti az mRNS fennmaradását azáltal, hogy megnehezíti a miRISC komplex bekötődését [56].

A mikro-RNS-ek szintjére a rendelkezésükre álló célszekvenciák mennyisége is hatással van. Ezt ugyancsak *C. elegans*-ban bizonyították oly módon, hogy olyan riporterekkel látták el a sejtet, amelyek a normális esetben alacsony expressziójú mikro-RNS-ek célszekvenciáját tartalmazták, és ennek következményeként jelentősen megnőtt a mikro-RNS mennyisége a sejtben [51]. Ennek a mechanizmusnak a megnevezése TMMP (target-mediated miRNA protection), azaz célmolekula-mediálta mikro-RNS védelem, ami annyit jelent, hogy egyes mikro-RNS-ek mennyiségére befolyással van az elérhető célmolekulák száma.

A mikro-RNS-ek és mRNS-ek közötti kölcsönhatást Pasquinelly úgy fogalmazza meg, hogy az mRNS-ek egymással „versengenek” az egyes mikro-RNS-ekért, így befolyásolhatják egymás expressziós szintjét. Az ilyen mRNS-eket ce-RNS-nek is hívják, vagyis competing endogenous RNS-ek (versengő endogén RNS) [40]. Egy évvel korábban Salmena és munkatársai vezették be ezt a kifejezést és hipotézisük szerint a ce-RNS-ek, az átírt pszeudogének, az mRNS-ek a mikro-RNS felismerőhelyükkel mind „egy közös nyelvet beszélnek”, vagyis a különböző RNS-RNS interakciók egy szabályozó hálózatot alkotnak egymással, ami igen fontos lehet a sejtek optimális működése szempontjából [57].

Számos módszert dolgoztak ki a mikro-RNS-ek kötőhelyeinek meghatározására. Fontos hangsúlyozni, hogy bár két nukleinsav kölcsönhatásáról van szó, mégis a szekvenciák komplementaritása mellett a mikro-RNS bekötődését számos további tényező is befolyásolja.

A különböző predikciós szoftverek a szekvenciák hasonlóságát veszik alapul, ami természetesen helyes kiindulópont, hiszen a mikro-RNS legnagyobb valószínűséggel ott fog bekötődni, ahol az mRNS-en felismeri a saját „seed” szekvenciájával komplementer szakaszt [58, 59]. Mindazonáltal a különféle predikciós programok a részleges komplementaritás alapján eltérő eredményeket adnak, ezért igen sok álpozitív és álnegatív eredménnyel kell számolni [60]. A tapasztalat azt mutatja, hogy egy mikro-RNS-nek számos mRNS lehet a célmolekulája, de ugyanez fordítva is elmondható: egy mRNS-

hez több miRNS is bekötődhet, mégis nem minden komplementer szakasz lesz a mikro-RNS célszekvenciája [40].

Érdekes jelenséget írtak le Cazalla és munkatársai, miszerint a *H. saimiri* herpesvírus 7 darab fehérjét nem kódoló, uridinban gazdag RNS-t fejez ki a genomjában. Ezeket a molekulákat HSUR-eknek nevezik és képesek a gazdaszervezet T sejtjeiben különböző mikro-RNS-ekhez kötődni. Megfigyelték, hogy a miR-27a-hoz kapcsolódó HSUR hatására csökkent ezen mikro-RNS stabilitása és ennek következményeként megnőtt több miR-27a-célmolekula mennyisége. Egyelőre nem teljesen egyértelmű, hogy ez a vírus számára miért előnyös [61].

Az mRNS-ek és miRNS-ek kölcsönhatásának molekuláris elemzése megvalósítható az immunprecipitáció és az egyre inkább elterjedőben lévő új generációs szekvenálási eljárások ötvözésével. Ennek során UV-fénnyel világítják meg a vizsgálandó mintát, így a fehérje és az RNS molekula között kovalens keresztkötések alakulnak ki, abban az esetben, ha ezek ezt megelőzően direkt kapcsolatban voltak egymással ($\sim 1 \text{ \AA}$ távolságban) a sejten belül. A miRISC komplex tagjaként az Argonauta fehérje így kovalensen kötődik mind a mikro-RNS-hez, mind az mRNS célszekvenciához. Ezeket az immunprecipitációval izolált RNS-eket újgenerációs szekvenátorral elemezve két adathalmaz adódik, melyek kombinációjával meghatározhatóak a mikro-RNS-mRNS kölcsönhatások. Chi és munkatársai ezzel a funkcionális módszerrel egér agymintán genom-szinten határozta meg a miR-124 interakciós térképét [62].

Intenzív kutatás tárgyát képezi a mikro-RNS-ek diagnosztikus és terápiás felhasználási lehetőségeinek feltárása. Már 2002-ben, nem sokkal azután, hogy emlősökben is leírták a mikro-RNS-ek létezését és szerepét, Calin és munkatársai asszociációt mutattak ki a mikro-RNS-ek mennyiségi csökkenése és humán betegségek között: megfigyelték, hogy a miR-15 és miR-16 eltűnése összefügghet a B-sejtes leukémia kialakulásával [63]. Manapság pedig egyre többen foglalkoznak a szérum és plazma mikro-RNS mennyiség meghatározásával abból a célból, hogy diagnosztikai markerekként alkalmazhatóak-e, mivel az eddigi tapasztalatok alapján a mikro-RNS szintek stabilak, reprodukálhatóak és kevésbé variábilisak azonos faj egyedei között [64]. Ji és munkatársai 2009-ben kimutatták például, hogy a miR-208 mennyisége jelentősen megnő patkányokban isoproterenol-indukálta miokardiális infarktus esetén, és ennek az időbeli lefolyása ha-

sonló a szív-specifikus troponin I plazmaszintjeivel, ami a szívinfarktus egyik klasszikus biomarkere [65].

A diagnosztikai felhasználás mellett intenzíven kutatott téma a mikro-RNS-ek mennyiségének befolyásolása terápiás céllal. Az anti-miR elnevezésű gyógyszeres terápiára kifejlesztett molekulák specifikusan gátolják mikro-RNS célmolekulájukat, ezáltal közvetett módon a mikro-RNS által szabályozandó mRNS-ek expresszióját képesek befolyásolni. Az anti-miR-ek felépítésüket tekintve olyan módosított antiszenz oligonukleotidok, amelyek teljesen vagy részben komplementerek a befolyásolni kívánt mikro-RNS szekvenciájával [66]. Ezeknek a molekuláknak azonban számos további követelménynek kell megfelelniük, ahhoz hogy *in vivo* rendszerben is ki tudják fejteni hatásukat. Az anti-miR molekuláknak át kell jutniuk a sejtmembránokon, lassan kell kiválasztódnuk a keringésből, stabilnak kell maradniuk *in vivo* körülmények között is, valamint a kiválasztott cél-mikro-RNS-hez nagy specificitással és nagy affinitással kell kötődniük [67]. Ezek kívánalmak miatt számos kémiai módosítással próbálkoznak mind a mai napig. Erre egy példa az oligonukleotidok 2'-O-metil csoport modifikációja, aminek következményeként a molekula stabil a nukleázokkal szemben, és azt is megfigyelték, hogy ezek a módosított oligonukleotidok érdekes módon stabilabban kötődnek az RNS-hez is [66]. Az eddigi eredmények alapján egerekben a különböző anti-miR-ek hatásosak lehetnek a kardiális diszfunkció javítására, metasztázisok méretének csökkentésére rákos elváltozások esetén vagy csimpánz modellben a vírusmennyiség csökkenését figyelték meg hepatitis C fertőzött állatokban [68-70].

2 Célkitűzések

Laboratóriumunk az ELTE Pedagógiai és Pszichológiai Karának Pszichogenetikai munkacsoportjával szoros együttműködésben hosszabb ideje vizsgálja a humán jellemzőket örökítő kandidáns gének hatásait. Vizsgálataink a dopamin és a szerotonin rendszer, valamint különböző neuroprotektív faktorok, sejtadhéziós molekulák és a szinapszis képzésében fontos fehérjék polimorf régióira összpontosítanak.

A jelen dolgozatban a **SNAP-25 gén molekuláris biológiai és genetikai aspektusai** kerülnek ismertetésre, melyben a pszichogenetikai asszociáció analízis mellett fontos szerepet kapott a polimorfizmusok funkcionális elemzése, valamint a SNAP-25 különböző izoformáinak részletes vizsgálata is. A munka konkrét célkitűzései a következők voltak:

1. A humán SNAP-25 expresszió izoforma specifikus mérése

A **SNAP-25 gén két izoformájának mérésére két, egymástól független amplifikációs módszert** kívántunk kidolgozni a megbízhatóság növelése érdekében. Az amplifikáció izoforma specifitását az izoformák részlegesen eltérő szekvenciája biztosította, a módszerek beállításához és validálásához saját készítésű expressziós vektorokat kívántunk felhasználni.

A validált módszereket a **SNAP-25 gén a és b izoformáinak mennyiségi meghatározására kívántuk alkalmaztuk humán szövetekben.**

2. Pszichogenetikai asszociációvizsgálat a SNAP-25 gén 3' és 5' szabályozó régióiban található fontosabb polimorfizmusok és az impulzivitás személyiségjegy között egészséges mintán.

A **SNAP-25 gén 5' szabályozó régiójából** az rs6077690 és rs6039769 SNP-et kívántuk részletesebben vizsgálni, de mindkét esetben szükséges volt megfelelő genotipizáló módszer beállítására. A **SNAP-25 gén 3' szabályozó régiójában** található rs3746544 és rs1051312 SNP-k vizsgálatához rendelkezésre álltak a laboratóriumban korábban kidolgozott genotipizáló és haplotipizáló módszerek.

Ezt követően 901 személy genotípus és haplotípus adatait meghatározva kívántunk választ adni arra a kérdésre, hogy kimutatható-e szignifikáns asszociáció az egyes genotípusok és haplotípusaik, valamint **az impulzivitás endofenotípusa** között.

3. A *SNAP-25* gén 3' szabályozó régiójában található rs3746544 és rs1051312 SNP haplotípusainak molekuláris-funkcionális vizsgálata.

A két, egymástól mindössze 4 bázispárnyira található polimorfizmus egy feltételezett mikroRNS kötőhelyen található. Molekuláris biológiai eljárásokkal, riporter konstrukciók felhasználásával kívántuk elemzni, hogy a két SNP (rs3746544 és rs1051312) *in vitro* sejtes rendszerben hatással van-e a mikro-RNS-kötődés befolyásolása révén a képződő fehérje mennyiségére.

3 Módszerek

3.1 Az izoformák vizsgálata

3.1.1 cDNS szintézis

A megvizsgálni kívánt 10 különböző humán szövet teljes RNS kivonatait az Agilent Technologies (Santa Clara CA, USA) cégtől vásároltuk. 4 idegrendszeri eredetű szövetet (frontális kéreg, okcipitális kéreg, parietalis kéreg és teljes agy), és 6 idegrendszeren kívüli szövetet (lép, vese, máj, szív, tüdő, hasnyálmirigy) kívántunk megvizsgálni. Ezekből cDNS-t írtunk a High Capacity cDNA Archive Kit alkalmazásával. A reakcióelegy a reverz transzkriptáz enzim mellett tartalmazott 0,2 mM dNTP-t, 1× reverz transzkriptáz puffert, és ugyancsak 1× végkoncentrációban 6 nukleotid hosszúságú random primereket. A termociklus két lépésből állt: 25 °C 10 percen át, majd 37 °C 120 percen át. Az elkészült cDNS-ek minőségét hagyományos gélelektroforézissel ellenőriztük, az egyes minták DNS-koncentrációját NanoDrop készülékkel mértük: az értékek 25 és 40 ng/μl között mozogtak.

3.1.2 DNS-konstrukciók előállítása

Az izoformák detektálására kidolgozott módszereink validálásához elkészítettük a SNAP-25 *a* és *b* izoformáit kódoló expressziós konstrukciókat.

Ehhez első lépésben a humán prefrontális cortex teljes RNS-éből írt cDNS-ről amplifikáltuk a vizsgálni kívánt szakaszt. A primereket a fehérjét kódoló régió két végére terveztük (*1. táblázat*), a primerek tartalmaztak egy-egy restrikciós enzim felismerőhelyet is, a szenz primer az *Xho* I-ét, míg az antiszenz primer a *Bam*H I-ét, melyek segítségével az inzert a pcDNA3.1(-) expressziós vektor klónozó helyébe illeszthető. A pcDNA3.1(-) 5427 bp hosszúságú plazmid, amely többek között tartalmaz egy erős (CMV) promotert, ami a fehérjetermék nagy mennyiségű expresszióját teszi lehetővé, valamint egy BGH-poliadenilációs szignált, amely eukarióta sejtekben a fehérjeexpressziót terminálja. Továbbá megtalálható benne egy multiklónozó hely, ahová az expresszálni kívánt szekvenciánkat ligálni tudjuk, valamint egy ampicillin-rezisztencia gén, melynek segítségével a DNS-konstrukciót tartalmazó baktériumok szelektíven szaporíthatóak.

A PCR-hez a HotStarTaq DNA polymerase kitet alkalmaztuk, követve a cég által ajánlott protokollt.

A reakcióelegy 10 µl térfogatban zajlott, és az alábbi összetevőket tartalmazta: 1× PCR puffer, 1× Q oldat, 200 µM dATP, dCTP, dGTP és dTTP, 1 µM a szenz és antiszenz primerekből, 0,25 U HotStarTaq DNS polimeráz és hozzávetőleg 10 ng cDNS. A PCR termociklus első lépése egy kezdeti denaturáció volt 95 °C-on 15 percen át, ez a lépés a DNS-polimeráz aktiválása miatt is szükséges. Ezután következett 40 ciklus, amely 3 lépésből állt: 94 °C – 30 sec denaturálásból, 60 °C – 30 sec anneálásból és 72 °C – 90 sec extenzióból, majd egy 10 perces 72 °C-os végső extenziós lépés zárta a reakciót. Az elkészült termékeket a PCR-gép 8 °C-on tartotta a további felhasználásáig.

1. táblázat: A SNAP-25 a és b izoformák cDNS-ének pcDNA3.1(-)-ba klónozásához tervezett primerek jellemzői. S: szenz primer AS: antiszenz primer. A szekvenciákban dőlt betűkkel a restrikciós enzimek általunk bevitt felismerőhelyei vannak jelölve (*Xho* I: 5' C[^]TCGAG 3' *Bam*H I: 5' G[^]GATCC 3').

Primerek	Szekvencia (5'–3')
snap-25_S	TCC CCA <i>CTC</i> GAG CCA TGG CCG AAG ACG CAG AC
snap-25_AS	CAG CAT <i>GGA</i> TCC GAG AAC ACG GGT GGG CAC ACT TA

A PCR-termékeket ezután 1%-os agaróz gélen tettük láthatóvá, a futtatás időtartama 45 perc, az alkalmazott feszültség 110 V volt. Az elválasztást 10 perces etídium-bromidos (0,5 µg/ml 1 x TAE oldatban) festés követte, majd a fényképezés UV fény alkalmazásával történt, GelDoc 1000 gél dokumentációs berendezéssel (Biorad, Hercules, CA, USA). A specifikus terméket UV fény mellett kivágtuk a gélből, majd Promega Wizard[®] SV Gel and PC Clean-UP System kittel – a cég által javasolt protokoll alapján – megtisztítottuk. Következő lépésben mind a klónozni kívánt inzertünket, mind a pcDNA3.1(-) vektort FastDigest *Bam*H I és *Xho* I restrikciós endonukleázokkal emésztettük 37 °C-on 15 percen át. Ezt követően a két reakcióelegyet ismét 1%-os agaróz gélen futtattuk a korábbival azonos körülmények között és ugyancsak azonos módon a termékeket kivágtuk és megtisztítottuk. A ligálás előtt NanoDroppal megmértük az inzert és a vektor koncentrációit, és ez alapján, valamint a két termék bázispárban mért hosszai alapján kiszámítottuk a szükséges mennyiségeket, hogy a ligáláshoz alkalmazott

vektor-inzert arány az irodalmi adatok alapján ajánlott 1 : 3 legyen. A ligálás szobahőmérsékleten történt egy éjszakán át a T4 ligáz enzimmel az enzimhez tartozó saját pufferben. A ligátumot másnap XL-10 Gold kompetens sejtekbe transzformáltuk. A transzformálás hősokkal történt, 42 °C-on fél percent át. Ezután a reakcióelegyhez 250 µl LB – 0,4% glükóz oldatot adtunk és 37 °C-on egy órán át rázattuk, majd 50 ng/µl ampicillint tartalmazó LB-agar lemezekben kentük ki őket, amiket 37 °C-on inkubáltuk egy éjszakán át. Másnap reggeltől délutánig a lemezeket 4 °C-on tároltuk, majd délután 5 ml LB-ben egyenként leoltottuk őket, a leoltásokat is egy éjszakán át rázattuk 37°C-on. A következő napon a telepekből felnőtt sejteket Promega PureYield™ Miniprep kittel tisztítottuk, majd megszekvenáltattuk. A szekvenálás eredményeként kiválasztottunk egy-egy konstrukciót, amely a SNAP-25 *a* illetve *b* izoformájának szekvenciáját tartalmazta. Ezekből nagyobb mennyiségű és tisztaságú konstrukciót újbóli transzformálással, 50 ml LB-ben egy éjszakán át történő felneveléssel állítottunk elő. A baktérium sejtszuszpenzióból Promega Pure Yield™ Midiprep kittel tisztítottuk meg a konstrukciókat, ezek koncentrációját NanoDroppal mértük meg, majd ezeket az oldatokat használtuk a további kísérleteinkhez.

3.1.3 Izoformák detektálása PCR-RFLP-vel

Az izoformák PCR-RFLP-vel való detektálásához elsőként olyan restrikciós enzimet kerestünk, amely szelektíven csak az egyik izoforma szekvenciájában rendelkezik felismerőhellyel. Ehhez a NEBCutter [71] webes alkalmazást használtuk és a *Dde* I enzimet választottuk, amely restrikciós enzim kizárólag az *a* izoformát hasítja. Következő lépésben az Oligo5.0 szoftverrel olyan primerekpárokat terveztünk, amelyek közrefogták a felsokszorozni kívánt variábilis ötödik exon szakaszát (2. táblázat).

2. táblázat: A SNAP-25 *a* és *b* izoformák elkülönítéséhez tervezett primerek.

snap-25_dde1: szenz primer, snap-25_dde2: antiszenz primer.

Primerek	Szekvencia (5'–3')
snap-25_dde1	TGT CTT TCC TTC CCT CCC TGC TC
snap-25_dde2	CAT CTG CTC CCG TTC GTC CAC T

Elsőként egy gradiens PCR alkalmazásával beállítottuk az optimális anneálási hőmérsékletet, amely alapján a további kísérletekhez a 62 °C-os anneálási hőmérséklet bizonyult legmegfelelőbbnek. A PCR-hez a HotStarTaq DNA polymerase kitet alkalmaztuk, azonos módon a 3.1.2-es pontban leírtakhoz.

A restriktációs emésztés során a *Dde* I enzim koncentrációja 0,5 U/l a hasítást 1× NEBuffer 3 oldatban, 37 °C-on 3,5 órán át végeztük el.

Az elválasztás hagyományos gélelektroforézissel történt, a gél 2,5%-os SeaKem® LE (alacsony elektroosmotikus áramlású) agarózból készült, az elválasztás körülményei az alábbiak voltak: 10 V/cm, 1 óra. A gélt az elválasztás után etídium-bromidos (0,5 µg/ml) 1× TAE oldatban 10 percen át festettük, majd a gélt UV fényben tettük detektálhatóvá, amelyhez a GelDoc 1000 berendezést (Biorad, Hercules, CA, USA) alkalmaztuk. A kapott termékek szemikvantitatív denzitometriás analízisét a Quantity One szoftvercsomaggal hajtottuk végre.

A hagyományos alámerülő agaróz gélelektroforézissel szemben gyorsabb, hatékonyabb és pontosabb elválasztást tett lehetővé a kapilláris gélelektroforézis módszer alkalmazása. Munkánk során a Qsep100 DNA-CE (BiOptic, Inc., New Taipei City, Taiwan) berendezés miniaturizált, egy kapillárisos típusát alkalmaztuk, az elválasztás effektív hossza $l = 11$ cm, a kapilláris teljes hossza $L = 15$ cm, belső átmérőjépedig 75 µm volt. A gél-puffer rendszer tartalmazta az etídium-bromidot is, így valósítható meg a DNS-fragmentumok láthatóvá tétele egyből a futtatás során. A gerjesztés LED-diódásor (fényt kibocsátó diódásor) segítségével történt 525 nm-en, az emittált 590 nm hullámhosszúságú jelet a gép a kapillárison lévő ablaknál detektálta. Az egymást követő futtatások pontosabb illeszthetősége céljából minden elválasztás során két illesztő markert – 20 bp (1,442 ng/µl) és 5000 bp (1,852 ng/µl) – is injektáltunk a vizsgálandó minták mellett. Minden futtatás előtt a kapillárisba új gél-puffer oldatot töltöttünk, ezt követte a két marker (4 kV, 10 sec), majd a minták injektálása (4 kV, 10 sec). Az elválasztás szobahőmérsékleten, 8 kV-os elektromos feszültség mellett (533 V/cm térerő alkalmazásával) történt. Az adatok kiértékeléséhez a Q-Expert szoftvercsomagot (BiOptic, Inc., New Taipei City, Taiwan) alkalmaztuk.

3.1.4 Izoformák detektálása valós idejű PCR-rel

A SNAP-25 *a* és *b* izoformáinak szelektív amplifikálásához szekvenciaspecifikus primereket terveztünk. A transzkripció variánsok minél megbízhatóbb elkülönítése céljából a primereket úgy választottuk meg, hogy azok a 3' végükön legalább kettő, az adott izoformára specifikus nukleotidot tartalmazzanak. A 3. táblázatban a primerek nukleotidszekvenciájában aláhúzott nukleotidok az adott transzkripció variánsra specifikus pozíciókat jelölik. A primerek specificitását a SNAP család többi génjével (SNAP-23, 29 és 47) szemben az NCBI Human Nucleotide BLAST [72] alkalmazásával ellenőriztük.

3. táblázat: A valós idejű PCR méréshez tervezett specifikus primerek szekvenciája. A primerek nevében a SNAP-25 utáni *a* és *b* betű jelöli a mérni kívánt izoformát. Az aláhúzott betűk jelölik a primerek szekvenciaspecifikus bázisait. S: szenz primer, AS: antiszenz primer.

Primerek	Szekvencia (5'–3')
SNAP-25 <i>a</i> izoforma	
snap-25a_S	GAA GGC ATG <u>AAC</u> CAT ATC AAC <u>C</u>
snap-25a_AS	<u>GCC</u> <u>ACA</u> <u>GCA</u> TTT <u>CCC</u> TAA <u>ATC</u> <u>TT</u>
SNAP-25 <i>b</i> izoforma	
snap-25b_S	GAA GGG ATG <u>GAC</u> CAA ATC AAT <u>A</u>
snap-25b_AS	CTT GTT ACA <u>GGG</u> ACA <u>CAC</u> <u>AC</u>

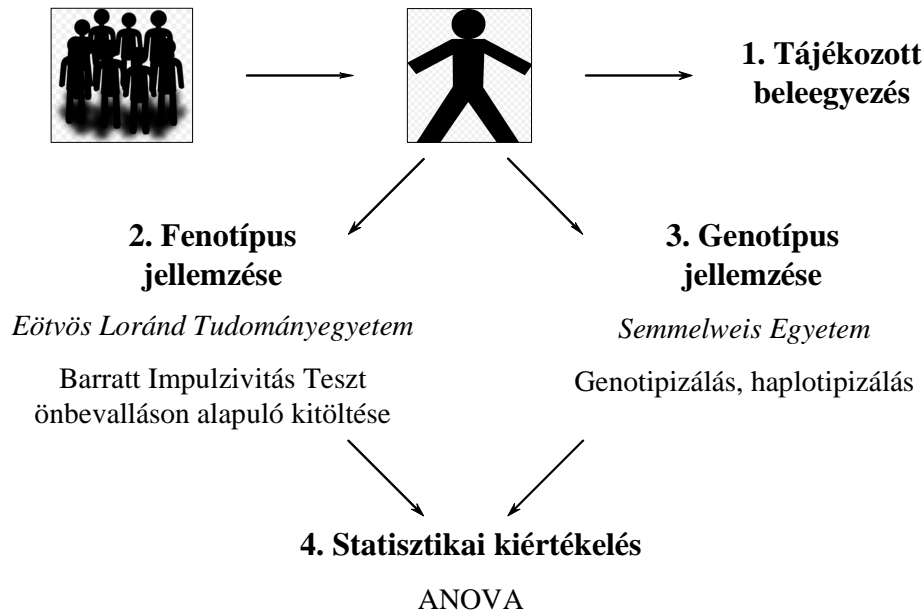
Belső kontrollként a GAPDH (gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz) háztartási gént amplifikáltuk a különböző szövetek összehasonlíthatósága céljából, melyhez a kereskedelmi forgalomban kapható primer-próba szettet használtunk (Hs99999905_m1, Life Technologies, Grand Island, NY, USA). A valós idejű PCR osztérfogata minden minta esetében 20 µl volt, amely a következőket tartalmazta: 1× SybrGreen PCR Master Mix (AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase, dATP, dCTP, dGTP és dTTP, ROX passzív referenciafesték), 1 µM primerek és körülbelül 10 ng a vizsgálandó szövet cDNS-éből. A termociklusokat egy kezdeti 10 perces denaturációs lépés vezette be 95 °C-on, melynek során a hő hatására a DNS-polimeráz enzim aktiválódott. Ezt 40 ciklus követte, amely két lépésből állt: 95 °C 15 másodpercig, majd 60 °C 1 percen át. A közös anneálás–

extenzió mellett szintén az utóbbi lépésben történt a fluoreszcens intenzitás mérése is az egyes ciklusok során, melyhez az Applied Biosystems 7300-as Real Time PCR rendszerét alkalmaztuk (Grand Island, NY, USA). A rendszer belső normalizációja és a mennyiségi mérés további pontosítása érdekében a ROX intenzitásértékeket használtuk fel.

3.2 Az asszociációvizsgálat során alkalmazott módszerek

A genetikai asszociációvizsgálatok célja konkrét genetikai variánsok azonosítása olyan fenotípusos jellemzők hátterében, melyeknél a genetikai komponens még nem ismert, de ikervizsgálatok, családi halmozódás, klinikai megfigyelések révén valószínűsíthető. Az asszociációvizsgálatok lehetnek eset–kontroll tanulmányok, itt jellemzően egy betegcsoportot hasonlítanak egy egészséges populációhoz. Másik megközelítést jelent a családvizsgálat, melynek során a genotípus–fenotípus összefüggést családi triókon (két szülő és egy utód) vagy nagyobb családfákon próbáljuk nyomon követni. Ennek az eljárásnak az az egyik előnye, hogy elkerülhetőek a populáció stratifikáció következtében fellépő ál-pozitív eredmények.

Lehetőség van arra is, hogy kvantitatív fenotípusokat elemezzünk. Ilyenkor azt vizsgáljuk, hogy egy adott populáción belül a genetikailag eltérő csoportok fenotípusos jellemzői milyen mértékben térnek el egymástól. Munkánk során ezen utóbbi megközelítést alkalmaztuk, az impulzivitás endofenotípus és a SNAP-25 génvariánsok feltételezett összefüggésének elemzésére. Az 5. ábra áttekintést nyújt az Eötvös Loránd Tudományegyetemmel együttműködésben végzett vizsgálat menetéről. Az asszociációvizsgálat az ELTE Pedagógiai és Pszichológiai Karának pszichogenetikai munkacsoportjával szoros kollaborációban zajlott. A kísérletben résztvevő személyek kiválasztása, fenotípusos jellemzése és az adatok feldolgozása általuk történt, míg a genotípusok és haplotípusok meghatározása a mi munkacsoportunk feladata volt.



5. ábra: Áttekintő ábra az asszociációvizsgálat menetéről. Önkéntes személyek a tájékoztatott beleegyezés után az ELTE PPK-n kitöltötték a Barratt tesztet, míg a DNS-mintájuk a Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani Intézetében került feldolgozásra, majd a két adatsorból ANOVA módszerrel statisztikai kiértékelést végeztünk.

3.2.1 Etikai engedély, résztvevők jellemzése

A dolgozatban bemutatott asszociációvizsgálatban 901 egészséges, magyar fiatal felnőtt vett részt. A vizsgálatból kizártuk azokat a személyeket, akiknél korábban vagy a vizsgálat ideje alatt – saját bevallás alapján – pszichiátriai jellegű megbetegedés állt fenn. A genetikai vizsgálathoz szükséges *non-invazív* (szájnyálkahártya) mintavétel előtt a résztvevők a kutatás menetéről részletesen tájékoztatást kaptak, majd írásos beleegyező nyilatkozatot töltöttek ki. A vizsgálat protokollját az ETT-TUKEB (Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottság) hagyta jóvá. A résztvevők átlag életkora 21,3 év ($\pm 3,3$ év), a nő–férfi arány 54,9%–45,1% volt.

3.2.2 Fenotípusos elemzés

Asszociációvizsgálatunk célja az impulzivitás genetikai hátterének a vizsgálata volt. Három ikervizsgálat egybehangzó eredménye nyomán 45%-ra tehető ezen jelleg öröklött

komponense [73]. Az impulzivitás mérésére a Barratt Impulzivitás Skála 11. javított kiadásának magyar verzióját használtuk. A Barratt-skála egy önbevalláson alapuló mérő módszer, amely széles körben elterjedt mind a klinikusok, mind a kutatók körében. A kérdőív első verzióját 1959-ben publikálta Barratt, majd a ma is használt verziója 1995-ben jelent meg [74]. A magyar verzió elkészítésekor előbb a forrásszöveget fordították le, majd az így kapott magyar változatot visszafordították angolra, így ellenőrizve a fordítás pontosságát [75]. A skála Cronbach-alfa értéke, amely a teszt belső konzisztenciáját, megbízhatóságát mutatja 0,808 volt. A kérdőív 30 kérdésből áll, amely a cselekvésre és gondolkodásra kérdez rá különböző szituációkban. A résztvevőknek egy négy fokozatú skálán azt kell megadniuk, hogy az adott állítások mennyire („alkalmanként”, „ritkán”, „gyakran” vagy „mindig”) érvényesek rájuk. Az impulzivitást a teszt 3 tengely mentén méri (1. figyelem hiánya, kognitív instabilitás; 2. motoros impulzivitás mértéke, motoros aktivitás, kitartás hiánya; 3. nem tervezett cselekedetek, a cselekedetnél az impulzivitás mértéke, önkontroll hiánya), ezek összegéből adódik a végleges pontszám. Az elméletileg elérhető legmagasabb pontszám 120, legalacsonyabb 30; és általánosan elfogadott, hogy az impulzivitás egészségesnek mondható 52 és 71 pont között.

3.2.3 DNS izolálása

A genetikai analízis *non-invazív* módon nyert szájnyalkehártya mintából történt, a résztvevők saját maguk vattapálcával dörzsölték a szájnyalkehártyájuk különböző területét fél-fél percen át, így összesen négy mintát adtak. A mintákat további feldolgozásáig – 20 °C-on tároltuk. A DNS izolálásának első lépéseként a szájnyalkehártya-mintákat egy éjszakán át 0,2 mg/ml-es proteináz K oldatban inkubáltuk 56 °C-on. Ezt követte a fehérjék denaturálása telített NaCl-oldattal. Végül a DNS kicsapását az általános protokoll szerint izopropanollal és etanollal végeztük, majd a DNS csapadékot 100 µl 0,5× TE pufferben (1× TE: 10 mM Tris pH = 8, 1 mM EDTA) oldottuk fel. Minden egyes minta DNS-koncentrációját Varioscan Flash spectral scanning multimode műszerrel fluorimetrián alapuló eljárással mértük meg.

3.2.4 A *SNAP-25* gén 5' szabályozó régiójában található rs6039769 genotipizálása

A *SNAP-25* gén 5' szabályozó régiójában található rs6039769 polimorfizmus genotipizálásához kereskedelmi forgalomban megvásárolható primerpárt és TaqMan próbákat alkalmaztunk (C__29497348_10, Life Technologies). A kísérletet 7300-as típusú Real Time PCR (Life Technologies) gépen végeztük. A valós idejű detektálás mellett a gép a kísérlet befejezésekor a végpontban is detektálja az össz-fluoreszcencia értékeket, majd ennek alapján a mintákat egy diagrammon elhelyezi, ahol az *y* tengely a FAM intenzitási értékeknek felel meg, míg az *x* tengely a VIC festék intenzitási értékeit jeleníti meg. Magas FAM jelhez tartozó alacsony VIC jel esetén mintáink CC homozigóták voltak, míg a fluoreszcencia értékek fordított jelenléte AA genotípusra utalt. Abban az esetben, ha mindkét fluoreszcencia-érték viszonylagosan magas volt, akkor a vizsgált mintákat heterozigótaként azonosítottuk.

3.2.5 A *SNAP-25* gén 5' szabályozó régiójában található rs6077690 genotipizálása

A *SNAP-25* gén 5' szabályozó régiójában található másik kiválasztott polimorfizmust, az rs6077690-t PCR-RFLP módszerrel genotipizáltuk. A PCR-hez szükséges primereket az Oligo 5.0 nevű szoftverrel terveztük (4. táblázat).

4. táblázat: A *SNAP-25* rs6077690 SNP genotipizálásához tervezett primerek.

snap-25_tsp1: szenz primer snap-25_tsp2: antiszenz primer.

Primerek	Szekvencia (5'–3')
snap-25_tsp1	ATG TCA GTG TGG GGC ATC
snap-25_tsp2	AGG CAT GTT GCT GAA ATT TGT T

A PCR amplifikációhoz a Qiagen HotStarTaq DNS-polimerázát alkalmaztuk, a reakciók végtérfogata 10 µl volt, ami tartalmazta a szenz és antiszenz primereket 1 µM-os végkoncentrációban, 0,2 mM-t a négyféle deoxiribonukleozid-trifoszfátból (dATP, dCTP, dGTP és dTTP), 0,25 U HotStarTaq DNS-polimerázt a hozzá tartozó 1× pufferrel és 1× Q-oldattal, valamint reakciónként körülbelül 4 ng genomi DNS mintát.

A termociklusokat egy 15 perces kezdeti denaturáció előzte meg 95 °C-on, ekkor aktíválódott a DNS-polimeráz is. Ezt követte 40 ciklus, melynek első lépése a 94 °C-os egy

percig tartó denaturáció volt, az anneálás 63 °C-on történt 30 mp-ig, és ezt az extenzió lépése követte 72 °C-on egy percen át. A 40 ciklus után egy végső extenziós lépés zárta a folyamatot 72 °C-on 10 percig, majd a mintákat a gép további feldolgozásig 8 °C-on tartotta.

Következő lépésben a PCR-termékeket *Tsp* I 509 restrikciós endonukleázzal emésztettük. A tervezett PCR-termékünk két nem polimorf hasítóhelyet is tartalmazott, amelyek segítségével az emésztés körülményeit tudtuk minden esetben ellenőrizni és a teljes hasítást biztonsággal megállapítani. A reakció 16 µl végtérfogatban zajlott 65 °C-on 3,5 órán keresztül. A reakcióelegy 1× NEB1 puffert, 1 U *Tsp* I 509 restrikciós enzimet, valamint 8 µl PCR-terméket tartalmazott. Az emésztés során az A allél előfordulásakor 301, 110, 81 és 18 bp hosszúságú termékek keletkeztek, míg a T allél esetén a 301 és 110 bp hosszúságú termékek helyett egy 411 bp-os fragmentumot detektáltunk, mivel a T allél jelenléte az SNP helyén lévő *Tsp* I 509 felismerőhelyet elrontotta. A kapott DNS-molekulákat hagyományos gélelektroforézissel választottuk el és etídium-bromiddal tettük láthóvá a korábban leírtak szerint. A genotipizálás hatékonysága 97 %-os volt.

3.2.6 A *SNAP-25* gén 3' szabályozó régiójában lévő rs3756544 és rs1051312 polimorfizmusok genotípusainak és haplotípusok közvetlen, molekuláris elemzése

Mivel a 3' szabályozó régióban vizsgálni kívánt polimorfizmusok között mindössze 3 bázispár van, ezért lehetséges volt a haplotípusok direkt azonosítása minden egyes minta esetében, amely módszert Kovács-Nagy Réka dolgozott ki és mutatott be PhD-munkájában. Röviden, valós idejű PCR során saját tervezésű, haplotípus-specifikus TaqMan próbákat alkalmaztunk. Két párhuzamos reakcióban két-két különböző próba volt a reakcióelegyekben, így mind a négy haplotípust egyidejűleg detektálni tudtuk. A próbákat VIC és FAM festékekkel jelöltük. Az amplifikációt és a fluoreszcens jelek detektálását 7300-as típusú valós idejű PCR géppel végeztük (Life Technologies). A minták 98%-a volt kiértékelhető. Az rs3746544 és az rs1051312 polimorfizmusok genotípusait a haplotípusok ismeretében határoztuk meg.

3.2.7 A *SNAP-25* gén 5' szabályozó régiójában lévő rs6039769 és rs6077690 polimorfizmusok haplotípusainak számítása

Az 5' szabályozó régióban választott két polimorfizmus körülbelül 1,5 kb távolságban helyezkedett el egymástól, ezért a közös direkt molekuláris elemzésekre a 3' szabályozó régiónál leírt közvetlen haplotípus meghatározáshoz hasonlóan nem volt lehetőség. Emiatt az egyes haplotípusokat a genotípus adatokból számítottuk ki. A D' és R^2 kapcsoltsági értékeket, a HaploView 4.2 program alkalmazásával határoztuk meg. A konkrét haplotípusok meghatározása csak a dupla heterozigóták esetében (rs6077690 AT és rs6039769 AC) nem volt egyértelmű, mert a haplotípusok elvben A–A / T–C vagy A–C / T–A is lehetett. A kapcsoltsági számítás azonban azt mutatta, hogy a T–A haplotípus gyakorisága mindössze 0,6% volt. A vizsgált populációnkban összesen 103 dupla heterozigótát azonosítottunk, így matematikailag körülbelül 1 személy hordozta a ritka T–A haplotípust (vagyis A–C / T–A), így ezt elhanyagolhatónak tartottuk. Ezt az egyszerűsítést alkalmazva a dupla heterozigótákat is meg tudtuk határozni a genotípus adatainkból, mivel ezeket A–A / T–C haplotípusnak tekintettük. Annak érdekében, hogy eljárásunkat verifikáljuk, a Phase 2.1-es alkalmazással is meghatároztuk a haplotípusokat, amely számítással ugyanazt az eredményt kaptuk.

3.2.8 Az impulzivitás és a *SNAP-25* gén polimorfizmusai közötti összefüggés számítása

A vizsgálatban résztvevő személyek Barratt-összpontszám értékeit a *SNAP-25* gén 4 polimorfizmusának genotípusaival és haplotípusaival vetettük össze. A statisztikai számításoknál az ANOVA (varianciaanalízis) statisztikai módszert alkalmaztuk, és azt elemeztük, hogy az egyes genotípus- illetve haplotípus-csoportba tartozó személyek impulzivitás összpontszám értékeinek átlaga szignifikánsan eltért-e egymástól. Mivel több polimorfizmust elemeztünk egyidejűleg, ezért az ál-pozitív eredmények elkerülése érdekében a többszörös tesztelésre Bonferroni-korrekciót végeztünk. Ezen korrekciós módszer alapján 4 polimorfizmus elemzése esetén a p értéknek $0,05 / 4 = 0,0125$ alatt kell lennie, csak ekkor fogadtuk el számításaink eredményét szignifikáns eredménynek.

3.3 Az *in vitro* funkcionális vizsgálatokhoz használt módszerek

3.3.1 Plazmidkonstrukciók készítése

A *SNAP-25* gén teljes 3' szabályozó régióját a pMIR-REPORT Luciferase miRNA reporter vektorba (Life Technologies) a szentjánosbogár luciferáz génje mögé klónoztuk, az alkalmazott primerek szekvenciái az 5. táblázatban láthatóak. A vektor mérete 6470 bp, a luciferáz enzimet kódoló gén előtt egy emlős promotert, mögött pedig egy terminációs szignált tartalmaz, emellett a vektor része egy ampicillin-rezisztencia gén is. A vektor optimális mikro-RNS-ek célszekvenciáinak klónozására és a mikro-RNS-ek regulációs tulajdonságainak elemzésére, mivel a multiklónozó hely a luciferáz gén mögött helyezkedik el. A szenz és antiszenz primerek szekvenciáiban vastag, dőlt betűkkel a *Mlu* I és a *Hind* III restriktív endonukleázok felismerési szekvenciáit jelöltük (5. táblázat).

Az első elkészült plazmidkonstrukciónk szekvenálása alapján megállapítottuk, hogy az általunk kiindulásként felhasznált genomi DNS a T–T haplotípust hordozta. A másik 3 elméletileg lehetséges haplotípust irányított mutagenézissel hoztuk létre, a QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent Technologies) alkalmazásával. Az elkészült négy plazmidkonstrukciót direkt szekvenálással ellenőriztük. Belső kontrollként egy olyan plazmidot alkalmaztunk, amely a *SNAP-25* gén 3' szabályozó régiójával egyenlő hosszúságú inzertet tartalmazott, azonban teljesen hiányzott belőle a miR-641 felismerési szekvenciája.

5. táblázat: A SNAP-25 3' nem transzlálódó régiójának pMIR vektorba klónozásához tervezett primerek jellemzői. S: szenz primer AS: antiszenz primer.

A szekvenciákban ferde betűkkel jelölve az eredeti szekvenciához képest általunk bevitt restriktív enzimek felismerőhelyei (*Hind* III: 5' A[^]AGCTT 3' *Mlu* I: 5' A[^]CGCGT 3').

Primerek	Szekvencia (5'–3')
snap3'utr_S	TGT AAT ACG CGT CTG GGA AGT GGT TAA GTG T
snap3'utr_AS	CCC GAC AAG CTT AAA CTA GCT ACA AAA TGT CAA TCA

3.3.2 Alkalmazott sejtkultúra, a transzfekció körülményei

A kereskedelmi forgalomban kapható HEK293T (humán embrionális vese) típusú sejtvonalat alkalmaztunk kísérleteink kivitelezéséhez. A sejteket DMEM médiumban növesztettük, amit 10%-os FBS-sel (fetal bovine serum) és 1%-os penicillin-streptomycin antibiotikummal egészítettünk ki. A sejtkultúránkat 37 °C-on, 5% CO₂-ot tartalmazó párás atmoszférát biztosító inkubátorban tároltuk. Első lépésként meghatároztuk azt az optimális konstrukció mennyiséget a transzfekció során, mely elég magas ahhoz, hogy megbízhatóan detektálható jelet kapjunk, ugyanakkor nem terheli túl a sejteket. Ezen beállítás alapján kísérleteinkhez a továbbiakban 0,05 µg pMIR riporter konstrukciókat transzfektáltuk, valamint 5 pmol miR-641-et és 0,2 µg β-galaktozidázt kotranszfektáltunk. A reakcióelegy 2,5 µl Lipofectamint és 60 µl OptiMemet tartalmazott. Minden kísérlet során 3 párhuzamos mérést végeztük. A transzfekció után a sejteket 24 órán át inkubáltuk 37 °C-on.

3.3.3 A sejtek begyűjtése és feltárása

Az inkubáció után a sejteket begyűjtöttük, és a luciferáz szintek, a β-galaktozidáz aktivitás, valamint az mRNS- és mikro-RNS-méréshez a sejteket feltártuk.

A sejteket a 24 órás inkubáció után 1× PBS oldattal mostuk, majd 500 µl 1× PBS oldatban felfuszpendáltuk, és Eppendorf csövekbe gyűjtöttük. Ezután 13000 g-vel 15 percen át 4 °C-on centrifugáltuk a mintáinkat, majd a felülúszót eltávolítottuk, és a csapadékot a luciferáz és a β-galaktozidáz méréshez 100 µl 250 mmol-os Tris-HCl oldatban szuszpendáltuk fel. Az mRNS és mikro-RNS mennyiségi méréséhez a csapadékot 100 µl trizolban oldottuk fel. A begyűjtött sejteinket a további feldolgozásig –80°C-on tároltuk.

A sejtek feltárása fagyasztásos–olvasztásos technikával 37 °C-os vízfürdő illetve folyékony N₂ segítségével történt. A mintákat ezt követően 13000 g-vel 15 percen át 4 °C-on centrifugáltuk, majd a felülúszót új Eppendorf-csővekbe mértük.

3.3.4 Luciferáz és β -galaktozidáz mérés

A luciferáz aktivitás méréséhez a 12 μ l mintához 60 μ l luciferin reagenst adtunk. A lumineszcencia értékeket a Varioscan Flash műszerrel mértük. Ugyanezzel a berendezéssel a műszert fotométerként használva határoztuk meg a β -galaktozidáz aktivitás értékeit is. Ennek során 10 μ l mintához 33 μ l 40 mg/ml ONPG oldatot, 1,5 μ l 100 \times Mg²⁺-puffert és 105,5 μ l foszfát puffert adtunk.

A nyers luciferáz enzim aktivitási adatokat minden minta esetében a β -galaktozidáz értékekkel normalizáltuk.

3.3.5 mRNS mérés

A feltárt és trizolban szuszpendált sejtkivonatból cDNA Archive Kit (Life Technologies) alkalmazásával cDNS-t írtunk a teljes RNS-ből. Ezután valós idejű PCR alkalmazásával meghatároztuk a HEK293 sejtek endogén SNAP-25 termelését. A méréshez az alkalmazott általunk tervezett primerek szekvenciáit az 6. táblázat tartalmazza, a detektálás SYBR Green festékkel történt. Endogén kontrollként a GAPDH mennyiségét mértük, melyhez a Life Technologies TaqMan alapú kitjét alkalmaztunk. A SNAP-25 relatív mennyiségét a C_T értékek alapján a $2^{-\Delta C_T}$ módszerrel határoztuk.

6. táblázat: A SNAP-25 expresszió mérése HEK sejtekből. snap-25_x1: szenz primer snap-25_x2: antiszenz primer.

Primerek	Szekvencia (5'–3')
snap-25_x1	AGA TGC TGG TAT CAG GAC TTT GGT TAT
snap-25_x2	TCT CAG CCT CCT TCA TGT CTT GG

3.3.6 mikro-RNS mérés

A mikro-RNS szint mérése egy a rövid RNS-ek mérésére kifejlesztett kittel történt (miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis Kit és High Specificity miRNA QPCR kit, Stratagene). Ezen kit első lépésben egy poli-A szakaszt szintetizál a mikro-RNS-ekre, így ez a szakasz szolgál a primer templátjaként az azt követő cDNS írásakor. A primer tartalmaz továbbá egy speciális adapter szekvenciát az 5' végén, ezáltal lehetővé téve a

cDNS meghosszabbítását, annak érdekében, hogy az ezt követő valós idejű PCR során már mérhető hosszúságú cDNS-t kapunk. A valós idejű PCR méréshez az egyik primer az adapterszekvenciával komplementer univerzális primer, míg a másik primer egy saját tervezésű, a mérni kívánt mikro-RNS-re specifikus primer (miR-641 esetén 5' AAA GAC ATA GGA TAG AGT CAC CTC 3'). A mikro-RNS mennyiségi méréséhez belső kontrollként a miR-196b-t alkalmaztunk, majd a relatív miR-641 mennyiséget $2^{-\Delta C_T}$ módszerrel határoztuk meg.

4 Eredmények

4.1 A SNAP-25 izoformáinak vizsgálata

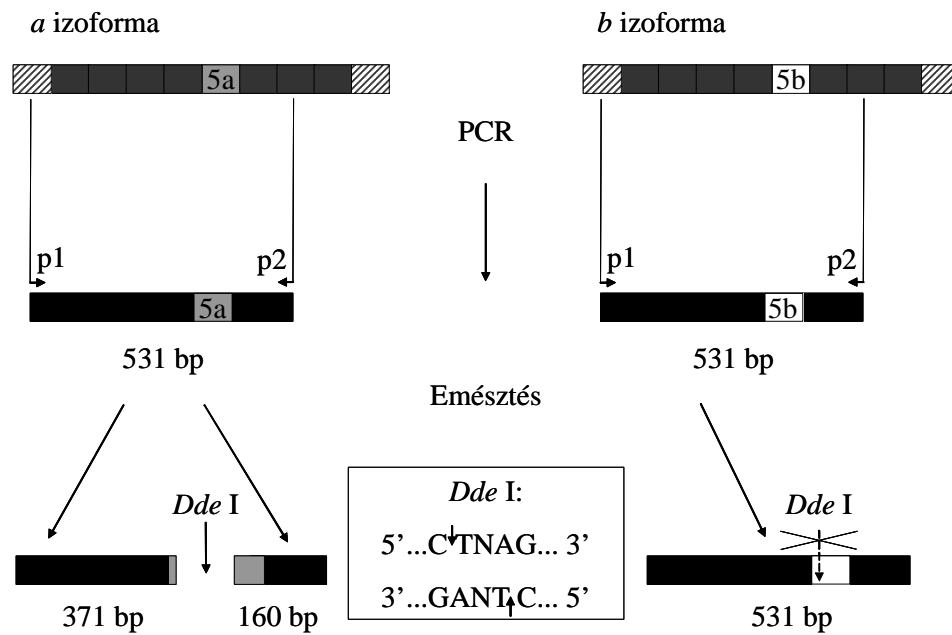
A szakirodalmi adatok alapján (lásd 1. fejezet) a SNAP-25 két eltérő izoformával rendelkezik, melyek mRNS-ében az ötödik exon eltérő, ezáltal a keletkező fehérjék egymástól összesen kilenc aminosavban különböznek. Munkánk első részében két, egymástól független módszert dolgoztunk ki a SNAP-25 ezen két mRNS izoformájának elkülönítésére és mennyiségi mérésére. Belső kontrollként a két izoformának megfelelő expressziós vektort használtunk fel. A kidolgozott módszerek validálását követően tízféle humán szövetben mértük meg az egyes izoformák előfordulási arányát.

4.1.1 A SNAP-25 *a* illetve *b* izoformáját kódoló expressziós konstrukciók készítése

Kísérleteink első lépéseként expressziós vektorokat állítottunk elő. A SNAP-25 *a* és *b* izoformájának cDNS-ét pcDNA3.1(-) plazmidokba klónoztuk, amelyhez az inzerteket PCR-technika alkalmazásával a humán prefrontális agykéreg cDNS-éből a célrégió felamplifikálásával nyertünk. Elkészült plazmidjaink bázissorrendjét direkt szekvenálással ellenőriztük.

4.1.2 PCR-RFLP módszer beállítása a SNAP-25 izoformák szemikvantitatív méréséhez

Az első módszer során a célszekvenciát PCR alkalmazásával sokszorosítottuk fel, ezután *Dde* I enzimmel szelektíven emésztettük, végül elektroforetikusan választottuk el a keletkező termékeket. A 6. ábra felső részében a bal oldalon az *a*, a jobb oldalon a *b* izoforma mRNS-e látható. Az mRNS-ek két szélén ferde csíkokkal jelölve a 3' és az 5' nem transzlálódó régió található. Sötét téglalapok szimbolizálják a kódoló régiót, benne az *a* izoforma esetén szürke háttéren fekete betűkkel, míg a *b* izoforma esetén fehér háttéren fekete betűkkel a két izoforma egyetlen eltérő szakasza, az 5. exon látható. A PCR-hez használt két primert p1 és p2 névvel jelöltük.



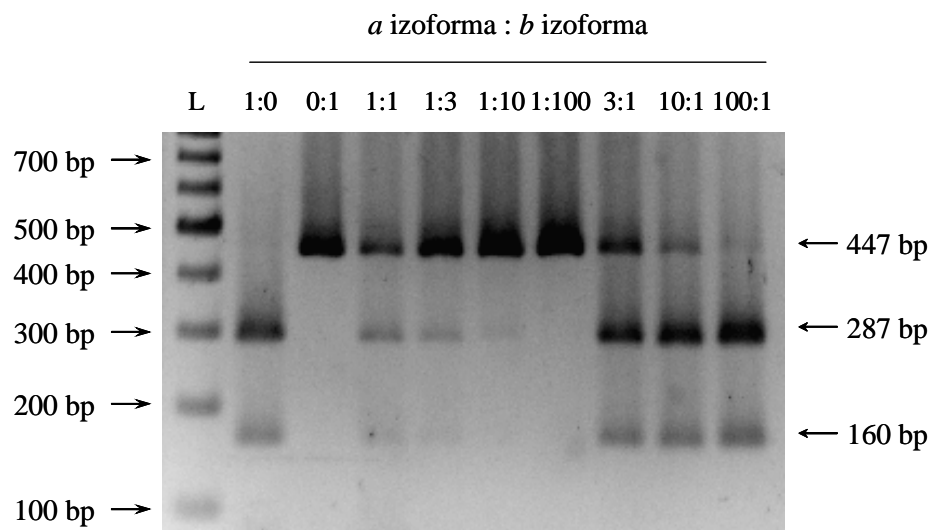
6. ábra: PCR-RFLP módszer a SNAP-25 izoformák azonosítására. Mindkét izoforma esetében ugyanazzal a primerpárral (p1 és p2) történt az 5. exon régiójának amplifikációja, a kapott 531 bp hosszúságú termékünket *Dde I* enzimmel hasítottuk. Az *a* izoforma esetén a hasítás követően egy 371 és egy 160 bp hosszúságú fragmentumot kaptunk, míg a *b* izoforma esetén nem történt hasítás.

A polimeráz láncreakció optimális ciklusszámát aszerint választottuk meg, hogy a keletkező termékek mennyisége megbízhatóan detektálható legyen, azonban az még a PCR reakció exponenciálisan növekvő fázisában legyen. A ciklusszám pontos beállítása azért is volt fontos lépése a kísérletnek, mert a 4.1.4-es fejezetben részletesen bemutatott, különböző idegrendszeri eredetű és a központi idegrendszeren kívüli szövetekből származó mintákban a SNAP-25 izoformák mennyisége több nagyságrenddel is eltér egymástól. Mindezen szempontokat figyelembe véve a 31 ciklusból álló PCR bizonyult optimálisnak.

A PCR-t követően – melynek során mindkét izoforma esetén egységesen 531 bp hosszúságú termék keletkezett – a *Dde I* enzim csak az *a* izoforma jelenléte esetén hasította a PCR-termékeket, mivel az enzim felismerőhelye (5' C[^]TNAG 3') specifikusan csak az *a* izoforma szekvenciájában található meg. A hasítás révén az *a* izoforma esetén 371 és 160 bp méretű termékek jöttek létre, míg a *b* izoforma jelenlétekor a felismerőhely hiányában az eredeti 531 bp hosszúságú termékeket kaptuk. Az emésztést követően a

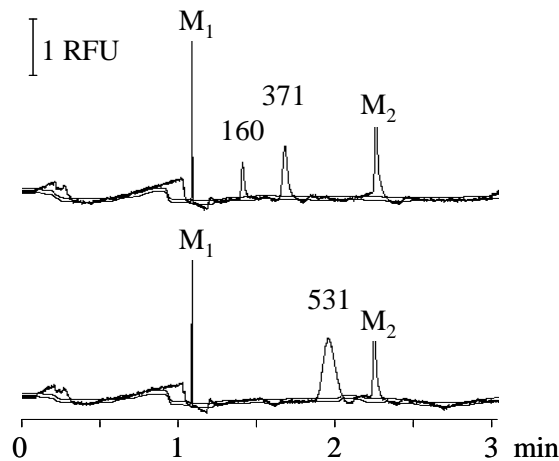
DNS-fragmentumokat hagyományos gélelektroforézissel valamint kapilláris elektroforézissel választottuk el.

Módszerünket az általunk készített és szekvenálással ellenőrzött expressziós konstrukciókkal validáltuk. A DNS-konstrukcióról a PCR során a p1 primer helyett – az optimális reakciókörülmények érdekében – az 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3' sense primert használtuk. A keletkező termék hossza ekkor 447 bp volt, amiből az emésztés során az *a* izoforma esetén egy 160 bp és egy 287 bp hosszú termék keletkezett, míg a *b* izoforma esetében nem történt emésztés, így ekkor az eredeti 447 bp hosszú terméket detektáltuk. Amennyiben csak az *a* vagy csak a *b* izoformát kódoló plazmidot tartalmazta a reakcióelegy templátként, a PCR-RFLP során egyáltalán nem keletkezett aspecifikus, tehát a másik izoformára utaló termék, ahogy ez a 7. ábra első két mintáján látható. Következő lépésben a két expressziós vektort különböző arányban adtuk templátként a reakcióelegyhez. A 7. ábra 3–10. mintái a 100:1–1:100 tartományban készített különböző keverékek vizsgálatának eredményét mutatja a PCR-RFLP alapú módszerünk során.



7. ábra: A SNAP-25 izoformák arányának mérésére kidolgozott PCR-RFLP módszer validálása. A SNAP-25 *a* és *b* izoformáját kódoló pcDNA3.1(-) konstrukciókat az ábra tetején megadott arányokban kevertük, majd elvégeztük a kidolgozott PCR-RFLP technikát. A kép az amplifikáció és a restrikciós hasítás után képződött fragmentumokat mutatja.

A hagyományos gélelektroforézis után a két izoforma arányát denzitometriával határoztuk meg. Később a két izoforma arányának pontosabb mérésére kapilláris gélelektroforézissel választottuk el a fragmentumokat, mely alkalmazás már kellően érzékeny, pontos és automatizálható fragmentanalízist tett lehetővé, emellett további előnye, hogy nagy hatékonyságú mintaelemzés végezhető vele. A 8. ábrán két reprezentatív kapilláris elektroforetikus mérés eredménye látható.



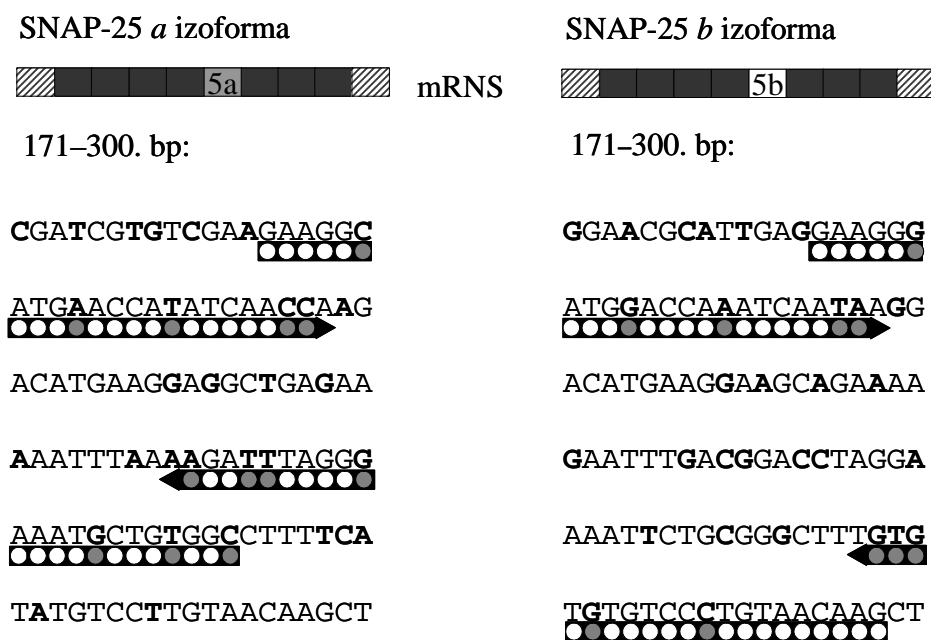
8. ábra: SNAP-25 izoformák azonosítása miniatürizált kapilláris elektroforézissel. A felső ábrán az *a* izoformára karakterisztikus kép látható (160 és 371 bp méretű termékek), míg az alsó ábrán csak egy fragmentum detektálható (531 bp), ami a *b* izoforma jelenlétekor volt látható. M1 és M2: 20 és 5000 bp hosszúságú létra.

Az általunk tervezett PCR alapú, *Dde* I emésztéses módszer specificitását a nagy érzékenységű kapilláris elektroforézis is alátámasztotta: az *a* izoforma esetén az összes termék megemésztődött; míg a *b* izoforma kizárólagos jelenléte esetén emésztett termékeket egyáltalán nem lehetett detektálni. Minden egyes mintához egy 20 és egy 5000 bp méretű DNS-fragmentumot ko-injektáltunk belső kontrollként, ezek segítségével az elválasztásokat megfelelően egymáshoz lehetett illeszteni, és a keletkezett termékek mérete megbízhatóan meghatározható volt. Maga az elválasztás kevesebb, mint három percet vett igénybe, és nem igényelt semmilyen további lépést (mint például a hagyományos gélelektroforézist követő denzitometria), mivel az egyes fragmentumok mennyisé-

gét a csúcsok alatti terület alapján a Q-Expert program segítségével automatikusan megtudtuk határozni.

4.1.3 A SNAP-25 izoformák mérése valós idejű PCR módszerrel

A SNAP-25 két izoformájának méréséhez egy valós idejű PCR alapú módszert is beállítottunk. A méréshez a 9. ábrán sematikusán ábrázolt, a két izoformára specifikus primereket terveztünk, minden egyes PCR ciklust valós idejű detektálás követte, melyhez interkalálódó SYBR Green fluoreszcens festéket használtunk.

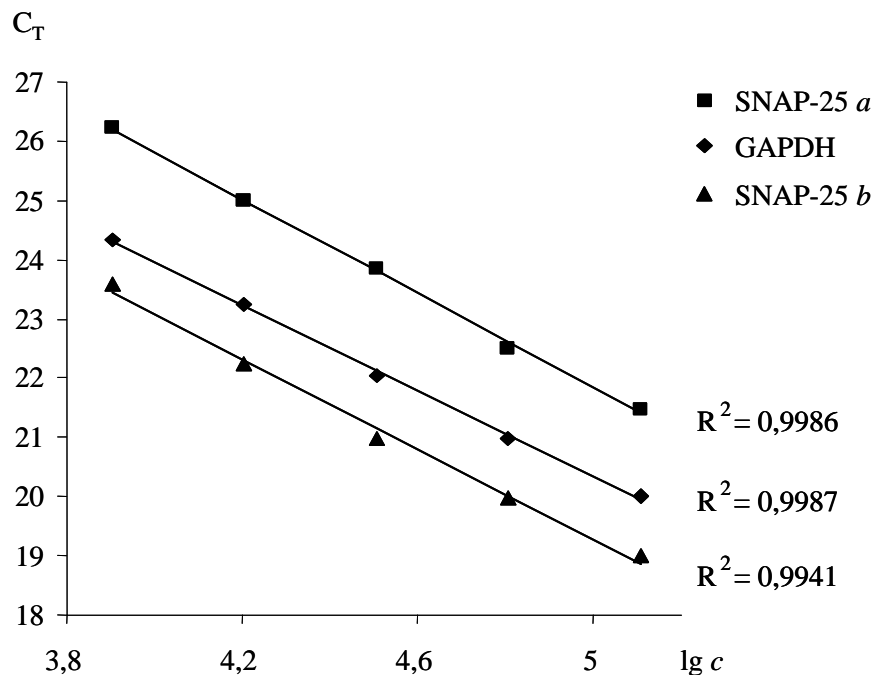


9. ábra: A SNAP-25 izoformáinak detektálása valós idejű PCR-rel. A fekete vastag nyilak az izoformákra specifikus primerek, a szürke pöttyök és a vastag betűk jelölik a szekvensspecifikus nukleotidokat

A 9. ábra felső része – ebben az esetben is – a két izoforma mRNS-ének illetve cDNS-ének vázlatos felépítését mutatja, bal oldalon az *a*, jobb oldalon a *b* variáns látható. Az mRNS-ek két végén ferde csíkokkal jelöltük a 3' és az 5' nem transzlálódó régiót. A sötét szakaszok jelölik a kódoló tartományokat, benne az *a* izoforma esetében szürke háttéren fekete betűvel, míg a *b* izoforma esetében fehér háttéren fekete betűvel a két izoformát egymástól megkülönböztető 5. exon figyelhető meg. A 9. ábra alsó részén a két izoforma mRNS-ének 171–300. nukleotidjai láthatóak, vastag betűkkel jelöltük a

két izoformára specifikus nukleotidokat. Fekete háttéren eltérő színű pöttyökkel (szürke pötty – szekvenciaspecifikus; fehér pötty – megegyezik a két izoforma szekvenciájában) jelöltük a két izoformára specifikus primereket.

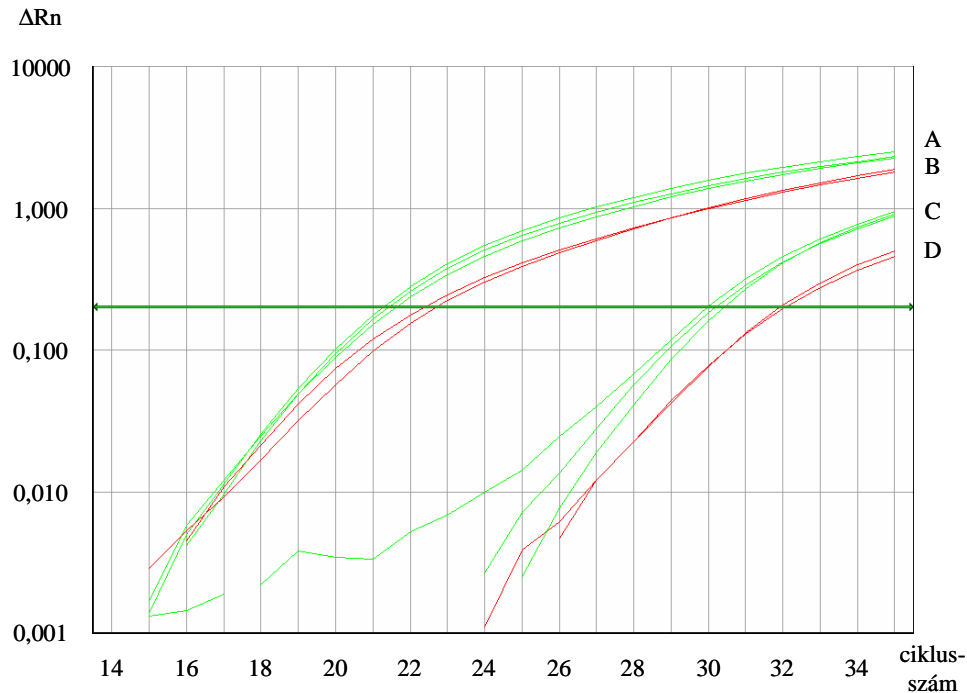
Első lépésként ellenőriztük az általunk tervezett primerpárok megbízhatóságát, kontrollként a TaqMan GAPDH kitjét használtuk. A méréskor minden célgén esetében az egyes C_T értékeket vetettük össze a különböző kiindulási DNS koncentrációkkal. Öttagú felező hígítási sort készítettünk, majd a kapott C_T értékeket a koncentráció tízes alapú logaritmusának a függvényében ábrázoltuk, ezt mutatja a 10. ábra. Az egyes adatpontokra illesztett egyenesek gyakorlatilag párhuzamosnak mondhatók, a meredekségek értékei megfelelő egyezést mutattak, a mérések pontosságát az R^2 értékek is jelezték, melyek minden esetben meghaladták a 0,99-et.



10. ábra: A valós idejű PCR során keletkező termékek küszöbértékének eléréséhez szükséges ciklusszám (C_T) és a kiindulási cDNS-koncentráció (c) összefüggése. A SNAP-25 *a* és *b* izoformák és a GAPDH kontroll C_T értékei a kiindulási cDNS-koncentráció tízes alapú logaritmusának függvényében.

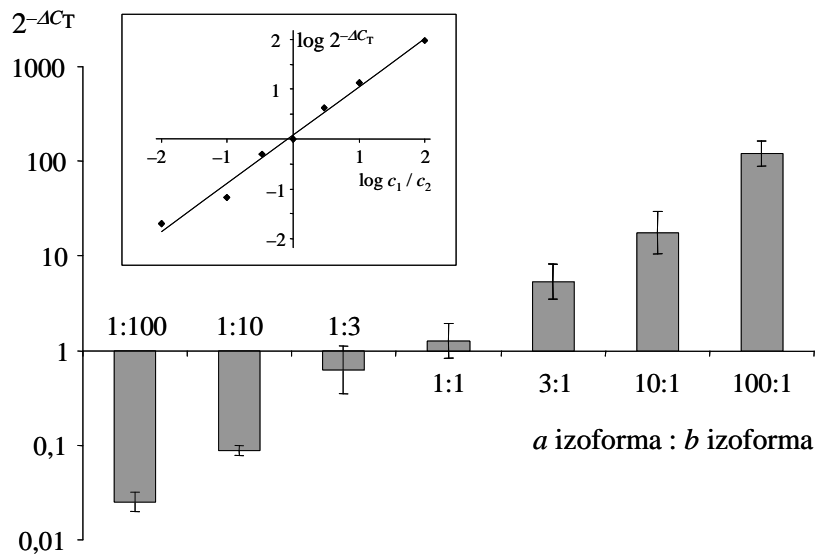
A mérések megbízhatóságát a következő lépésben az általunk készített SNAP-25 *a* illetve *b* izoformák cDNS-ét tartalmazó pcDNA3.1(-) expressziós vektorok alkalmazásával ellenőriztük. Amennyiben csak az *a* vagy csak a *b* izoformát kódoló vektort tartal-

mazta a reakcióelegy templátként, a másik variánsra specifikus primerpár csak elhanyagolható mértékben, 9 ciklussal később képzett detektálható terméket. Ezt mutatja a 11. ábra, ahol a vízszintes zöld nyíl a küszöbértéket jelzi, amit a PCR reakció exponenciális szakaszán belül határoztunk meg.



11. ábra: Valós idejű PCR képe a primerpárok specificitásáról: A zöld görbék az *a* izoformára specifikus detektálást mutatják, míg a pirosak a *b* izoformáét. A minta: *a* izoformára specifikus primerek + *a* izoformát hordozó pcDNA3.1(-) konstrukció. B minta: *b* izoformára specifikus primerek + *b* izoformát hordozó pcDNA3.1(-) konstrukció. C minta: *a* izoformára specifikus primerek + *b* izoformát hordozó pcDNA3.1(-) konstrukció. D minta: *b* izoformára specifikus primerek + *a* izoformát hordozó pcDNA3.1(-) konstrukció.

Következő lépésben a két expressziós vektor különböző arányú keverékeit adtuk templátként a reakcióelegyhez. A valós idejű PCR mérés esetében a lineáris regressziós analízis a várt és a mért mennyiségek szoros korrelációját mutatta ($R^2 = 0,987$, egyenlet: $y = 0,9649x + 0,0792$), mely alapján megállapítható, hogy akár négy nagyságrendbeli mennyiségi különbségek is pontosan mérhetőek ezzel a módszerrel, ezt mutatja be a 12. ábra.



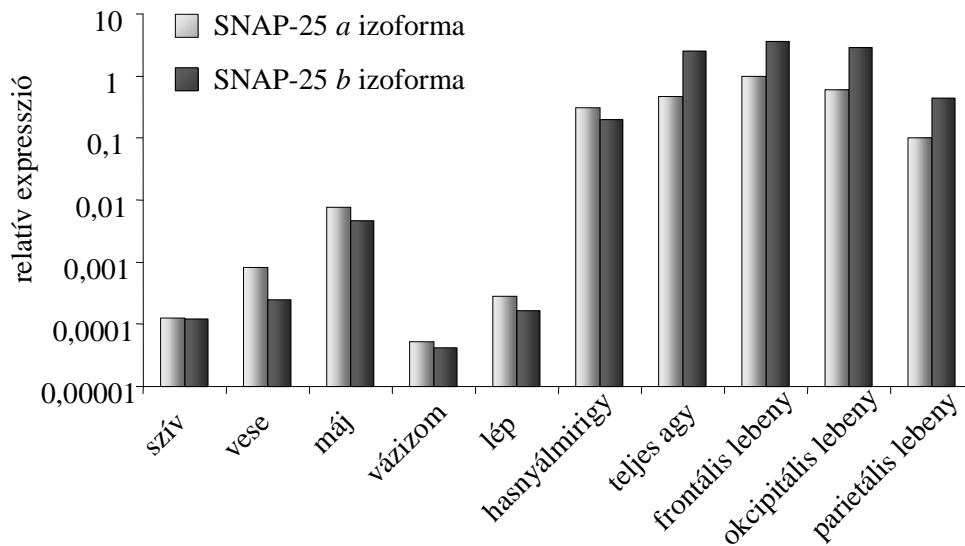
12. ábra: A valós idejű PCR mennyiségi mérésének ellenőrzése: A SNAP-25 *a* és *b* izoformáját kódoló pcDNA3.1(-) konstrukciókat a vízszintes tengelyen megadott arányban kevertük, majd elvégeztük a kidolgozott valós idejű PCR módszert.

A két izoforma mennyiségét relatív kvantifikálással (ΔC_T -módszer) állapítottuk meg, belső kontrollként a háztartási génként számon tartott GAPDH mennyiségét mértük, Amennyiben csak a két variáns egymáshoz viszonyított arányát kívántuk meghatározni, nem volt szükséges a háztartási gén expressziós szintjének mérése se. Ez a megközelítés a különböző szövetek összehasonlítására nem alkalmas, ezzel a számítással ($2^{-\Delta C_T}$) azonban a két izoforma egymáshoz viszonyított relatív mennyiségét kaphatjuk meg.

4.1.4 A SNAP-25 izoformák előfordulási aránya különböző humán szövetekben

A két mérési módszer optimalizálását követően tíz különböző humán szövetben mértük meg a SNAP-25 *a* és *b* izoformáinak mennyiségét és egymáshoz viszonyított arányait. Négy minta származott a központi idegrendszer különböző területeiről, hat további minta pedig egyéb, az idegrendszeren kívüli szövet teljes RNS-ét tartalmazta. A mintákról a *Módszerek* fejezetben leírt protokoll szerint cDNS-t írtunk, majd a mintákat mind a PCR-RFLP, mind a valós idejű PCR módszerrel megmértük. A valós idejű PCR-rel meghatározott értékek és a PCR-RFLP utáni denzitometria szemikvantitatív eredményei megfelelő egyezést mutattak.

Minden neurális eredetű szövet esetében a *b* izoforma mennyisége meghaladta az *a* variáns szintjét. A legmagasabb értékeket mind a *b*, mind az *a* forma esetében a frontális lebenyben mértük. Érdekes módon az idegrendszeren kívüli szövetek esetében minden esetben a két izoforma közötti arány ellentétes volt. Ezekben a szövetekben a mért mennyiségek átlagosan két nagyságrenddel alacsonyabbak voltak az idegrendszer szöveteihez képest. A legnagyobb mennyiségben a nem neurális szövetek közül a hasnyálmirigy tartalmazta a SNAP-25 mindkét izoformáját, közel azonos mennyiségben a különböző agykérgi területekhez képest, azonban érdekes módon az *a* izoforma dominanciájával. A legkisebb mennyiségeket a vázizomban mértük (13. ábra).

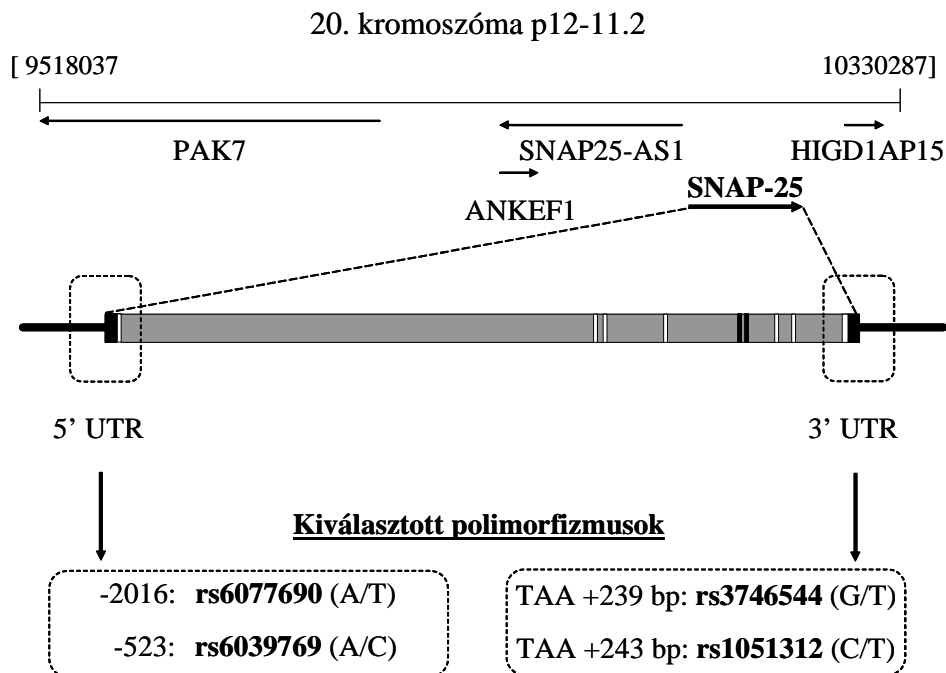


13. ábra: Humán szövetek SNAP-25 *a* és *b* izoformáinak expressziója.

4.2 A SNAP-25 gén szabályozó variánsainak összefüggése az impulzivitással

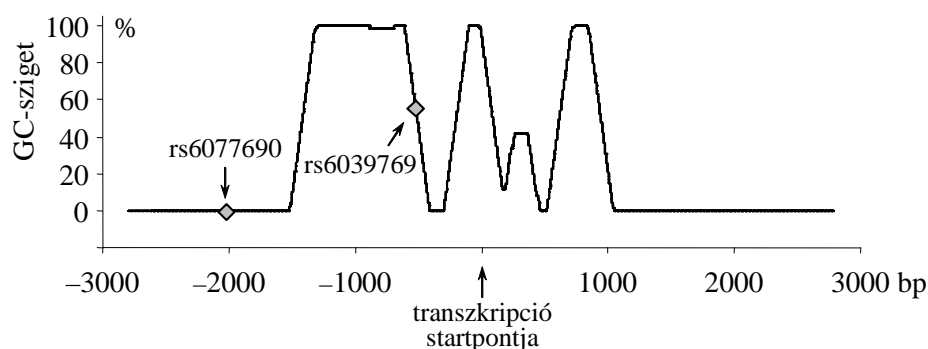
4.2.1 A SNAP-25 gén 3' és 5' szabályozó régió polimorfizmusai

Első lépésben *in silico* vizsgáltuk az asszociációanalízishez kiválasztott négy, a SNAP-25 gén szabályozó régióiban található polimorfizmus (14. ábra) várható funkcionális hatásait.



14. ábra: A kiválasztott polimorfizmusok elhelyezkedése a SNAP-25 génen.

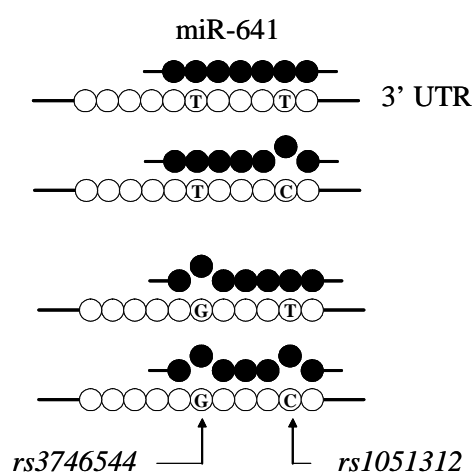
A két, az 5' szabályozó régióban elhelyezkedő SNP közül az rs6039769 egy CpG-sziget úgynevezett CpG-partján található, a transzkripció startponttól 523 bázispárra 5' irányban. Az rs6077690 SNP 2015 bázispárra van ugyanezen irányban (15. ábra) és a TransFac webes alkalmazás alapján mindkettő befolyással lehet egyes transzkripció faktorok bekötődésének hatékonyságára.



15. ábra: CpG-szigetek a SNAP-25 gén 5' régiójában és a gén előtti szakaszon.

Az ábra azt mutatja be, hogy az egyes régiók milyen mértékben felelnek meg a GC-sziget kritériumának (G-C-tartalom magasabb 50%-nál, várható / tényleges CpG arány magasabb 60%-nál).

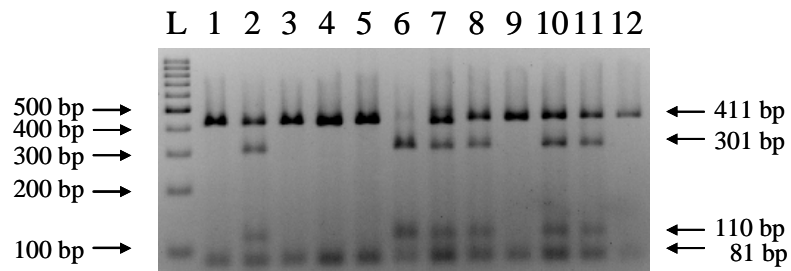
A 3' szabályozó régióban található két kiválasztott genetikai variáns, az rs3746544 és az rs1051312, számos korábbi pszichiátriai témájú asszociációvizsgálat tárgya volt [76-79]. *In silico* szekvenciaanalízisünk alapján mindketten befolyásolhatják a miR-641 mikro-RNS bekötődését az mRNS-hez, mivel azok a mikro-RNS által az mRNS-en felismert *seed* szekvenciát változtatják meg (16. ábra). Ez a két polimorfizmus mindössze négy bázispárra helyezkedik el egymástól, így a laboratóriumunkban korábban kidolgozott valós idejű PCR alapú módszer [80] lehetővé tette ezen két polimorfizmus genotípus elemzése mellett a haplotípus közvetlen meghatározását is.



16. ábra: A miR-641 kötődése a SNAP-25 mRNS 3' régiójához. Fekete körök jelzik a miR-641, míg a fehér körök a SNAP-25 mRNS-ének nukleotidjait. A polimorfizmusok hatására a teljes komplementaritás 1, illetve 2 bázis tekintetében megszűnik, ezt az egymástól távolabb elhelyezkedő kör-párok szimbolizálják.

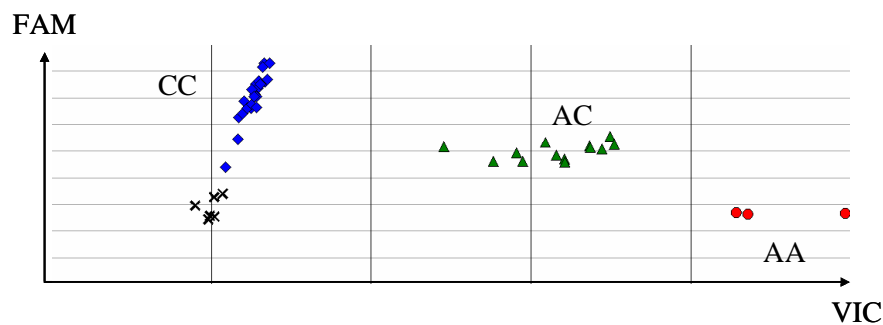
4.2.2 A SNAP-25 gén kiválasztott polimorfizmusainak genotipizálása és haplotipizálása

Az rs6077690 A/T polimorfizmus genotipizálása PCR-RFLP technikával történt. A PCR során egy 492 bp hosszúságú terméket kaptunk, amely a restriktív emésztés után az A allél esetén két termékre, egy 411 és egy 81 bp hosszúságú fragmentumra hasítódott, míg a T allél esetén egy további hasítóhely keletkezett a PCR-termék szekvenciájában, így a 81 bp hosszúságú DNS mellett egy 301 és egy 110 bp hosszúságú terméket kaptunk. A fragmentumok méret szerinti elválasztása hagyományos gélelektroforézissel történt, egy ilyen tipikus emésztési képet mutat be a 17. ábra.



17. ábra: Az rs6077690 PCR-RFLP gélképe: A létra („L”) mellett 12 minta genotípus-mintázata látható. A keletkező termékek A allél esetén 411 és 81 bp, míg T allél esetén 301, 110 és 81 bp. Ennek megfelelően az 1., 3., 4., 5. 9. és 12. minta AA, a 2., 7., 8., 10. és 11. AT, míg a 6. TT genotípusú.

Az rs6039769 A/C polimorfizmust valós idejű PCR technikával vizsgáltuk, amelyhez a primereket és a szekvencia specifikus próbákat a Life Technologies cégtől vásároltuk. A 18. ábrán egy végpontdetektálási mérés eredménye látható. A függőleges tengelyen a FAM festék intenzitása, míg a vízszintes tengelyen a VIC fluoreszcens szignál látható. Azon minták, amelyek magas FAM és alacsony VIC intenzitással voltak jellemezhetőek, CC genotípusúak voltak, ha ez az intenzitásarány épp fordított volt, az AA genotípust jelentett. Míg ha mind a FAM, mind a VIC érték magas volt, akkor a vizsgált minta heterozigóta genotípusú volt.



18. ábra: Az rs6039769 polimorfizmus valós idejű PCR-rel történő genotipizálása. A függőleges tengelyen a FAM, a vízszintesen a VIC fluoreszcens festék intenzitási értékeit ábrázoltuk.

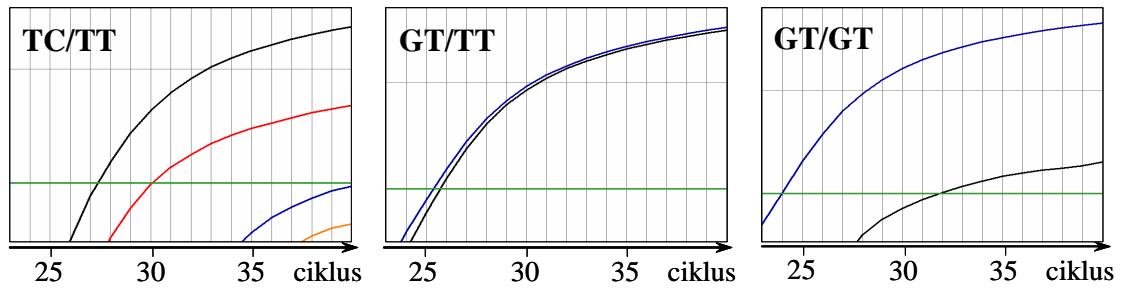
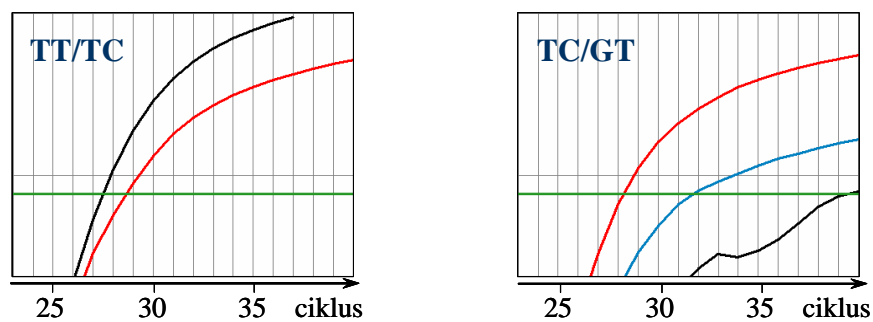
A 3' szabályozó régió két polimorfizmusát (rs3746544 és rs1051312) együtt elemeztük ugyancsak valós idejű PCR technika alkalmazásával, a laboratóriumunkban korábban

beállított ún. „két” illetve „egy csöves” módszerekkel [80]. A kapott haplotípusokból utólagosan állapítottuk meg a két polimorfizmus genotípusait.

A „két csöves” módszer lényege, hogy egy minta haplotipizálása egyszerre két reakcióban folyik párhuzamosan: az első reakcióelegyben a FAM festékkel jelölt próba a T–T haplotípusra specifikus, míg a VIC festékkel jelölt próba a T–C haplotípus jelenléte esetén ad jelet. Hasonlóképpen a második reakcióelegy tartalmazta a G–T haplotípusra specifikus FAM-mal jelölt valamint a G–C haplotípusra specifikus, VIC-kel jelölt próbát.

Az egy csöves módszer alapjául az a felismerés szolgált [80], hogy az általunk vizsgált populációban a G–C haplotípus teljesen hiányzik. Ennek következményeként a továbbiakban a G–C haplotípusra specifikus próbát elhagytuk és a maradék három haplotípus jelenlétét egyetlen reakcióelegyben, 3 különböző fluoreszcens festékkel megjelölt próba alkalmazásával vizsgáltuk. Ennek során a T–T haplotípusra specifikus próba továbbra is FAM jelölést kapott, a T–C haplotípust VIC-kel, míg a G–T haplotípust NED festékkel jelölt próbával detektáltuk.

A 19. ábrán az ezzel a két módszerrel kapott tipikus haplotípus-eredmények képei láthatóak. Mivel ebben az esetben 3 vagy négy jel intenzitásának együttes kiértékelése adja meg a haplotípust, a hagyományos végpont detektálási kép (18. ábra) nem készíthető el. A próbák működését ehelyett a valós idejű detektálás során nyert amplifikációs görbék alapján ítéltük meg. Mivel a próbák szekvenciája – a haplotípusoknak megfelelően – esetenként csak egyetlen nukleotidban tér el egymástól, így a próbák minimális aspecifikus kötődése nem zárható ki. Mégis a kapott görbék lefutása illetve a jel intenzitása alapján a haplotípusok egyértelműen megállapíthatók voltak. A 19. ábra A részén például a második reakcióelegy esetén magas GT- ill. TT-specifikus jel figyelhető meg, ha ezzel összevetjük a harmadik reakcióelegynél látott képet, nem kétséges, hogy az ott látható bő 8 ciklussal későbbi TT-jel (fekete görbe) nem értékelendő valós szignálként.

A**B**

19. ábra: Az rs3746544 és rs1051312 polimorfizmusok haplotípusainak valós-idejű PCR-rel történő detektálása. A vízszintes tengelyen a ciklusszámokat, míg a függőleges tengelyen az intenzitásértékeket ábrázoltuk. A. Két csöves módszer. Fekete: T–T, kék: G–T, piros: T–C, narancssárga: G–C. B. Egy csöves módszer. Fekete: T–T, kék: G–T, piros: T–C

4.2.3 A SNAP-25 3' és 5' szabályozó SNP-k genotípus és haplotípus gyakorisága

901 fő vizsgálata alapján határoztuk meg a kiválasztott két 5' szabályozó régióban található polimorfizmus (rs6039769 és rs6077690) illetve a két 3' szakaszon elhelyezkedő SNP (rs3746544 és rs1051312) allél- és genotípus eloszlását, valamint a különböző haplotípusok frekvenciáit. Mind a négy variáns genotípus eloszlása megfelelt a Hardy-Weinberg egyensúly alapján számított várható értéknek (χ^2 -próba $p > 0,05$, azaz *nincs* szignifikáns eltérés), a ritka allél frekvenciák (MAF) 0,255 és 0,417 között mozogtak. Mivel a 3' szabályozó régió két polimorfizmusa egymás közvetlen közelében volt (7. táblázat), ezért lehetséges volt minden egyes DNS-minta esetén a haplotípusok direkt, molekuláris meghatározása. A genotípusokat így ebben az esetben a haplotípus eredményekből vezettük le.

7. táblázat: A vizsgált polimorfizmusok kromoszomális elhelyezkedése, Hardy-Weinberg p értékei és minor allélfrekvenciái.

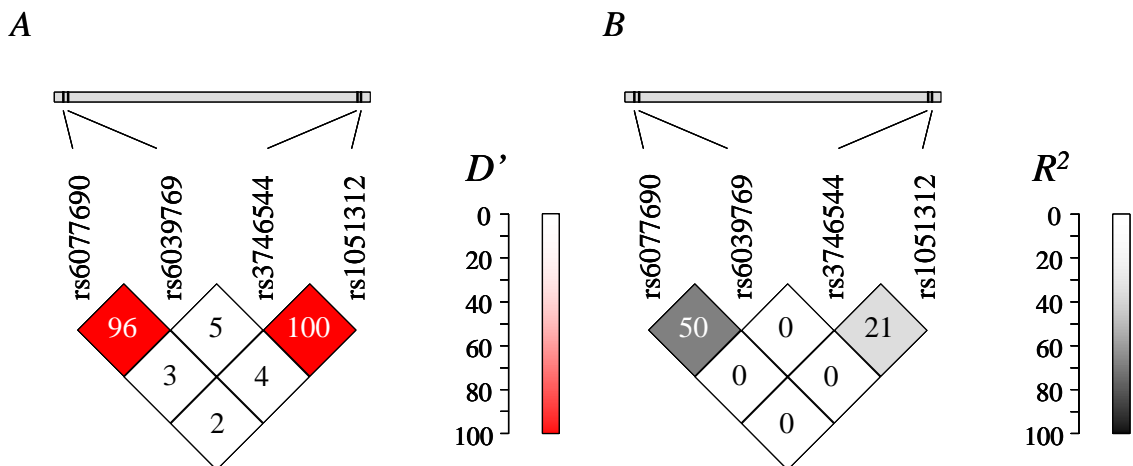
SNP	Pozíciója a 20. kromoszómán	Hardy-Weinberg p	Ritka allél gyakorisága (MAF)
rs6077690 AT	10 197 461	0,8899	A: 0,417
rs6039769 AC	10 198 954	0,4417	A: 0,276
rs3746544 GT	10 287 084	0,7394	G: 0,391
rs1051312 CG	10 287 088	0,1909	C: 0,255

A 3' szabályozó régió két közeli polimorfizmusával ellentétben az 5' szakaszon található genetikai variánsok egymástól fizikailag távolabb helyezkedtek el, így ez nem tette lehetővé a direkt haplotípus elemzést, ezért a haplotípus frekvenciákat ebben a régióban számítással határoztuk meg.

8. táblázat: A *SNAP-25* gén vizsgált genetikai variánsainak haplotípus-eloszlása.

rs6077690 AT – rs6039769 AC (5' UTR)		rs3746544 GT – rs1051312 CG (3' UTR)	
Haplotípus	Frekvencia	Haplotípus	Frekvencia
TC	0,579	GT	0,391
AA	0,269	TT	0,354
AC	0,146	TC	0,255
TA	0,006	GC	0

A 3' szabályozó régió esetén jelen eredményeink alátámasztották korábbi megfigyelésünket, miszerint a G–C haplotípus egyáltalán nem fordul elő az általunk vizsgált populációban. Érdekes módon hasonló eredményt figyeltünk meg az 5' szabályozó régió haplotípusainak számításakor is. Annak ellenére, hogy a T–A haplotípus nem 100%-osan hiányzott a vizsgált populációból, mégis a gyakorisága jóval alacsonyabb volt (0,006) az allélfrekvenciák alapján számított várható értéknél (0,161). Ennek következményeként mindkét esetben a kapcsoltág egy speciális típusát kaptuk, amit a magas Lewontin-féle D' érték mellett egy a D' értékéhez képest igen alacsony R^2 érték jellemz. A 3' és az 5' szabályozó régió polimorfizmusai között semmilyen kapcsoltág nem volt kimutatható (20. ábra).



20. ábra: A SNAP-25 génben vizsgált SNP-k kapcsoltsági analízise: A: Lewontin-féle D' értékek B: R^2 értékek.

4.2.4 A SNAP-25 SNP-k és az impulzivitás asszociációvizsgálata

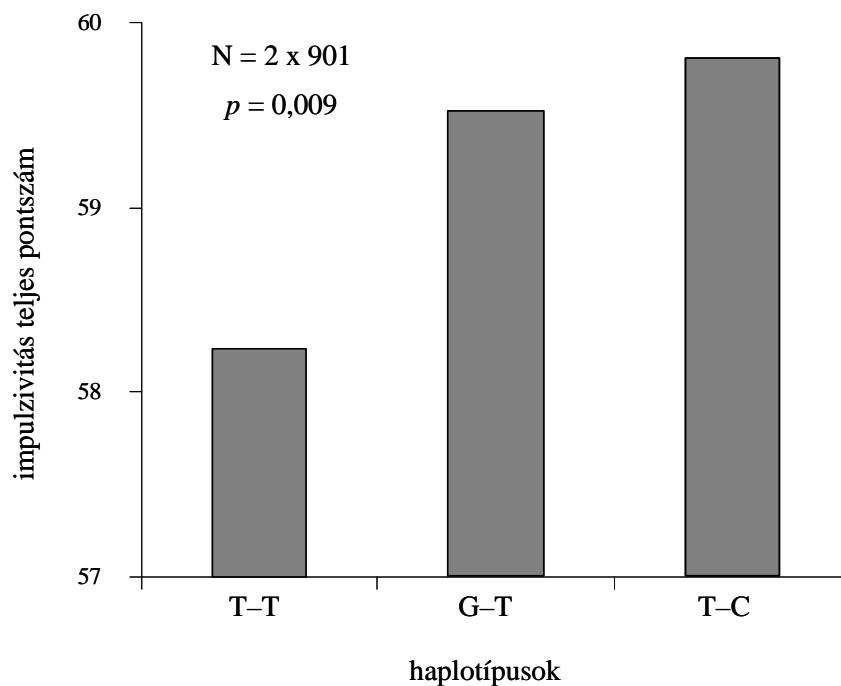
Asszociációvizsgálatunkban első lépésként az egyes genotípus-csoportokba tartozó személyek átlagos impulzivitás-pontszámait hasonlítottuk össze egyszempontos varianciaanalízis (ANOVA) alkalmazásával. Az 9. táblázat mutatja, hogy az 5' szabályozó régió polimorfizmusai esetében nem találtunk összefüggést a vizsgált jelleg és a genetikai variációk között.

9. táblázat: A SNAP-25 4 polimorfizmusa és az impulzivitás endofenotípusa közötti asszociációvizsgálat. N : adott genotípust hordozó személyek száma; STD: szórási.

SNP	Genotípus	N	Átlagpontszám	STD	p
rs3746544	GG	134	59,86	9,4	0,335
	GT	393	59,30	10,0	
	TT	374	58,56	9,1	
rs1051312	CC	49	62,39	9,2	0,042
	CT	326	59,02	9,6	
	TT	526	58,80	9,5	
rs6039769	AA	17	63,53	9,0	0,934
	AC	80	62,89	10,0	
	CC	106	63,38	9,7	
rs6077690	AA	38	64,79	8,9	0,411
	AT	95	62,26	10,3	
	TT	69	62,97	9,7	

Ezzel ellentétben a 3' szabályozó régió rs1051312-es polimorfizmusa nominális asszociációt mutatott az impulzivitást mérő Barratt-összpontszámmal ($p = 0,042$), ami azonban nem érte el a Bonferroni korrekció alkalmazásával meghatározott statisztikai szignifikancia szintet (ugyancsak 9. táblázat).

Asszociációvizsgálatunk második lépése a haplotípus-alapú, allélok szerinti varianciaanalízis volt. Ennek során külön-külön elemeztük a 3' és az 5' szabályozó régió polimorfizmusait. Az 5' szabályozó régióban vizsgált genetikai variánsok haplotípusai és a Barratt-teszten elért pontszámok között nem találtunk szignifikáns összefüggést. Fontos eleme vizsgálatunknak, hogy a 3' szabályozó régió két polimorfizmusának haplotípusait nem elméleti számítás alapján állapítottuk meg, hanem minden egyes minta esetében direkt molekuláris módszerrel határoztuk azt meg.



21. ábra: Asszociációanalízis az impulzivitás és a 3' szabályozó régió két polimorfizmusának (rs3746544, rs1051312) haplotípusai között: Azon résztvevők akik rendelkeztek a T-T haplotípussal szignifikánsan alacsonyabb értéket értek el a Barrat-skálán ($p = 0,009$), összehasonlítva azokkal, akik nem hordozták ezt az allélkombinációt

Az asszociációs számításaink szerint azok a személyek, akik ezen két 3' szabályozó régió SNP tekintetében (rs3746544 és rs1051312) a T–T haplotípussal rendelkeztek, szignifikánsan alacsonyabb összpontszámot értek el a Barrat-teszten (58,24), mint azok a személyek, akik ezt a haplotípust nem hordozták (59,63). Ez a hatás szignifikáns volt abban az esetben is, ha a három haplotípus csoportot egyenként hasonlítottuk össze ($p = 0,009$), és akkor is, ha a T–T haplotípust hordozókat és azzal nem rendelkezőket hasonlítottuk össze ($p = 0,003$) (21. ábra).

4.3 A SNAP-25 gén 3' régió SNP-k funkcionális vizsgálata

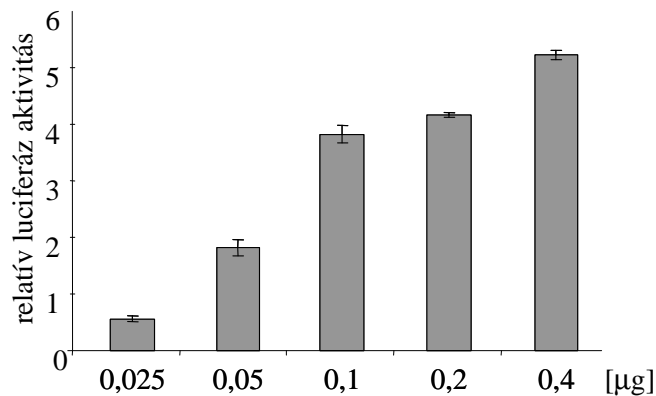
Az asszociációvizsgálat eredményei alapján a 3' szabályozó régió két polimorfizmusának haplotípusai asszociációt mutattak az impulzivitás endofenotípusával, ezért ezeket a továbbiakban *in vitro* funkcionális vizsgálattal kívántuk elemezni. Az *in silico* szekvenciaelemzések során arra a következtetésre jutottunk, hogy mindkét vizsgált polimorfizmus (rs3746544 és rs1051312) várhatóan hatással lehet a miR-641 mikro-RNS és a SNAP25 mRNS-e közötti kölcsönhatásra, mivel a vizsgált két SNP a mikro-RNS által felismert *seed* régiójának célszekvenciájában található.

Az *in silico* szekvencia összehasonlítás eredményének biológiai jelentőségét *in vitro* funkcionális kísérletek alkalmazásával kívántuk elemezni. Ehhez a SNAP-25 gén teljes 3' szabályozó régióját pMIR riporter luciferáz konstrukcióba klónoztuk, amely szakasz a miR-641 *seed* régiójának célszekvenciáját is tartalmazta. Az egyes haplotípusokat irányított mutagenézissel hoztuk létre, az elkészült konstrukciókat minden esetben szekvenálással ellenőriztük. Elkészítettük a G–C haplotípust hordozó konstrukciót is, bár ez a haplotípus az általunk vizsgált populációban egyáltalán nem fordult elő, kíváncsiak voltunk azonban ezen haplotípus molekuláris hatására is.

Méréseinket HEK293 típusú sejteken végeztük, amelyek a könnyen tenyészthető és transzfektálható sejtvonalak közé tartoznak, ezért széles körben használt és elfogadott sejt kultúra sejtbiológiai vizsgálatokhoz. Első lépésben arra voltunk kíváncsiak, hogy modellsejtjeink milyen mennyiségben expresszálják a SNAP-25 mRNS-t és a miR-610 mikroRNS-t. Irodalmi adatok alapján beszámoltak arról [81], hogy a SNAP-25 kifejeződik a HEK293 sejtekben, ezt méréseinkkel mi is reprodukálni tudtuk, azonban a HEK293 sejtek mikroRNS expressziós profiljáról eddig nem közöltek részletesebb ada-

tokat. Megállapítottuk, hogy a miR-610-es mikroRNS kifejeződik a HEK293 sejtvonalban, azonban a belső kontrollként mért miR-196b mennyiségéhez képest egészen elenyésző mértékben.

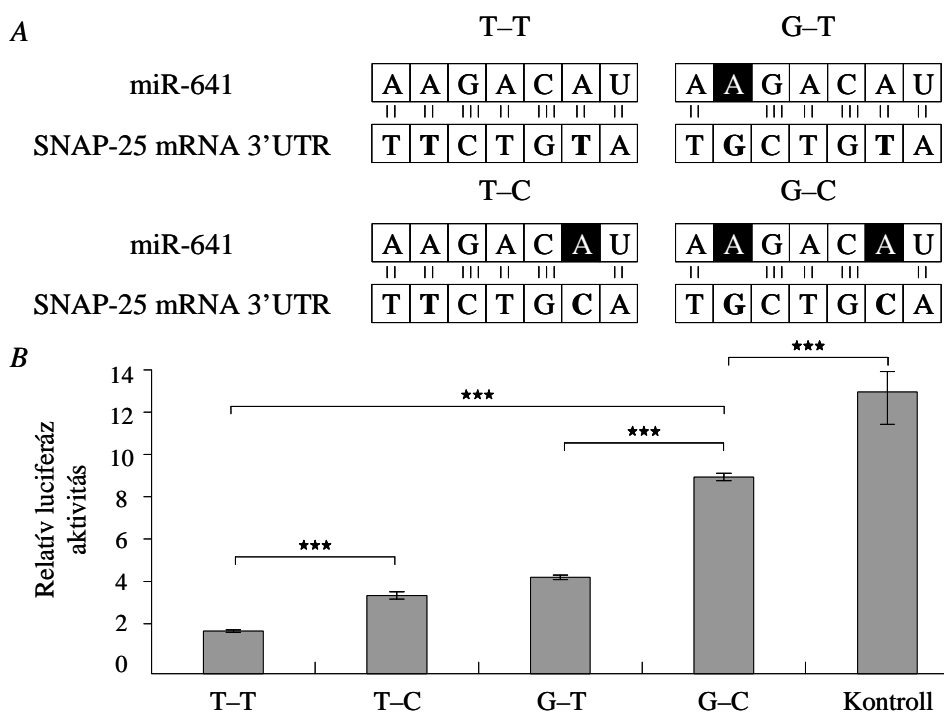
Következő lépésben azt kívántuk meghatározni, hogy milyen mennyiségű riporter konstrukció transzfektálása optimális a funkcionális mérések során. Ehhez hígítási sort készítettünk a T–T haplotípust hordozó konstrukcióból, és azonos mennyiségű β -galaktozidázt kódoló plazmiddal kotranszfektáltuk. Eredményeink alapján (22. ábra) látható, ahogy a növekvő plazmidmennyiséget egyre kevésbé követi lineárisan a relatív luciferáz aktivitás, ezzel ellentétben a kisebb mennyiségek esetén ez az összefüggés még megfelelő arányosságot mutat. Méréseinkhez ezért a 0,05 μ g plazmidmennyiséget választottuk.



22. ábra: A transzfektált riporter konstrukció és a relatív luciferáz aktivitás összefüggése: A SNAP-25 3' szabályozó régióját hordozó T–T haplotípusú konstrukciót növekvő mennyiségben transzfektáltuk, és meghatároztuk a relatív luciferáz aktivitást.

Az rs3746544 és rs1051312 SNP-k feltételezett szabályozó szerepét úgy vizsgáltuk, hogy összehasonlítottuk a négy különböző haplotípust hordozó riporter konstrukciókkal meghatározott relatív luciferáz aktivitás értékeket. Belső kontrollként azonos mennyiségű (0,2 μ g) β -galaktozidázt kifejező konstrukciót alkalmaztunk, valamint minden esetben 5 pmol miR-641-et kotranszfektáltunk. A legalacsonyabb relatív luciferáz aktivitást a T–T haplotípus esetében figyeltük meg, mely haplotípus jelenlétekor a miR-641 *seed* régiója és a 3' UTR-ben (riporter konstrukciókban) található kötő szekvencia tökéletesen komplementer egymással (23. ábra). A G–T illetve a T–C haplotípus a felismerőhely egyet-

len pozícióját változtatta meg, ebben az esetben a relatív luciferáz aktivitás 1,8-szoros, illetve 2,1-szeres megnövekedését figyeltük meg. Amellett, hogy a kötőhely egyetlen nukleotidjának megváltoztatása szignifikánsan megemelte a riporter aktivitást, nem volt a G–T és a T–C haplotípusokkal kapott értékek között szignifikáns a különbség. Ez arra utalhat, hogy bár egy nukleotid megváltozása is megváltoztatja a miR-641 bekötődésének hatékonyságát, közömbös viszont, hogy a nem komplementer nukleotid a *seed* régió mely pozíciójában helyezkedik el. A G–C haplotípus esetén a miR-641 *seed* szekvenciájának két nukleotidja nem komplementer a 3' UTR-ben lévő kötőhellyel, ennek eredményeként a mért relatív luciferáz aktivitás 4,6-szorosa volt a T–T haplotípus esetén mért értéknek. Ez arra utalhat, hogy két nukleotid eltérése még jelentősebben rontja a mikro-RNS kötődésének hatékonyságát. A mérés során kontrollként egy olyan riporter konstrukciót alkalmaztunk, melyben a luciferáz gén mögé egy a *SNAP-25* gén 3' szabályozó régiójával azonos hosszúságú szekvenciát klónoztunk, amelyből a miR-641 *seed* régiójának célszekvenciája teljesen hiányzott. Ezen konstrukció esetében mértük a legmagasabb relatív luciferáz aktivitást, ami feltehetően a miR-641 bekötődésének teljes elmaradásával magyarázható (23. ábra).



23. ábra: A két 3' szabályozó régió polimorfizmus hatása a miR-641 kötődésére:

A. Szekvenciák összeillesztése: a miR-641 *seed* régiója és a SNAP-25 mRNS-ének

komplementer szakasza. Vastag betűk mutatják a polimorf helyeket, fekete háttéren fehér betűkkel szimbolizáltuk az SNP miatt nem komplementer párokat. **B. A SNAP-25 3' szabályozó régiójának négy különböző haplotípusát hordozó konstrukciók valamint a kontroll plazmid relatív luciferáz aktivitásai. *** $p < 0,01$**

5 Megbeszélés

5.1 A fehérjeizomformák mérésének jelentősége

A 2003-ban befejezett és nyilvánosságra hozott Humán Genom Projekt egyik meglepő eredménye volt, hogy a genom meglepően kis hányada (alig több, mint 1%-a) felelős az összes fehérje aminosavsorrendjének meghatározásáért. Ismertté vált az is, hogy a különböző emberi fehérjék száma lényegesen nagyobb, mint amennyi fehérjét kódoló gén található a genomban, ez – többek között – úgy lehetséges, hogy egy gén számos esetben több – valamelyest – különböző fehérje létrehozásáért felel. A nagy áteresztő képességű vizsgálatok kimutatták, hogy a több exonból álló génekről átíródó elsődleges transzkriptumok mintegy 95%-a alternatív splicingon esik át, azaz róla különböző szekvenciájú mRNS-ek képződhetnek [82, 83]. Az így keletkező különböző fehérjeizomformák révén a proteom változatossága nagy mértékben megnő, ugyanezen említett vizsgálatok arra is rámutattak, hogy a ritkább izoforma gyakorisága a gének kb. 86%-ának esetében 15%-nál magasabb, ami arra utal, hogy ezen mechanizmus mennyiségileg is jelentős mértékben járul hozzá a fehérjék létrejöttéhez. Az izoformák keletkezésének másik módja, amikor az átíródás különböző promoterek alkalmazásával történik. Mivel a promoterek szövetspecifikusak és sok esetben a jelenlévő transzkripció faktorok különböző fejlődési stádiumokhoz köthetőek, a különböző szövetek különböző izoformákat termelnek ugyanazon génről, sőt ugyanazon szövet is termelhet különböző variánsokat élete során.

Amellett, hogy az izoformák által biztosított diverzitás nagy evolúciós előnyt jelent a magasabb rendű eukarióták számára, egyben rizikófaktor is lehet. A spliceozómához kapcsolódó különböző RNS kötő fehérjék (RBP) kölcsönhatnak a komplex-szel és erősítik vagy gyengítik például az exon-intron határok fölismerését [84], és egyre több adat utal arra, hogy ezen reguláció felbomlása szoros összefüggést mutathat különböző kóros állapotok kialakulásával vagy progressziójával.

A csontvázrendszer betegségei hátterében ismertek olyan ritka mutációk, amelyek a splicing felismerőhelyeit érintik, erre példa az osteogenezis imperfekta egyik formájáért felelős *COL1A1* gént érintő mutáció. Megfigyelték azonban azt is, hogy a különböző csontvázrendszert érintő betegségek során megváltozik bizonyos géntermékek izoforma aránya. Biomarkerként is lehetséges ezen izoformák mennyiségének követése, erre pél-

da a fibronektin, a *VEGF* és a *CD44* gének termékei [85]. A fibronektin esetében megfigyelték, hogy míg egészséges esetben a főtális korban megfigyelhető magas EDA+ típusú fibronektin-izofорма felnőttkorra lecsökken, addig kóros esetekben – jellegzetesen például rheumatoid arthritisben [86] – szintje ismét magas lesz.

Magas áteresztő képességű módszerrel vizsgálták prosztatarákos férfiak neoplasztikus szöveteit, és több, mint 200 gén esetében megfigyelték, hogy megváltozott az alternatív splicing szabályozása és így bizonyos fehérjeizoformák aránya [87].

Az idegrendszerben kifejeződő feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák gyors, átmeneti kalcium jelet generálnak a sejtben a sejtmembrán depolarizáció hatására. Számos sejtfolymatot szabályoznak, ezért felmerült a szerepük fontossága különböző neurológiai és pszichiátriai megbetegedés, például epilepszia, Parkinson-kór, szkizofrénia, krónikus fájdalom, bipoláris megbetegedés hátterében [88]. Egérmodelleken kimutatták, hogy amennyiben a *Cacna1b* génben az e37a exont kicserélik egy másik e37b jelű változatra, akkor hőstimulus esetén a gerincvelőbe adott morfin kevésbé hatékony, mint a vad típusú állatokban.

5.2 A SNAP-25 mennyiségének kapcsolata neuropszichiátriai betegségekkel

A *SNAP-25* gén fehérjetermékei legnagyobb mennyiségben az idegrendszeri eredetű szövetekben fejeződnek ki, és ismert, hogy alapvető szerepet játszanak a neurotranszmisszió során. Megváltozott mennyiségüknek kóros szerepe ennek megfelelően számos neuropszichiátriai kórkép hátterében felmerült.

A *coloboma* egerek a *SNAP-25* gént kódoló kromoszómaszakasznak csak egy kópiáját hordozzák. Ezen állatok esetében megfigyelték, hogy a fejlődésben lévő egerek mérsékelt hiperaktivitást mutattak, amely az asszociatív tanulás és memória deficitjével párosult [89]. Továbbá ezen egerek érzékenyebbek voltak a kainát-indukálta görcsökre, amelyeket azonban az antiepileptikus szerekkel hatékonyan tudtak kezelni.

A szkizofrénia patkánymodelljén, melynek létrehozásakor az állatokat krónikus hipoxiának tettek ki a születésük utáni 4–8. nap között, négy agyrégiót vizsgálva számos preszinaptikus fehérjét kódoló gén expressziójában találtak eltérést, ezek közé tartozott a SNAP-25 is. Míg a frontális kortexben és a temporális kortexben a SNAP-25

mennyisége megnőtt, addig a putamen kaudális magjában a koncentrációja csökkenést mutatott [90].

Etain és munkacsoportja testvérpárokat vizsgálva genom szintű asszociáció vizsgálat keretében összefüggést mutatott ki a korán manifesztálódó bipoláris betegség és a 20. kromoszóma p12-es szakasza között, ahol a *SNAP-25* gén is található. A vizsgálatot a régió genetikai variánsainak elemzésével folytatták és megállapították, hogy a gén promoter régiójában elhelyezkedő rs6039769 SNP C allélja a korán manifesztálódó bipoláris betegség rizikófaktorának tekinthető. Kimutatták továbbá, hogy a polimorfizmusra homozigóta CC személyek prefrontális kortexében szignifikánsan alacsonyabb *SNAP-25 b* izoforma expresszió mérhető [91].

Alzheimer-kórban szenvedő betegektől *post mortem* vett agyszövet minták elemzése kimutatta, hogy 3 régióban: az enterorhinális, az auditorikus kortexben és a hippocampusban a *SNAP-25* mennyisége szignifikánsan alacsonyabb, mint neuropszichiátriai kórképekben nem szenvedő személyek esetében. Megállapították továbbá, hogy a *SNAP-25* gén promoterének metilációja nem különbözött szignifikánsan, amikor fiatal, valamint idős egészséges személyek limfocitáit hasonlították össze Alzheimeres betegek limfocitáival, így arra a következtetésre jutottak, hogy egyéb mechanizmusok lehetnek felelősek a megfigyelt mennyiségi eltérésben [92]. Ez a megállapítás összevethető az általunk mért eredményekkel, miszerint az impulzivitás az 5' régió polimorfizmusaival nem mutatott összefüggést, asszociációt csak a 3' szakaszban lévő SNP-vel tudtunk kimutatni. Ez arra utalhat, hogy a képződő fehérje mennyiségében a gén átíródásának szabályozásán túlmenően a poszttranszkripció mechanizmusok is hangsúlyos szerepet játszhatnak.

Az α -synuclein génjét érintő mutációk tehetőek felelőssé a Parkinson-kór bizonyos familiáris formáiért. Kitenyésztettek egy olyan egérmodellt, ami az α -synuclein trunkált fehérje változatát termeli: az állatok a Parkinson-kór számos tünetét hordozzák. Ezen egereket vizsgálva megfigyelték, hogy a striatumban korfüggő módon kimutatható a SNARE fehérjék, köztük a *SNAP-25* kóros eloszlása a dopaminerg sejtekben. Míg az egészséges egerek sejtjeiben a fehérjék homogén eloszlást mutattak, addig a génmutációt hordozó állatok idegvégződéseiben közösen aggregálódtak a SNARE fehérjék a kóros, trunkált α -synucleinnel [93].

Gray és munkatársai 1-es típusú bipoláris betegségben szenvedő, szkizofrén valamint pszichiátriai kórképektől mentes személyek *post mortem* agyszeleteit vizsgálták Western-blot technikával három kortikális régióban (BA10, 40 és 46). A SNAP-25 fehérje expressziósszintjében eltérést találtak az 1-es típusú bipoláris személyek parietális BA40-es mezőjében, ahol szignifikánsan megemelkedett a SNAP-25 szintje a kontroll mintákéhoz képest [94]. Hasonló eredményt kaptak Scarr és munkatársai, ők nyolc 1-es típusú bipoláris betegségben elhunyt személy agymintáját szkizofrén és kontroll személyek mintáival hasonlították össze. Eredményeik szerint a dorsolaterális Brodmann 9-es mezőben a SNAP-25 mRNS-szintje lecsökkent, ugyanakkor – meglepő módon kísérleteik szerint – ehhez megemelkedett fehérje szint társult.

5.3 Az impulzivitás: a pszichiátriai betegségek neurobiológiai tényezője

Évente majdnem 1 millió ember vet véget saját kezével az életének, de az öngyilkosság prevalenciája a társadalom egyes specifikus csoportjaiban még drámaibb számokat mutat [95]. A kóros impulzivitás a bipoláris betegség egyik alapvető összetevő eleme, számos kutatás összefüggésbe hozza az öngyilkossággal is. Watkins és Meyer szisztematikusan elemezve a vonatkozó irodalmat mégis arra a következtetésre jutottak, hogy az eddigi kutatások eredményei korántsem egységesek, a korrelációt kimutató cikkekkel ellentétben több olyan közlemény is olvasható, amely cáfolja az öngyilkossági hajlam és az impulzivitás közötti összefüggést [96].

Hasonlóképpen némiképp ellentétes eredményekkel találkozhatunk a tudományos irodalomban az ADHD és az impulzivitás közötti összefüggéssel kapcsolatban a funkcionális MRI vizsgálatok tükrében [97]. Plichta és Scheres áttekintő munkájában megállapítja, hogy míg az egészséges személyek körében végzett vizsgálatok esetében a ventro-striatalis régió aktivitása pozitív módon korrelált az impulzivitás mértékével, addig ADHD-s személyeket vizsgálva ez az összefüggés fordított volt. Ezt a meglepő ellentmondást három különböző gondolatmenettel is indokolták. Az első elmélet az impulzivitás és a ventro-striatalis régió aktivitása között egy hasonló összefüggést tételez föl, mint a Yerkes-Dodson szabály, ami az éberség és a teljesítmény közötti kapcsolatot írja le. Utóbbi esetében megállapították, hogy sem a túl magas szintű, sem a túl alacsony éberségi fok nem optimális a legjobb teljesítmény elérése szempontjából, az összefügg-

gés egy konkáv görbével jellemezhető. Ehhez hasonló lehet az összefüggés az impulzivitás és a ventro-striatalis régió aktivitása között az első elmélet alapján. A második elmélet a genetikai hátteret hangsúlyozza, miszerint a kapcsolat az impulzivitás és a ventro-striatalis aktivitás között egészséges egyéneknél sem homogén, hanem függ például a *DATI* gén genetikai variánsaitól is. Ezen modell a genetikai faktorok jelentőségét hangsúlyozza, amely az ADHD hátterében is fontos tényező. A harmadik modell alapján felmerül annak a lehetősége, hogy a ventro-striatalis régió aktivitása az ADHD egy másik faktorával függ össze és nem az impulzivitással. Összefoglalva ez a közlemény inkább arra hívja fel a figyelmet, hogy a már-már bizonyosnak vélt összefüggés az ADHD és az impulzivitás között korántsem olyan egyértelmű, és hogy a rendelkezésre álló eredmények jelenleg még nem elegendőek az összefüggés megbízható alátámasztására.

5.4 SNAP-25 polimorfizmusok és pszichiátriai megbetegedések

A *SNAP-25* gén által kódolt fehérje a neurotranszmissziós folyamat elengedhetetlen tagja, így a kódoló szekvencia, valamint a környező szabályozó régió mutációi, polimorfizmusai számos neuropszichiátriai betegség, elsősorban az ADHD genetikai rizikófaktoraként merültek fel.

2000-ben jelent meg az első asszociációanalízis, amely a *SNAP-25* genetikai variánsai és az ADHD közötti kapcsolatot vizsgálta [76]. Mivel ebben az időben még nem voltak teljesen ismertek a *SNAP-25* gén pontos exon és intron határai, ezért elsőként a 3' szabályozó régió genetikai variánsait térképezték fel. Ehhez első lépésben SSCP módszert alkalmaztak, melynek során PCR-rel felszorzosították a vizsgálni kívánt génszakaszt, majd a PCR termék 2 µl-ét fluoreszcens festékkel összekeverték, majd 95 °C-on 2 percen át denaturálták és gyorsan lehűtötték. A DNS-molekulák így egyszálú, denaturált szerkeztűek maradtak, és – bázissorrendjüktől függően – különböző konformációt vettek fel. Így az egyes termékek elektroforetikus mobilitása is eltérő, ami elektroforetikus technikával láthatóvá tehető. A különböző variánsok pontos bázissorrendjét direkt szekvenálással határozták meg, és négy különböző polimorf variánst azonosítottak. A továbbiakban két polimorfizmust vizsgáltak, amelyeknek a jellemzője, hogy mindkettő létrehoz vagy megszüntet egy restriktív enzim hasítóhelyet. A jelen dolgozatban is

vizsgált két SNP-t (rs3746544 és rs1051312) szokás ezért hagyományosan *Mnl* I és *Dde* I polimorfizmusoknak is nevezni. Ebben a munkában 122 kanadai ADHD-s személy genotípusait és haplotípusait határozták meg. Az allél-átadás módszerén alapuló TDT elemzéshez 83 családnál volt az érintett személy mellett mindkét szülő elérhető, míg 14 esetben csak az anya vagy az apa adatai álltak rendelkezésre. A Mendel-szabályok figyelembe vételével 66 személy esetén tudták egyértelműen meghatározni a haplotípust is. Eredményeik alapján a T–C haplotípus szignifikánsan gyakrabban fordult elő az ADHD-s személyek mintáiban, valamint a szignifikancia határt majdnem elérte az a megfigyelés is, hogy a T–T haplotípus ritkábban öröklődött az ADHD-s személyek részére. Ez összevethető saját vizsgálatunkkal, miszerint a T–T haplotípus eredményeink szerint szignifikánsan alacsonyabb impulzivitás pontszámmal járt [98].

Számos további kutatócsoport vizsgálta ezt a két polimorfizmust, az eredmények azonban sok esetben ellentmondóak. Egy amerikai mintákat feldolgozó elemzés TDT analízist alkalmazva a T–C haplotípus gyakoribb előfordulását figyelte meg az ADHD-s személyek mintáiban. [99], míg ír mintát vizsgálva Brophy és munkatársai csupán az egyik polimorfizmussal találtak összefüggést, azonban a két polimorfizmus haplotípusaival nem [100].

Mill és munkatársai 2002-ben egy az 5' nem transzlálódó régió és az 1. exon között elhelyezkedő mikroszatellitát vizsgáltak az ADHD feltételezett genetikai komponenseként. Eset-kontroll vizsgálatukban 318 ADHD-s beteg és 354 kontroll személy vett részt. Megállapították, hogy a 2-es allél szignifikánsan ritkábban fordult elő az ADHD-s személyek mintái között, míg az 5-ös allél gyakrabban volt kimutatható a betegek körében. A védő hatású 2-es allél O.R. = 0,54 esélyhányadossal volt jellemezhető, az 5-ös allél esélyhányadosa pedig 1,34 volt mutatva, hogy – a komplex jellegeknél megszokott módon ebben az esetben is – egy kis hatású genetikai faktorról beszélhetünk [Mill, 2002]. Két évvel később további 11 polimorf variánst azonosítottak, melyek közül hatot (azokat, melyek minor allél frekvenciája meghaladta az 5%-ot) elemzett egy kibővített ADHD-s mintán ugyanez a csoport DHPLC technikával. A polimorfizmusok között megtalálható volt a 3' szabályozó régióban elhelyezkedő sokak által elemzett és a mi munkánk során is vizsgált rs3746544 és rs1051312 SNP, valamint az általunk ugyancsak kiválasztott, 5' nem transzlálódó régióban elhelyezkedő rs6077690 variáns is. Eredményeik alapján szignifikáns összefüggést találtak a korábban is vizsgált

mikroszatellita polimorfizmussal, csakúgy, mint a 3' nem transzlálódó régió rs1051312 SNP-je valamint az 5' UTR rs6077690 polimorfizmusa is asszociációt mutatott a kórképpel [77]. Megjegyezendő ugyanakkor, hogy a 3' nem transzlálódó régió variánsok haplotípus elemzése a korábbiakhoz képest ellentétes elemzést hozott: a T–T haplotípus az ADHD-s személyek mintáiban gyakrabban fordult elő.

A témában publikált és esetenként ellentmondó kutatások eredményét 2009-ben egy meta-analízis kísérelte meg egybefogni. Ez az összefoglaló elemzés az ADHD számos kandidáns génjével kapcsolatos eredményeket feldolgozva kimutatta, hogy a *SNAP-25* gén polimorfizmusai közül a két 3' nem transzlálódó régióban található, rs3746544 és az rs1051312 SNP-k hozhatók kapcsolatba a kórképpel. Az előbbi SNP esetén szignifikáns, az utóbbi esetén azonban csak tendencia jellegű asszociáció állapítható meg. A két polimorfizmus haplotípusait ugyanakkor ebben a vizsgálatban nem elemezték [101].

A komplex jellegek és így az ADHD háttérében álló genetikai komponensek szignifikáns, ám mégis viszonylag kismértékű hatását mutatja az is, hogy genom-szintű asszociációanalízisek során eddig nem sikerült olyan polimorfizmust illetve genom régiót kimutatni, amely az ADHD-val összefüggésben lenne [102-105]. A genom-szintű vizsgálatok meta-analízise is negatív eredménnyel zárult [106]. Ezen elemzések a kis hatású genetikai faktorok kimutatására azért kevésbé alkalmasak, mert a többszörös tesztelés a statisztikai elemzés megfelelő korrekcióját, szigorúbb szignifikancia szint alkalmazását teszi szükségessé, ez a kis hatású polimorfizmusok kimutathatóságát megnehezíti. Emellett felmerül még az SNP-k mellett más típusú variánsok (ismétlődési polimorfizmusok) szerepe is, amelyre azonban a genom-szintű asszociáció vizsgálatok leggyakrabban nem terjednek ki.

A *SNAP-25* genetikai variánsait egyéb neuropszichiátriai betegségek háttérében is vizsgálták. Etain és munkatársai bipoláris betegek mintáit elemezve asszociációt mutattak ki az általunk is vizsgált rs6039769 promóter-polimorfizmus és a korai kezdetű bipoláris betegség között, ami a betegség súlyosabb megnyilvánulásának egyik ismert rizikófaktora. Vizsgálatukban 197 korai kezdetű bipoláris betegségben szenvedő személy, 202 késői kezdetű beteg és 136 egészséges személy mintáit hasonlították össze [91]. Antiszociális személyiségzavar háttérében is vizsgálták a *Dde I* és *Mnl I* polimorfizmusok szerepét. Bár mindössze 91 felnőtt férfi mintáit hasonlították össze 38 korban illesztett

kontroll személy mintáival, szignifikáns eredményt tudtak kimutatni, amely szerint a T–T haplotípus gyakoribb a személyiségzavarral diagnosztizált személyeknél [107].

A *SNAP-25* gén kódoló régiójában emberben aminosavcserét okozó mutációt vagy polimorfizmust eddig nem mutattak ki. Egy 2006-ban megjelent közlemény ugyanakkor beszámol egy egerekben létrehozott autoszomális domináns misszenz variációról, melynek következtében a 67-es pozícióban lévő izoleucin treoninra cserélődik. A mutációt hordozó egerek életképesek voltak, azonban mind a neurotranszmisszió, mind a hasnyálmirigy β -sejtjeinek exocitózisa zavart szenvedett, az állatok emellett ataxiásak voltak és károsodott a szenzomotoros észlelésük is [108]. Ez a megfigyelés is alátámasztja a *SNAP-25* megváltozott működésének kóros szerepét nem csak pszichiátriai zavarok, hanem valószínűsíthetően a cukorbetegség hátterében is.

5.5 A mikro-RNS-ek megváltozott mennyisége és betegségek kapcsolata

A közelmúltban megjelent számos tanulmány alátámasztja, hogy – a korábbi feltételezésekkel és ismeretekkel szemben – a fehérjeszintézis szabályozása igen összetett és sokrétű folyamat, és a fehérjék mennyisége távolról sem csak a transzkripció, azaz az mRNS-szintézis aktivitásával áll összefüggésben. A fehérjék szintézisének egyik fontos, a közelmúltban felfedezett szabályozó mechanizmusa a mikro-RNS-ek hálózata, egyes becslések alapján a fehérjék kódoló gének legalább 30%-ára [109] vannak hatással, más vizsgálatok szerint ez az érték ennek akár a duplája, közel 60% is lehet [110].

A mikro-RNS-ek profiljának megváltozását számos betegség hátterében vizsgálják.

A kettős típusú cukorbetegség hátterében számos mikro-RNS mennyiségi eltérése mutatható ki a betegek szérumában, valamint egy tanulmány szerint egyes mikro-RNS-ek szintje (miR-192, miR-140-5p és miR-222) korrelál az inzulinérzékenységgel [111].

Az immunrendszer egészséges kialakulásában elengedhetetlen a mikro-RNS-ek érési folyamatának épsége, ezt bizonyítja az a 2014-ben publikált kísérletsorozat, melynek során a csecsemőmirigy eredetű epithelialis sejtekből a *DGCR8* gént kitörölték, amelynek fehérjeterméke elengedhetetlen résztvevője a mikro-RNS érés kanonikus útvonalának. A kiütött gén hiányában a csecsemőmirigy epithelialis sejtjei nem voltak képesek a thymus szabályos szövetstruktúrájának kialakítására, a sejtek nagy százaléka vesztette

el az autoimmun regulátor nevű gén expresszióját, aminek hiányában leáll a negatív szelekció, tehát a saját antigént felismerő T sejtek eliminációja [112].

Rheumatoid arthritises betegek körében is végeztek mikro-RNS profil vizsgálatot, amelynek eredményeként két biomarkert azonosítottak, a miR-24-et és a miR-125a-5p-t, amely mikro-RNS-ek mind az ACPA pozitív, mind az ACPA negatív rheumatoid arthritises betegek szérumában szignifikánsan megemelkedtek. Érdeemes kiemelni, hogy ezen mikro-RNS-szint változások a rheumatoid arthritis specifikus biomarkerei, ugyan-ezek a változások osteoarthritis-ben vagy szisztémás lupus erythematosus-ban szenvedő betegek szérumában nem mutathatók ki [113].

A kardiovaszkuláris megbetegedések hátterében is számos vizsgálat irányult a mikro-RNS-ek kóroki szerepének feltárására. Corsten és munkatársai 2010-ben akut miokardiális infarktusos, virális szívizomgyulladásos, diasztolikus diszfunkciós és akut szívelégtelenségben szenvedő személyek szérumában nézték a különböző, szívszövethez köthető, fibrózissal asszociált és fehérvérsejtekkel asszociált mikro-RNS-ek szintjét. Akut miokardiális infarktusbán a szív-asszociált miR-208b és miR-499 szintje 1600-szorosára, illetve 100-szorosára emelkedett a szérumban, valamint szorosan korrelált a szérum troponin T szintjével, ami arra utal, hogy ezek a mikro-RNS-ek a sérült szívizomsejtekből áramoltak ki. Hasonló, bár kisebb mértékű volt a két mikro-RNS szintjének emelkedése virális szívizomgyulladásban is. Akut szívelégtelenség során csak a miR-499 mennyisége emelkedett meg szignifikánsan, míg a diasztolés diszfunkciós minták esetében nem találtak szignifikáns eltérést [114].

Az abdominális aortaaneurizma egy potenciálisan életveszélyes megbetegedés, amely igen sokáig tünetmentes lehet. Biros és munkatársai 124 mikro-RNS expressziós szintjét nézték meg 10 beteg szövetmintáiban, akik aneurizmaműtéten estek át. Vizsgálták a dilatált régió szövetét és az azt körbevevő ép régiókat is, valamint elemezték a vérszérumot is, melyet egészséges személyek korban és nemben korrigált csoportjának szérumával hasonlítottak össze. Hat beteg mintáit vizsgálva, eredményeik alapján az aneurizmatest és az azt körülvevő ép szövet esetében 7 mikro-RNS mennyisége nőtt legalább kétszeresére, ezek közül a miR-155 szintje emelkedett legnagyobb – 11-szeres – mértékben. Ezt az eredményt kvantitatív valós idejű PCR-rel validálták. A megfigyelés az egészséges és a beteg személyek szérumát összehasonlítva is kimutatható volt: a miR-155 itt is emelkedett értéket mutatott, bár ez a különbség statisztikailag nem bizo-

nyult szignifikánsnak. Megállapították továbbá, hogy az aneurizmás szövetben a T limfociták akkumulálódnak és két olyan, az immunrendszer működésében fontos miR-155 célgént (*CTLA4*, *SMAD2*) is kimutattak, amelyek expressziója jelentősen csökkent az aneurizmaszövetben az egészséges aortaszövethez képest [115].

2014 elején jelent meg az első közlemény, amely akut hasnyálmirigygyulladás során követte a mikro-RNS szintek alakulását, azzal a céllal, hogy esetlegesen új biomarkereket sikerüljön azonosítani a diagnosztikai készlet bővítésére, specificitásának növelésére. Blenkiron és munkatársai első körben taurokoláttal indukált heveny hasnyálmirigygyulladásos patkányok vérében és mezenterialis nyirokcsomóiban mérhető mikro-RNS szinteket hasonlították össze egészséges patkányok mintáival. A 85 detektálható mikro-RNS közül hét szintje szignifikánsan emelkedett a beteg állatokban, és figyelemre méltó, hogy a változás mértéke arányban állt a betegség súlyosságával. Az ezt követő klinikai vizsgálatban akut hasnyálmirigygyulladásban szenvedő betegek szérumát hasonlították össze egészséges önkéntesek szérumával és a patkányban kimutatott hét mikro-RNS közül egy – a miR-216a – változása megfigyelhető volt, így ezen miRNS elemzése a jövőben új diagnosztikai markerként merülhet fel [116].

További érdekesség, hogy a miR-122 ellen adott gátlószer csökkentette a hepatitis C vírus-RNS mennyiségét, míg a miR-208 egy modulátora hatékonynak tűnt a kardiális hipertrófia ellen [117].

Számos tanulmány foglalkozik különböző ráktípusokhoz asszociálható specifikus mikro-RNS plazmaszint változásokkal, azonban mindezidáig a különböző munkacsoportok eredményei kevés átfedést mutatnak, és a kapott megfigyeléseket nehezen tudják reprodukálni.

A mellrák esetében azért is sürgető egy megbízhatóan mérhető marker megtalálása, mert a jelenleg szűrésre alkalmazott mammográfia specificitása túl alacsony, így nagyon magas a hamis pozitív eredmények száma, ami számos szükségtelen biopsziát eredményez [118]. Az ideális markernek a korai detektálás mellett előnye lenne, hogy általa követni lehetne a terápia előremenetelét és prognosztikai faktorként is szolgálna a várható túléléssel kapcsolatban. 2013 tavaszán jelent meg egy áttekintő cikk, amely 15 korábbi tanulmányt hasonlított össze szisztematikusan, majd a kutatócsoport már ezen ismeretek figyelembevételével tervezte meg kísérletét. A tanulmányok összehasonlítása rámutatott arra, hogy a korábbi kísérletek alapvetően különböztek egymástól, többek

között a kiválasztott minták tekintetében vagy az alkalmazott technikákat illetően. Ezek a kutatások 10 előre kiválasztott kandidáns mikro-RNS-t vizsgáltak, ezek közül kettő, a miR-21 és miR-155 szintjének azonos irányú változását sikerült legalább két kutatásnak egybehangzóan megállapítania. Ezen kísérletek egyik legnagyobb technikai buktatója az endogén normalizálás hiánya volt egy konstans szinten kifejeződő mikro-RNS-re (az mRNS-es mérésnél megszokott „háztartási gének” méréshez hasonlóan). Legtöbb esetben a miR-16-ot alkalmazták belső kontrollként, ami azonban nem tökéletesen alkalmas normalizálásra, mivel elsősorban vörösvértestekből származik, ezért például a vérminták előkészítésekor a vörösvértestek tönkremenetele folytán akár 30-szorosára is megnőhet a miR-16 szintje a szérumban [119]. Öt tanulmányban végeztek hipotézis mentes teljes genom szintű mikro-RNS mérést, de ezeknek az eredményei is kevésbé voltak egymással összehozhatóak, és nem volt egybehangzó eredmény a kandidáns mikro-RNS-eket vizsgáló tanulmányok és a genom szintű elemzések eredményei között sem. A kandidáns vizsgálat alapján ígéretesnek tűnő miR-21 és miR-155 szintjeinek emelkedése a genomszintű elemzésekben ellentétes irányú változást mutatott.

Míndezek után Leidner és munkatársai 20 mammográfiával ellenőrzött egészséges kontrollszemély, 20 mellrákos személy, 20 műtéti rezekcióval kezelt mellrákos személy és 10 egyéb rákos megbetegedésben szenvedő beteg vérmintáját hasonlította össze. 46 mikro-RNS-t detektáltak, amelyeknek szignifikánsan megváltozott az expressziója az egészségesekéhez képest, de csak 3 olyan mikro-RNS-t (miR-708*, miR-92b*, miR-568) találtak, melyek vérplazma-szintje normalizálódott a rezekciót követően, és nem mutatott emelkedett értéket egyéb rákos megbetegedés esetében – így alkalmazhatósága az emlőrák specifikus biomarkereként felmerül.

5.6 A mikro-RNS-ek működését érintő genetikai variánsok

A mikro-RNS-ek által létrejövő transzláció-szabályozás egy igen összetett rendszer. Nem csupán egy mikro-RNS kötődhet be számos célgén mRNS-ének 3' nem transzlálódó régiójához, hanem ugyanahhoz a régióhoz is egymással akár átfedve számos mikro-RNS kapcsolódhat, továbbá ezen mikro-RNS-ek megjelenése időben is eltér egy-egy sejt élete során. Érdekes módon a mikro-RNS-eket kódoló génekben mindaddig összesen 20 SNP-t írtak le, ugyanakkor a mikro-RNS-ek célszekvenciáiban több száz-

ezer SNP ismert már, azonban ezen polimorfizmusoknak kevesebb, mint 1%-ánál bizonyított kísérletesen, hogy ezek a mikro-RNS biológiai hatását valóban befolyásolják [110].

2014 elején jelent meg az a cikk, amely kilenc olyan SNP vizsgálatáról számol be, amelyek a pre- vagy pri-mikro-RNS-ben fejeződnek ki. A kutatócsoport ezeket a polimorfizmusokat, a rákos megbetegedések lehetséges rizikófaktoraként vizsgálta. Ehhez nagyméretű eset-kontroll elemzések eredményeit dolgozták fel, és egy új statisztikai módszert, a Cross phenotype meta-analízis programot (CPMA) használtak, amelynek alkalmazásával számos fenotípus együttesen elemezhető. Eredményeik alapján az rs2910164, az rs2043556, az rs6505162 és az rs895819 SNP-k különböző rákos megbetegségben magasabb gyakorisággal fordulnak elő [120].

Munkacsoportunk más gének 3' UTR szakaszában elhelyezkedő SNP-ket is vizsgált a jelen dolgozatban bemutatott SNAP-25 variánsokon kívül. A wolframint kódoló *WFS1* gén egészét lefedve 17 polimorfizmust elemeztünk 801 egészséges felnőtt ember személyiségstílusával összefüggésben. Az rs1046322 A allélja szignifikáns asszociációt mutatott az agresszió mértékével, ezen polimorfizmus a *WFS1* gén 3' UTR régiójában helyezkedik el és funkcionális vizsgálataink igazolták, hogy befolyásolja a miR-668 kötődésének hatékonyságát, ezáltal befolyással lehet a keletkező fehérje mennyiségére [121].

6 Következtetések

A mindennapi életben oly gyakori egészségügyi panaszok, mint például a magas vérnyomás, az időskori cukorbetegség, vagy a jelen kutatáshoz is kapcsolódó pszichiátriai megbetegedések annak ellenére, hogy gyakran családi halmozódást mutatnak, mégsem egyetlen gén megváltozott működésének következményeként alakulnak ki, hanem számos, önállóan csak kis hatással bíró genetikai variáns és a legkülönbélebb környezeti hatások összességéeként. Ezen komplex jellegek és megbetegedések genetikai hátterének a felderítése mind a megelőzés, mind a hatékonyabb – akár személyre szabott – terápia szempontjából kimagasló fontosságú.

Az általunk vizsgált *SNAP-25* gén jól példázza azt a nem ritka esetet, hogy egy gén ill. fehérje variabilitása nem csak az adott régióban található polimorfizmusokkal (rendszerint SNP-ek), hanem a különböző transzkripciós izoformákkal is magyarázható. Ezek analízise akár a diagnosztikában is alkalmazható: az egyes variánsok ill. azok szintjének megváltozása különböző patofiziológiai folyamatok biomarkere lehet. A transzkripciós izoformák illetve egy gén kifejeződésének meghatározása rámutathat arra is, hogy egy fehérje több funkcióval rendelkezik, mint azt korábban gondoltuk: nem zárható ki, hogy a *SNAP-25* a központi idegrendszeren kívül a hasnyálmirigy szekretoros funkciójában is döntő szerepet játszik. A fehérje optimális mennyisége szintén döntő szerepű: egyre több adat bizonyítja a mikro-RNS-ek által történő szabályozás fontosságát, ami – méréseink alapján – a *SNAP-25* fehérje esetében is hozzájárul a transláció finomhangolásához. Mindezek tükrében elmondható, hogy a monogénes kórképekhez hasonló módon a genotípus és a fenotípus közötti egyértelmű kapcsolat a komplex jellegek esetében korántsem határozható meg, mégis a háttérben álló egy-egy komponens felderítése hasznos tudást jelenthet nem csak elméleti, hanem klinikai szempontból is a megelőzés, a diagnosztika és a hatékony, oki kezelés terén.

7 Összefoglalás

A SNAP-25 a központi idegrendszer egyik kulcsfontosságú molekulája, alapvető szerepet játszik a neuronok között létrejövő kommunikációban. A gén polimorf variánsai így számos neuropszichiátriai kórkép genetikai rizikófaktoraként merültek fel az elmúlt évek során.

A SNAP-25 két transzkripciós variánssal rendelkezik. Az izoformák mennyiségi vizsgálatára két, egymástól független módszert dolgoztunk ki. Az egyik eljárás hagyományos PCR és izoforma specifikus restrikciós endonukleázok alkalmazásán alapult. A másik módszer során az egyes variánsokat szelektíven amplifikáló primerpárokat alkalmaztunk valós idejű PCR-rel kombinálva. Ezen technikák alkalmazásával 10 humán szövetben mértük meg a transzkripciós variánsok szintjét és egymáshoz viszonyított arányát. Megállapítottuk, hogy a SNAP-25 mindkét izoformája mind a 10 humán szövetben kimutatható, bár mennyiségük az idegrendszeri eredetű szövetekben és a hasnyálmirigyben átlagosan két nagyságrenddel magasabb. Míg az idegrendszeri eredetű szövetekben a *b* izoforma volt a domináns, addig az idegrendszeren kívüli területeken az *a* izoforma fordult elő nagyobb mennyiségben.

Bár a SNAP-25 gén polimorfizmusait számos pszichiátriai rendellenesség genetikai rizikófaktoraként elemezték, nem vizsgálták még ezen variánsok összefüggését egészséges személyek pszichológiai és kognitív funkcióival. Asszociáció elemzéseinkhez a SNAP-25 gén szabályozó régióiban található 4 SNP-t választottuk ki. Ezek genotípusait valamint haplotípusait elemeztük egészséges populációban ($N = 910$) PCR technikák segítségével. Eredményeink alapján szignifikáns összefüggést mutattunk ki a 3' szabályozó régióban elhelyezkedő két SNP (rs3746544–rs1051312) haplotípusai és a résztvevők impulzivitás endofenotípusa között: a T–T haplotípussal rendelkező személyek szignifikánsan alacsonyabb összpontszámot értek el a Barratt-féle impulzivitás skálán az ezen haplotípussal nem rendelkező személyekhez képest. Vizsgáltuk a két SNP funkcionális hatását is, mivel *in silico* elemzések rámutattak arra, hogy a két polimorfizmus a miR-668 feltételezett kötőhelyében helyezkedik el. Luciferáz riporter rendszer alkalmazásával megállapítottuk, hogy a miR-668 valóban bekötődik a SNAP-25 3' nem transzlálódó régiójához. Ez a kölcsönhatás a T–T haplotípus esetén bizonyult a leghatékonyabbnak, míg a kötőhelyben az SNP-k következtében kialakuló 1 illetve 2 nukleotidot érintő változás a gátló hatás csökkentését eredményezte.

8 Summary

SNAP-25 is an essential molecule of the central nervous system, it plays a crucial role in the communication of neural cells. Consequently polymorphic variants of the gene have recently been suggested as putative genetic risk factors of different neuropsychiatric disorders.

SNAP-25 possesses two transcriptional variants. Two independent methods have been elaborated for the quantitative analysis of these isoforms. One employs traditional PCR together with restriction endonucleases specific for the two isoforms. The other approach is based on the application of primer pairs that amplify the two variants specifically in combination with real-time PCR. These techniques were used to determine the level and ratio of the transcriptional variants in 10 human tissues. It was observed that both isoforms of SNAP-25 can be detected in each tissue, however their level was higher about two orders of magnitude in the neural tissues and in the pancreas. Moreover the *b* isoform was dominant in the central nervous system, whereas the concentration of the *a* variant was higher in peripheral tissues.

Although polymorphisms of the *SNAP-25* gene have been analyzed as putative risk factors of numerous psychiatric disorders, connection of these variants with psychological and cognitive functions in healthy subjects has not yet been investigated. 4 SNPs have been selected for association analysis in the regulatory regions of the *SNAP-25* gene. Genotype and haplotype analysis was carried out in a healthy population ($N = 910$) using PCR-based techniques. Significant association was demonstrated between the haplotypes of the SNPs rs3746544–rs1051312 located in the 3' regulatory region and impulsivity endophenotype: participants possessing the T–T haplotype obtained significantly lower scores at the Barratt Impulsivity Scale compared to subjects lacking this haplotype. In silico analyses demonstrated that the two SNPs are located in the putative binding site of miR-668, thus functional effect of the polymorphisms have also been studied. Luciferase reporter assay was applied and it was shown that miR-668 can bind to the 3' untranslated region of SNAP-25. This interaction was most efficient in the presence of the T–T haplotype, whereas allelic variants causing 1 or 2 nucleotide changes in the binding site resulted in a decreased inhibitory effect.

9 Irodalomjegyzék

1. Temple G, Gerhard DS, Rasooly R, Feingold EA, Good PJ, Robinson C, Mandich A, Derge JG, Lewis J, Shoaf D, Collins FS, Jang W, Wagner L, Shenmen CM, Misquitta L, Schaefer CF, Buetow KH, Bonner TI, Yankie L, Ward M, Phan L, Astashyn A, Brown G, Farrell C, Hart J, Landrum M, Maidak BL, Murphy M, Murphy T, Rajput B, Riddick L, Webb D, Weber J, Wu W, Pruitt KD, Maglott D, Siepel A, Brejova B, Diekhans M, Harte R, Baertsch R, Kent J, Haussler D, Brent M, Langton L, Comstock CL, Stevens M, Wei C, van Baren MJ, Salehi-Ashtiani K, Murray RR, Ghamsari L, Mello E, Lin C, Pennacchio C, Schreiber K, Shapiro N, Marsh A, Pardes E, Moore T, Lebeau A, Muratet M, Simmons B, Kloske D, Sieja S, Hudson J, Sethupathy P, Brownstein M, Bhat N, Lazar J, Jacob H, Gruber CE, Smith MR, McPherson J, Garcia AM, Gunaratne PH, Wu J, Muzny D, Gibbs RA, Young AC, Bouffard GG, Blakesley RW, Mullikin J, Green ED, Dickson MC, Rodriguez AC, Grimwood J, Schmutz J, Myers RM, Hirst M, Zeng T, Tse K, Moksa M, Deng M, Ma K, Mah D, Pang J, Taylor G, Chuah E, Deng A, Fichter K, Go A, Lee S, Wang J, Griffith M, Morin R, Moore RA, Mayo M, Munro S, Wagner S, Jones SJ, Holt RA, Marra MA, Lu S, Yang S, Hartigan J, Graf M, Wagner R, Letovksy S, Pulido JC, Robison K, Esposito D, Hartley J, Wall VE, Hopkins RF, Ohara O, Wiemann S. (2009) The completion of the Mammalian Gene Collection (MGC). *Genome Res*, 19:2324-2333.
2. Oyler GA, Higgins GA, Hart RA, Battenberg E, Billingsley M, Bloom FE, Wilson MC. (1989) The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *J Cell Biol*, 109:3039-3052.
3. 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*, 12:2865-2874.
4. Bark IC, Hahn KM, Ryabinin AE, Wilson MC. (1995) Differential expression of SNAP-25 protein isoforms during divergent vesicle fusion events of neural development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92:1510-1514.

5. Johansson JU, Ericsson J, Janson J, Beraki S, Stanic D, Mandic SA, Wikstrom MA, Hokfelt T, Ogren SO, Rozell B, Berggren PO, Bark C. (2008) An ancient duplication of exon 5 in the Snap25 gene is required for complex neuronal development/function. *PLoS Genet*, 4:e1000278.
6. Yamamori S, Itakura M, Sugaya D, Katsumata O, Sakagami H, Takahashi M. (2011) Differential expression of SNAP-25 family proteins in the mouse brain. *J Comp Neurol*, 519:916-932.
7. Sollner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE. (1993) SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*, 362:318-324.
8. Dellinger B, Felling R, Ordway RW. (2000) Genetic modifiers of the *Drosophila* NSF mutant, comatose, include a temperature-sensitive paralytic allele of the calcium channel alpha1-subunit gene, cacophony. *Genetics*, 155:203-211.
9. Thompson CR, Bretscher MS. (2002) Cell polarity and locomotion, as well as endocytosis, depend on NSF. *Development*, 129:4185-4192.
10. Ramakrishnan NA, Drescher MJ, Drescher DG. (2012) The SNARE complex in neuronal and sensory cells. *Mol Cell Neurosci*, 50:58-69.
11. Pantano S, Montecucco C. (2014) The blockade of the neurotransmitter release apparatus by botulinum neurotoxins. *Cell Mol Life Sci*, 71:793-811.
12. Suh YH, Yoshimoto-Furusawa A, Weih KA, Tessarollo L, Roche KW, Mackem S, Roche PA. (2011) Deletion of SNAP-23 results in pre-implantation embryonic lethality in mice. *PLoS One*, 6:e18444.
13. Suh YH, Terashima A, Petralia RS, Wenthold RJ, Isaac JT, Roche KW, Roche PA. (2010) A neuronal role for SNAP-23 in postsynaptic glutamate receptor trafficking. *Nat Neurosci*, 13:338-343.
14. Sakurai C, Hashimoto H, Nakanishi H, Arai S, Wada Y, Sun-Wada GH, Wada I, Hatsuzawa K. (2012) SNAP-23 regulates phagosome formation and maturation in macrophages. *Mol Biol Cell*, 23:4849-4863.
15. Bostrom P, Andersson L, Vind B, Haversen L, Rutberg M, Wickstrom Y, Larsson E, Jansson PA, Svensson MK, Branemark R, Ling C, Beck-Nielsen H, Boren J, Hojlund K, Olofsson SO. (2010) The SNARE protein SNAP23 and the SNARE-interacting protein Munc18c in human skeletal muscle are implicated in insulin resistance/type 2 diabetes. *Diabetes*, 59:1870-1878.

16. Nakagomi D, Suzuki K, Nakajima H. (2012) Critical roles of I κ B kinase subunits in mast cell degranulation. *Int Arch Allergy Immunol*, 158 Suppl 1:92-95.
17. Uriarte SM, Rane MJ, Luerman GC, Barati MT, Ward RA, Nauseef WM, McLeish KR. (2011) Granule exocytosis contributes to priming and activation of the human neutrophil respiratory burst. *J Immunol*, 187:391-400.
18. Bai J, Tang L, Loma-Neira J, Chen Y, McLeish KR, Uriarte SM, Chung CS, Ayala A. (2014) TAT-SNAP-23 treatment inhibits the priming of neutrophil functions contributing to shock and/or sepsis-induced extra-pulmonary acute lung injury. *Innate Immun*. 21: 42-54
19. Saito T, Guan F, Papolos DF, Rajouria N, Fann CS, Lachman HM. (2001) Polymorphism in SNAP29 gene promoter region associated with schizophrenia. *Mol Psychiatry*, 6:193-201.
20. Wonodi I, Hong LE, Avila MT, Buchanan RW, Carpenter WT, Jr., Stine OC, Mitchell BD, Thaker GK. (2005) Association between polymorphism of the SNAP29 gene promoter region and schizophrenia. *Schizophr Res*, 78:339-341.
21. Holt M, Varoquaux F, Wiederhold K, Takamori S, Urlaub H, Fasshauer D, Jahn R. (2006) Identification of SNAP-47, a novel Qbc-SNARE with ubiquitous expression. *J Biol Chem*, 281:17076-17083.
22. Jurado S, Goswami D, Zhang Y, Molina AJ, Sudhof TC, Malenka RC. (2013) LTP requires a unique postsynaptic SNARE fusion machinery. *Neuron*, 77:542-558.
23. Kieseppa T, Partonen T, Haukka J, Kaprio J, Lonnqvist J. (2004) High concordance of bipolar I disorder in a nationwide sample of twins. *Am J Psychiatry*, 161:1814-1821.
24. Bohm HV, Stewart MG. (2009) Brief report: on the concordance percentages for Autistic Spectrum Disorder of twins. *J Autism Dev Disord*, 39:806-808.
25. Adam D. (2001) Genetics group targets disease markers in the human sequence. *Nature*, 412:105.
26. Gottesman, II, Shields J. (1967) A polygenic theory of schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 58:199-205.
27. Gottesman, II, Gould TD. (2003) The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *Am J Psychiatry*, 160:636-645.

28. Burmeister M, McInnis MG, Zollner S. (2008) Psychiatric genetics: progress amid controversy. *Nat Rev Genet*, 9:527-540.
29. Gottesman, II, Shields J. (1973) Genetic theorizing and schizophrenia. *Br J Psychiatry*, 122:15-30.
30. Nigg JT. (2001) Is ADHD a disinhibitory disorder? *Psychol Bull*, 127:571-598.
31. Coffey SF, Schumacher JA, Baschnagel JS, Hawk LW, Holloman G. (2011) Impulsivity and risk-taking in borderline personality disorder with and without substance use disorders. *Personal Disord*, 2:128-141.
32. Henry C, Mitropoulou V, New AS, Koenigsberg HW, Silverman J, Siever LJ. (2001) Affective instability and impulsivity in borderline personality and bipolar II disorders: similarities and differences. *J Psychiatr Res*, 35:307-312.
33. Alcorn JL, 3rd, Gowin JL, Green CE, Swann AC, Moeller FG, Lane SD. (2013) Aggression, impulsivity, and psychopathic traits in combined antisocial personality disorder and substance use disorder. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 25:229-232.
34. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75:843-854.
35. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. (2000) The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403:901-906.
36. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. (2010) The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*, 11:597-610.
37. Okamura K, Phillips MD, Tyler DM, Duan H, Chou YT, Lai EC. (2008) The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. *Nat Struct Mol Biol*, 15:354-363.
38. Huntzinger E, Izaurralde E. (2011) Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet*, 12:99-110.
39. Yekta S, Shih IH, Bartel DP. (2004) MicroRNA-directed cleavage of *HOXB8* mRNA. *Science*, 304:594-596.
40. Pasquinelli AE. (2012) MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet*, 13:271-282.

41. Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, Grocock RJ, Van Dongen S, Inoue K, Enright AJ, Schier AF. (2006) Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science*, 312:75-79.
42. Braun JE, Huntzinger E, Fauser M, Izaurralde E. (2011) GW182 proteins directly recruit cytoplasmic deadenylase complexes to miRNA targets. *Mol Cell*, 44:120-133.
43. Bartel DP. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136:215-233.
44. Vella MC, Choi EY, Lin SY, Reinert K, Slack FJ. (2004) The *C. elegans* microRNA let-7 binds to imperfect let-7 complementary sites from the lin-41 3'UTR. *Genes Dev*, 18:132-137.
45. Shin C, Nam JW, Farh KK, Chiang HR, Shkumatava A, Bartel DP. (2010) Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing. *Mol Cell*, 38:789-802.
46. Ameres SL, Horwich MD, Hung JH, Xu J, Ghildiyal M, Weng Z, Zamore PD. (2010) Target RNA-directed trimming and tailing of small silencing RNAs. *Science*, 328:1534-1539.
47. Kai ZS, Pasquinelli AE. (2010) MicroRNA assassins: factors that regulate the disappearance of miRNAs. *Nat Struct Mol Biol*, 17:5-10.
48. Diederichs S, Haber DA. (2007) Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell*, 131:1097-1108.
49. Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC. (2001) Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, 106:23-34.
50. Chatterjee S, Grosshans H. (2009) Active turnover modulates mature microRNA activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 461:546-549.
51. Chatterjee S, Fasler M, Bussing I, Grosshans H. (2011) Target-mediated protection of endogenous microRNAs in *C. elegans*. *Dev Cell*, 20:388-396.
52. Rybak A, Fuchs H, Hadian K, Smirnova L, Wulczyn EA, Michel G, Nitsch R, Krappmann D, Wulczyn FG. (2009) The let-7 target gene mouse lin-41 is a stem

- cell specific E3 ubiquitin ligase for the miRNA pathway protein Ago2. *Nat Cell Biol*, 11:1411-1420.
53. Qi HH, Ongusaha PP, Myllyharju J, Cheng D, Pakkanen O, Shi Y, Lee SW, Peng J. (2008) Prolyl 4-hydroxylation regulates Argonaute 2 stability. *Nature*, 455:421-424.
 54. Wu C, So J, Davis-Dusenbery BN, Qi HH, Bloch DB, Shi Y, Lagna G, Hata A. (2011) Hypoxia potentiates microRNA-mediated gene silencing through posttranslational modification of Argonaute2. *Mol Cell Biol*, 31:4760-4774.
 55. Meisner NC, Filipowicz W. (2010) Properties of the regulatory RNA-binding protein HuR and its role in controlling miRNA repression. *Adv Exp Med Biol*, 700:106-123.
 56. Kedde M, Strasser MJ, Boldajipour B, Oude Vrielink JA, Slanchev K, le Sage C, Nagel R, Voorhoeve PM, van Duijse J, Orom UA, Lund AH, Perrakis A, Raz E, Agami R. (2007) RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell*, 131:1273-1286.
 57. Salmena L, Poliseno L, Tay Y, Kats L, Pandolfi PP. (2011) A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? *Cell*, 146:353-358.
 58. Hiard S, Charlier C, Coppieeters W, Georges M, Baurain D. (2010) Patrocles: a database of polymorphic miRNA-mediated gene regulation in vertebrates. *Nucleic Acids Res*, 38:D640-651.
 59. Alexiou P, Vergoulis T, Gleditzsch M, Prekas G, Dalamagas T, Megraw M, Grosse I, Sellis T, Hatzigeorgiou AG. (2010) miRGen 2.0: a database of microRNA genomic information and regulation. *Nucleic Acids Res*, 38:137-141.
 60. Min H, Yoon S. (2010) Got target? Computational methods for microRNA target prediction and their extension. *Exp Mol Med*, 42:233-244.
 61. Cazalla D, Yario T, Steitz JA. (2010) Down-regulation of a host microRNA by a Herpesvirus saimiri noncoding RNA. *Science*, 328:1563-1566.
 62. Chi SW, Zang JB, Mele A, Darnell RB. (2009) Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. *Nature*, 460:479-486.
 63. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15

- and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99:15524-15529.
64. Chim SS, Shing TK, Hung EC, Leung TY, Lau TK, Chiu RW, Lo YM. (2008) Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem*, 54:482-490.
 65. Ji X, Takahashi R, Hiura Y, Hirokawa G, Fukushima Y, Iwai N. (2009) Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury. *Clin Chem*, 55:1944-1949.
 66. Montgomery RL, Hullinger TG, Semus HM, Dickinson BA, Seto AG, Lynch JM, Stack C, Latimer PA, Olson EN, van Rooij E. (2011) Therapeutic inhibition of miR-208a improves cardiac function and survival during heart failure. *Circulation*, 124:1537-1547.
 67. Stenvang J, Petri A, Lindow M, Obad S, Kauppinen S. (2012) Inhibition of microRNA function by antimiR oligonucleotides. *Silence*, 3:1.
 68. Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliansky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JT, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J, Engelhardt S. (2008) MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature*, 456:980-984.
 69. Ma L, Reinhardt F, Pan E, Soutschek J, Bhat B, Marcusson EG, Teruya-Feldstein J, Bell GW, Weinberg RA. (2010) Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model. *Nat Biotechnol*, 28:341-347.
 70. Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, Persson R, Lindow M, Munk ME, Kauppinen S, Orum H. (2010) Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science*, 327:198-201.
 71. Adeghate E, Schattner P, Dunn E. (2006) An update on the etiology and epidemiology of diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci*, 1084:1-29.
 72. Aitman TJ, Dong R, Vyse TJ, Norsworthy PJ, Johnson MD, Smith J, Mangion J, Robertson-Lowe C, Marshall AJ, Petretto E, Hodges MD, Bhangal G, Patel SG, Sheehan-Rooney K, Duda M, Cook PR, Evans DJ, Domin J, Flint J, Boyle JJ, Pusey CD, Cook HT. (2006) Copy number polymorphism in *Fcgr3* predisposes to glomerulonephritis in rats and humans. *Nature*, 439:851-855.

73. Congdon E, Canli T. (2008) A neurogenetic approach to impulsivity. *J Pers*, 76:1447-1484.
74. Patton JH, Stanford MS, Barratt ES. (1995) Factor structure of the Barratt impulsiveness scale. *J Clin Psychol*, 51:768-774.
75. Varga G, Szekely A, Sasvari-Szekely M. (2011) Candidate gene studies of dopaminergic and serotonergic polymorphisms. *Neuropsychopharmacol Hung*, 13:93-101.
76. 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*, 5:405-409.
77. Mill J, Richards S, Knight J, Curran S, Taylor E, Asherson P. (2004) Haplotype analysis of SNAP-25 suggests a role in the aetiology of ADHD. *Mol Psychiatry*, 9:801-810.
78. Feng Y, Crosbie J, Wigg K, Pathare T, Ickowicz A, Schachar R, Tannock R, Roberts W, Malone M, Swanson J, Kennedy JL, Barr CL. (2005) The SNAP25 gene as a susceptibility gene contributing to attention-deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry*, 10:998-1005.
79. 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:781-790.
80. Kovacs-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*, 32:2013-2020.
81. Woodard GE, Salido GM, Rosado JA. (2008) Enhanced exocytotic-like insertion of Orail into the plasma membrane upon intracellular Ca²⁺ store depletion. *American journal of physiology Cell physiology*, 294:C1323-1331.
82. Wang ET, Sandberg R, Luo S, Khrebtukova I, Zhang L, Mayr C, Kingsmore SF, Schroth GP, Burge CB. (2008) Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*, 456:470-476.

83. Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ. (2008) Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet*, 40:1413-1415.
84. Sette C. (2013) Alternative splicing programs in prostate cancer. *Int J Cell Biol*, 2013:458727.
85. Fan X, Tang L. (2013) Aberrant and alternative splicing in skeletal system disease. *Gene*, 528:21-26.
86. Shinde AV, Bystroff C, Wang C, Vogelezang MG, Vincent PA, Hynes RO, Van De Water L. (2008) Identification of the peptide sequences within the EIIIA (EDA) segment of fibronectin that mediate integrin alpha9beta1-dependent cellular activities. *J Biol Chem*, 283:2858-2870.
87. Zhang C, Li HR, Fan JB, Wang-Rodriguez J, Downs T, Fu XD, Zhang MQ. (2006) Profiling alternatively spliced mRNA isoforms for prostate cancer classification. *BMC bioinformatics*, 7:202.
88. Lipscombe D, Andrade A, Allen SE. (2013) Alternative splicing: functional diversity among voltage-gated calcium channels and behavioral consequences. *Biochim Biophys Acta*, 1828:1522-1529.
89. Corradini I, Donzelli A, Antonucci F, Welzl H, Loos M, Martucci R, De Astis S, Pattini L, Inverardi F, Wolfer D, Caleo M, Bozzi Y, Verderio C, Frassoni C, Braida D, Clerici M, Lipp HP, Sala M, Matteoli M. (2014) Epileptiform activity and cognitive deficits in SNAP-25(+/-) mice are normalized by antiepileptic drugs. *Cereb Cortex*, 24:364-376.
90. Sommer JU, Schmitt A, Heck M, Schaeffer EL, Fendt M, Zink M, Nieselt K, Symons S, Petroianu G, Lex A, Herrera-Marschitz M, Spanagel R, Falkai P, Gebicke-Haerter PJ. (2010) Differential expression of presynaptic genes in a rat model of postnatal hypoxia: relevance to schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 260 Suppl 2:S81-89.
91. Etain B, Dumaine A, Mathieu F, Chevalier F, Henry C, Kahn JP, Deshommes J, Bellivier F, Leboyer M, Jamain S. (2010) A SNAP25 promoter variant is associated with early-onset bipolar disorder and a high expression level in brain. *Mol Psychiatry*, 15:748-755.
92. Furuya TK, Silva PN, Payao SL, Bertolucci PH, Rasmussen LT, De Labio RW, Braga IL, Chen ES, Turecki G, Mechawar N, Mill J, Smith MA. (2012) Analysis

- of SNAP25 mRNA expression and promoter DNA methylation in brain areas of Alzheimer's Disease patients. *Neuroscience*, 220:41-46.
93. Garcia-Reitböck P, Anichtchik O, Bellucci A, Iovino M, Ballini C, Fineberg E, Ghetti B, Della Corte L, Spano P, Tofaris GK, Goedert M, Spillantini MG. (2010) SNARE protein redistribution and synaptic failure in a transgenic mouse model of Parkinson's disease. *Brain*, 133:2032-2044.
 94. Gray LJ, Dean B, Kronsbein HC, Robinson PJ, Scarr E. (2010) Region and diagnosis-specific changes in synaptic proteins in schizophrenia and bipolar I disorder. *Psychiat Res*, 178:374-380.
 95. Fleischmann A. (2011) Suicide Prevention SUPRE. *WHO*, 53:1-18
 96. Watkins HB, Meyer TD. (2013) Is there an empirical link between impulsivity and suicidality in bipolar disorders? A review of the current literature and the potential psychological implications of the relationship. *Bipolar Disord*, 15:542-558.
 97. Plichta MM, Scheres A. (2014) Ventral-striatal responsiveness during reward anticipation in ADHD and its relation to trait impulsivity in the healthy population: a meta-analytic review of the fMRI literature. *Neurosci Biobehav Rev*, 38:125-134.
 98. 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*, 5:405-409.
 99. Kustanovich V, Merriman B, McGough J, McCracken JT, Smalley SL, Nelson SF. (2003) Biased paternal transmission of SNAP-25 risk alleles in attention-deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry*, 8:309-315.
 100. 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*, 7:913-917.
 101. Gizer IR, Ficks C, Waldman ID. (2009) Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet*, 126:51-90.
 102. Lesch KP, Timmesfeld N, Renner TJ, Halperin R, Roser C, Nguyen TT, Craig DW, Romanos J, Heine M, Meyer J, Freitag C, Warnke A, Romanos M, Schafer

- H, Walitza S, Reif A, Stephan DA, Jacob C. (2008) Molecular genetics of adult ADHD: converging evidence from genome-wide association and extended pedigree linkage studies. *J Neural Transm*, 115:1573-1585.
103. Neale BM, Medland S, Ripke S, Anney RJ, Asherson P, Buitelaar J, Franke B, Gill M, Kent L, Holmans P, Middleton F, Thapar A, Lesch KP, Faraone SV, Daly M, Nguyen TT, Schafer H, Steinhausen HC, Reif A, Renner TJ, Romanos M, Romanos J, Warnke A, Walitza S, Freitag C, Meyer J, Palmason H, Rothenberger A, Hawi Z, Sergeant J, Roeyers H, Mick E, Biederman J, Group IIC. (2010) Case-control genome-wide association study of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 49:906-920.
104. Hinney A, Scherag A, Jarick I, Albayrak O, Putter C, Pechlivanis S, Dauvermann MR, Beck S, Weber H, Scherag S, Nguyen TT, Volckmar AL, Knoll N, Faraone SV, Neale BM, Franke B, Cichon S, Hoffmann P, Nothen MM, Schreiber S, Jockel KH, Wichmann HE, Freitag C, Lempp T, Meyer J, Gilsbach S, Herpertz-Dahlmann B, Sinzig J, Lehmkuhl G, Renner TJ, Warnke A, Romanos M, Lesch KP, Reif A, Schimmelmann BG, Hebebrand J, Psychiatric GCAs. (2011) Genome-wide association study in German patients with attention deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet Part B, Neuropsychiatr Genet*, 156B:888-897.
105. Stergiakouli E, Hamshere M, Holmans P, Langley K, Zaharieva I, de CG, Psychiatric GC, Hawi Z, Kent L, Gill M, Williams N, Owen MJ, O'Donovan M, Thapar A. (2012) Investigating the contribution of common genetic variants to the risk and pathogenesis of ADHD. *Am J Psychiatry*, 169:186-194.
106. Neale BM, Medland SE, Ripke S, Asherson P, Franke B, Lesch KP, Faraone SV, Nguyen TT, Schafer H, Holmans P, Daly M, Steinhausen HC, Freitag C, Reif A, Renner TJ, Romanos M, Romanos J, Walitza S, Warnke A, Meyer J, Palmason H, Buitelaar J, Vasquez AA, Lambregts-Rommelse N, Gill M, Anney RJ, Langley K, O'Donovan M, Williams N, Owen M, Thapar A, Kent L, Sergeant J, Roeyers H, Mick E, Biederman J, Doyle A, Smalley S, Loo S, Hakonarson H, Elia J, Todorov A, Miranda A, Mulas F, Ebstein RP, Rothenberger A, Banaschewski T, Oades RD, Sonuga-Barke E, McGough J, Nisenbaum L, Middleton F, Hu X, Nelson S. (2010) Meta-analysis of genome-wide association

- studies of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 49:884-897.
107. Basoglu C, Oner O, Ates A, Algul A, Bez Y, Cetin M, Herken H, Erdal ME, Munir KM. (2011) Synaptosomal-associated protein 25 gene polymorphisms and antisocial personality disorder: association with temperament and psychopathy. *Can J Psychiatry*, 56:341-347.
 108. Jeans AF, Oliver PL, Johnson R, Capogna M, Vikman J, Molnar Z, Babbs A, Partridge CJ, Salehi A, Bengtsson M, Eliasson L, Rorsman P, Davies KE. (2007) 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*, 104:2431-2436.
 109. Kusenda B, Mraz M, Mayer J, Pospisilova S. (2006) MicroRNA biogenesis, functionality and cancer relevance. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 150:205-215.
 110. Ziebarth JD, Bhattacharya A, Chen A, Cui Y. (2012) PolymiRTS Database 2.0: linking polymorphisms in microRNA target sites with human diseases and complex traits. *Nucleic Acids Res*, 40:216-221.
 111. Ortega FJ, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Rovira O, Guerra E, Esteve E, Xifra G, Martinez C, Ricart W, Rieusset J, Rome S, Karczewska-Kupczewska M, Strackowski M, Fernandez-Real JM. (2014) Profiling of Circulating MicroRNAs Reveals Common MicroRNAs Linked to Type 2 Diabetes That Change With Insulin Sensitization. *Diabetes Care*, 37:1375-1383.
 112. Khan IS, Taniguchi RT, Fasano KJ, Anderson MS, Jeker LT. (2014) Canonical microRNAs in thymic epithelial cells promote central tolerance. *Eur J Immunol*, 44:1313-1319
 113. Murata K, Furu M, Yoshitomi H, Ishikawa M, Shibuya H, Hashimoto M, Imura Y, Fujii T, Ito H, Mimori T, Matsuda S. (2013) Comprehensive microRNA analysis identifies miR-24 and miR-125a-5p as plasma biomarkers for rheumatoid arthritis. *PLoS One*, 8:e69118.
 114. Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, Wagner DR, Staessen JA, Heymans S, Schroen B. (2010) Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet*, 3:499-506.

115. Biroş E, Moran CS, Wang Y, Walker PJ, Cardinal J, Golledge J. (2013) MicroRNA profiling in patients with abdominal aortic aneurysms: the significance of miR-155. *Clin Sci (Lond)*, 126:795-803.
116. Blenkiron C, Askelund KJ, Shanbhag ST, Chakraborty M, Petrov MS, Delahunt B, Windsor JA, Phillips AR. (2014) MicroRNAs in Mesenteric Lymph and Plasma During Acute Pancreatitis. *Ann Surg*, 260:341-347.
117. Seto AG. (2010) The road toward microRNA therapeutics. *Int J Biochem Cell Biol*, 42:1298-1305.
118. Nelson HD, Tyne K, Naik A, Bougatsos C, Chan BK, Humphrey L. (2009) Screening for breast cancer: an update for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*, 151:727-737.
119. Kirschner MB, Kao SC, Edelman JJ, Armstrong NJ, Valley MP, van Zandwijk N, Reid G. (2011) Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. *PLoS One*, 6:e24145.
120. Hu Y, Yu CY, Wang JL, Guan J, Chen HY, Fang JY. (2014) MicroRNA sequence polymorphisms and the risk of different types of cancer. *Sci Rep*, 4:3648.
121. Kovacs-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:404-412.

10 Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

1. Németh N, Kerékgyártó M, Guttman A, Rónai Z. (2013) Rapid identification of human SNAP-25 transcript variants by a miniatureized capillary electrophoresis system. *Electrophoresis*, 35:379-84
2. Németh N, Kovács-Nagy R, Székely A, Sasvári-Székely M, Rónai Z. (2013) Association of impulsivity and polymorphic microRNA-641 target sites in the SNAP-25 gene. *PLoS One*, 8:e84207

A disszertációtól független közlemények

1. Nagy G, Kovacs-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 diabetes in a Caucasian (Hungarian) sample. *BMC Med. Gen.*, 10:79
2. Spiró Z, Arslan MA, Somogyvári M, Nguyen MT, Smolders A, Dancsó B, Németh N, Elek Z, Braeckman BP, Csermely P, Sóti C. (2012) RNA interference links oxidative stress to the inhibition of heat stress adaptation. *Antioxid. Redox Signal.*, 17:890-901
3. Kerékgyártó M, Németh N, Kerekes T, Rónai Z, Guttman A. (2013) Ultrafast haplotyping of putative microRNA-binding sites in the WFS1 gene by multiplex polymerase chain reaction and capillary gel electrophoresis. *J Chromatogr A*, 1286:229-34
4. Eszter Kotyuk, Gergely Keszler, Nora Nemeth, Zsolt Ronai, Maria Sasvari-Szekely, Anna Szekely. (2013) Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) as a novel candidate gene of anxiety. *PLOS One*, 8:e80613
5. Kótyuk Eszter, Németh Nóra, Halmai Zsuzsa, Faludi Gábor, Sasvári-Székely Mária, Székely Anna. (2013) A hangulati dimenziók és a glia-eredetű növekedési faktort kódoló gén polimorfizmusainak összefüggése depresszióval diagnosztizált mintán. *Neuropsychopharmacol Hung*, 15:63-72
6. Elek Z, Németh N, Nagy G, Németh H, Somogyi A, Hosszufalusi N, Sasvári-Székely M, Rónai Z. (2016) Micro-RNA Binding Site Polymorphisms in the WFS1 Gene Are Risk factors of diabetes mellitus. *PLoS One*, 10:e0139519.

11 Köszönetnyilvánítás

Elsőként témavezetőmnek, Dr. Rónai Zsoltnak szeretném megköszönni azt a mérhetetlen sok segítséget és kedvességet, amit tőle az elmúlt közel 10 évben kaptam. Köszönöm neki, hogy TDK-sként oly türelemmel tanított, mutatott meg mindent, mind a kísérleteknél, mind azok megtervezésénél és kiértékelésénél, majd prezentálásánál is. Később már PhD-hallgatóként is igazán öröm volt vele dolgozni, leírhatatlan az a sok tanács, segítség, amivel mind a PhD munkámat, mind a kutatáson kívüli boldogulásomat segítette.

Köszönöm Prof. Sasvári Máriának, hogy gyakorlatvezetőmként felkeltette a molekuláris biológia iránt az érdeklődésemet, majd mind TDK-sként, mind PhD-sként munkacsoportjában dolgozhattam, köszönöm továbbá neki, hogy végig egyengette az utamat és hasznos tanácsaival látott el.

Köszönöm munkatársaimnak a sok technikai segítséget, köszönöm a jó munkahangulatot, vidám perceket. Külön szeretném megköszönni Elek Zsuzsa és Bence Melinda sok segítségét, tanácsát és nem utolsósorban barátságukat.

Köszönöm Prof. Mandl Józsefnek, hogy a Patobiokémia doktori iskola keretein belül készíthettem el PhD-munkámat és köszönöm Prof. Bánhegyi Gábornak, hogy mindezt Intézetében végezhettem.

Köszönöm családomnak és barátaimnak a kitartó támogatását, biztatását.