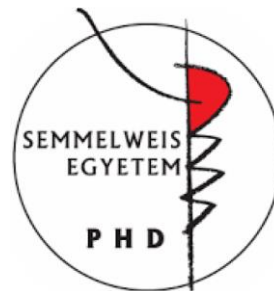


WFS1 gén polimorfizmusok funkcionális és asszociáció elemzése

Doktori értekezés

Molnár Zsuzsanna

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Töröcsik Beáta, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Füle Tibor, Ph.D., szaktanácsadó

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kovalszky Ilona DSc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Félné Dr. Semsei Ágnes, Ph.D., egyetemi tanársegéd

Dr. Gáspári Zoltán, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2019

TARTALOMJEGYZÉK

1. Rövidítések jegyzéke	3
2. Bevezetés	5
2.1. A humán genom.....	5
2.2. Genetikai variációk	6
2.2.1. Genetikai variációk vizsgáló módszerei	8
2.3. <i>WFS1</i> gén wolframin fehérje	14
2.4. A génexpresszió szabályozása.....	17
3. Célkitűzések	22
4. Módszerek.....	23
4.1. A vizsgálatban résztvevő személyek	23
4.2. Mintavétel és DNS izolálás.....	23
4.3. <i>In silico</i> módszerek	24
4.4. SNP genotipizálási módszerek.....	24
4.4.1. Real-time PCR	24
4.4.2. Allélspecifikus amplifikáció	25
4.4.3. PCR-RFLP	26
4.4.4. Primer extenzió	27
4.5. Hosszúság polimorfizmus vizsgálata.....	30
4.5.1. Hagyományos, horizontális gélelektroforézis.....	30
4.5.2. Olvadáspont analízis	31
4.5.3. Kapilláris elektroforézis.....	31
4.6. <i>In vitro</i> funkcionális vizsgálatok során alkalmazott módszerek.....	31
4.6.1. Riporter konstrukciók létrehozása	31
4.6.2. Tranziens transzfekció	34
4.6.3. Sejtek begyűjtése, feltárása.....	34
4.6.4. Enzimaktivitás mérése	35
4.6.5. RNS izolálás és mikro-RNS mérés.....	35
4.7. Statisztikai módszerek	36
5. Eredmények.....	37
5.1. Vizsgált polimorfizmusok kiválasztása	37
5.2. Genotipizálási módszerek	38

5.2.1.	rs148797429 VNTR genotipizálása.....	38
5.2.2.	A szabályozó régió SNP-inek multiplex genotipizálása.....	40
5.3.	Kapcsoltság- és haplotípuselemzés.....	41
5.4.	Asszociáció vizsgálatok.....	44
5.5.	Szabályozó régiók polimorfizmusainak funkcionális vizsgálata.....	48
5.5.1.	Promoter régió	50
5.5.2.	3' nem transzlálódó régió	51
6.	Megbeszélés.....	54
6.1.	A wolframin szerepe a cukorbetegségben	54
6.2.	A szabályozó régiók szerepe.....	55
6.3.	Hiányzó örökletesség.....	59
7.	Következtetések	63
8.	Összefoglalás.....	64
9.	Summary.....	65
10.	Irodalomjegyzék.....	66
11.	Saját publikációk jegyzéke	79
11.1.	A dolgozat témájához kapcsolódó közlemények.....	79
11.2.	A disszertáció témájához nem kapcsolódó publikációk	79
12.	Köszönetnyilvánítás	81

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ANOVA	varianciaanalízis (analysis of variance)
bp	bázispár
CNV	ismétlődési szám polimorfizmus (copy number variation)
CpG	citozint illetve guanint tartalmazó dinukleotid
Cy5	cianin-5
dATP	dezoxiadenozin-trifoszfát
dCTP	dezoxicitidin-trifoszfát
dGTP	dezoxiguanozin-trifoszfát
DMEM	sejttenyésztő oldat (Dulbecco's modified Eagle medium)
DNS	dezoxiribonukleinsav
dTTP	dezoxitimidin-trifoszfát
ER	endoplazmás retikulum
Exo I	<i>E. coli</i> Exonukleáz I
FBS	főtális borjú szérum (fetal bovine serum)
GWAS	genom szintű asszociációvizsgálat (genome wide association study)
kb	kilobázispár
kDa	kildalton
LD	linkage disequilibrium
MAF	ritka allél gyakoriság (minor allele frequency)
miR	mikro-RNS
mRNS	hírvivő (messenger) ribonukleinsav
nt	nukleotid
OGTT	orális glükóz tolerancia teszt
ONPG	orto-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid
PBS	foszfát puffer oldat (phosphate buffered saline)
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
PDK1	foszfatidil-inozitol függő kináz-1
RFLP	restriktációs fragemntum hosszúság polimorfizmus (restriction fragment length polymorphism)
rpm	fordulat / perc (rotation per minute)

rSAP	rekombináns alkalikus foszfatáz (recombinant dhrimp alkaline phosphatase)
SDS	nátrium-lauril szulfát (sodium dodecyl sulfate)
SLS	mintapuffer kapilláris elektroforézishez (sample loading solution)
SNP	egy pontos nukleotid polimorfizmus (single nucleotide polymorphism)
STR	mikroszatellita (short tandem repeat)
TAE	Tris–acetát–EDTA (etiléndiamin-tetraacetát) pufferoldat
T1DM	1-es típusú diabétesz mellitusz
T2DM	2-es típusú diabétesz mellitusz
UTR	nem transzlálódó régió (untranslated region)
VNTR	ismétlődési polimorfizmus (variable number of tandem repeats)

2. BEVEZETÉS

2.1. A humán genom

Egy élő szervezet genetikai anyagát, illetve az a sejtekben ezt reprezentáló DNS-molekulák összességét genomnak nevezzük. A humán genetica és genomika tudományágainak [1] alapvető mérföldköve volt az emberi genomot alkotó kb. 3 milliárd bázispárnyi DNS-szekvencia megismerése, ez az információ több, mint másfél évtizede Internetes adatbázisokban (www.ncbi.nlm.nih.gov, www.ensembl.org) szabadon hozzáférhető. Ezen eredmény elérése alapvetően a Humán Genom Projekt munkájához köthető. Az Egyesült Államokban koordinált, nemzetközi összefogás keretében végzett munka 1990 őszén kezdődött meg, és – többek között – fő célja az emberi genomot alkotó szekvencia meghatározása valamint a humán gének azonosítása volt. Az első évek eredményei nem váltották be maradéktalanul a kitűzött célokat: évente átlagosan kb. 100 000 bp-nyi szekvenciát sikerült azonosítani, ami alapján a teljes genom feltárása csaknem kilátástalannak tűnt. Ekkor a projekt egyik vezetője, Craig Venter új elvi megközelítést indítványozott. Ennek („shotgun sequencing”) alap gondolata az volt, hogy a rövidebb szakaszok szekvenciájának meghatározása hatékonyabban kivitelezhető, így ez az eljárás a genomi DNS kisebb darabokra történő felhasítását, az egyes fragmentumok megszekvenálását, majd – az átfedő részek alapján – a szekvencia összeillesztését javasolta [2]. Bár ezt a megközelítést az emberi genomban vártnál nagyobb számban előforduló ismétlődő szakaszok megnehezítették, ezzel együtt a projekt a század végére jelentősen felgyorsult, amiben alapvető szerepet játszott a technika (fluoreszcensen jelölt nukleotidok illetve nagy hatékonyságú kapilláris elektroforézis berendezések alkalmazása) és az informatika ugrásszerű fejlődése is. Mindennek köszönhetően 2003. április 14-én – csaknem napra pontosan 50 évvel a DNS-kettős spirál szerkezetének feltárása után – a Humán Genom Projekt befejeződött: az emberi örökítő anyag kb. 3 milliárd nukleotidból álló szekvenciája ismertté vált. Ez azonban korántsem jelentette a genetikai kutatások végét; épp ellenkezőleg: annak számos új lehetőséget, irányvonalat kínált [3].

Az egyik – mind elméleti, mind gyakorlati szempontból alapvető jelentőségű – terület a komplex jellegek örökletes hátterének kutatása, mely mindmáig számos kutatócsoport fő érdeklődése. Ezek jellegzetessége, hogy – szemben a monogénesen

öröklődő tulajdonságokkal – kialakulásukban számos környezeti és genetikai tényező bonyolult kölcsönhatása játszik szerepet: egy-egy örökletes faktor szerepe rendszerint viszonylag kicsi, és sem nem szükséges, sem nem elégséges az adott fenotípus kialakulásához. Ez az oka annak, hogy a genetikai tényezők feltárása komoly kihívást jelent, s a humán genom szekvenciájának ismerete – a kezdeti várakozással ellentétben – nem jelenti azt, hogy az örökletes faktorok a DNS-szekvenciájából könnyen „kiolvashatók” lennének. Számos, világszerte folytonosan növekvő gyakoriságot mutató, és így alapvető népegészségügyi jelentőségű betegség – daganatok, pszichiátriai rendellenességek, szív-, és érrendszeri megbetegedések, cukorbetegség stb. – tartozik a komplex kórképek közé, így nem meglepő, hogy ezek kutatása mind elméleti, mind klinikai tekintetben döntő fontosságú. A kórképek háttérében meghúzódó genetikai tényezők megismerése a megelőzés illetve a prognózis jóslása mellett a molekuláris szintű patomechanizmus megértését is segítheti, ami végső soron új gyógyszer-támadáspontokat, és így a célzott és egyénre szabott kezelési stratégiák fejlődését eredményezheti. Napjainkig még azonban a számos, több ezer beteget vizsgáló, nemzetközi együttműködés keretében megvalósuló projektek eredményei sem vezettek el oda, hogy sikerüljön valamely komplex kórkép genetikai háttérét teljes körűen, egyértelműen feltárni [4].

2.2. Genetikai variációk

Az akár monogénesen, akár komplex módon öröklődő tulajdonságok genetikai komponensei a genom variációiban keresendők. Két nem rokon személy genomja átlagosan 0,5%-ban tér el egymástól. Ezek a genetikai variációk több szempont szerint is csoportosíthatók. A ritka allél-változat előfordulási gyakorisága (MAF – minor allele frequency) alapján polimorfizmusokról (MAF \geq 1%) és mutációkról (MAF $<$ 1%) beszélhetünk. Szerkezetük szerint mind a mutációk, mind a polimorfizmusok két fő csoportba sorolhatók attól függően, hogy csupán egyetlen bázispárt érintenek, vagy hosszabb DNS-szakaszra terjednek ki. Az 1% gyakoriságot elérő, egyetlen nukleotidot megváltoztató variációkat egy pontos nukleotid polimorfizmusnak (SNP – single nucleotide polymorphism) nevezzük, az azonos szerkezetű, ritkább változatokat pontmutációnak hívjuk [1]. A humán genomban meglehetősen sok SNP és pontmutáció fordul elő: az NCBI SNP adatbázisában (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) jelenleg

több, mint 672 millió variációt tartanak nyilván. Kis kiterjedésük miatt ugyanakkor mégis az emberek közötti különbözőség csupán kb. egy ötödéért (azaz 0,1%-nyi különbségért) felelnek ezek a polimorfizmusok és mutációk.

A genetikai variációk másik fő csoportja több nukleotid megváltozásával jár. Leggyakrabban egy adott DNS-szakasz hiányát (deléció), vagy szám feletti előfordulását (inzerció és ismétlődési variációk) jelentik, s bár lényegesen kisebb számban fordulnak elő, mint az SNP-k és pontmutációk, mégis a genom variabilitásának jelentős részét adják. Ennek oka, hogy mind az érintett szakasz hossza, mind pedig az ismétlődési szám rendkívül széles határok között változhat: ennek megfelelően míg az SNP-k esetén szinte mindig csupán 2 allél fordul elő, addig ez a szám az ismétlődési variációk esetén nem ritkán 10 fölött van. Mindezek miatt a nevezéktan is bonyolultabb, és nem ritkán némileg átfedő kategóriákat alkalmaz. A mikroszatelliták vagy STR-ek (short tandem repeat) jelentik a legrövidebb szakaszra kiterjedő variációkat. Az ismétlődő szakasz hossza rendszerint 2 és 9 nukleotid között változik, az ismétlődési szám ugyanakkor kimagaslóan variábilis lehet különösen azokban az esetekben, amikor a polimorfizmus nem kódoló genomi régióban helyezkedik el.

Az ennél hosszabb szakaszt (kb. 10–100 bp) érintő ismétlődési variációkat VNTR-nek (variable number of tandem repeats) vagy miniszatellitának hívjuk. Itt sem mondható ritkaságnak, hogy az ismétlődési szám széles tartományban változik még olyan esetben is, amikor a polimorfizmus fehérjét kódoló szakaszon helyezkedik el: rendkívül kiterjedt irodalma van a 4-es típusú dopamin receptor 3. exonjában elhelyezkedő 48 bp-os VNTR-nek [5-7], amely a fehérje harmadik citoplazmatikus hurok régiójában 16 aminosav hosszúságú peptidszakasz megváltozását eredményezi, és számos pszichológiai jelleggel és pszichiátriai rendellenességgel hozták összefüggésbe [8, 9].

Az ismétlődési variációk sajátos csoportját képezik azok a polimorfizmusok, melyek meglehetősen hosszú (akár 10^5 bp nagyságrendbe eső) szakaszok ismétlődésével, átrendeződésével, esetenként hiányával járnak. Ezeket ismétlődési szám polimorfizmusnak (CNV – copy number variation) nevezzük. Említésre méltó, hogy kiterjedésükből adódóan a Humán Genom Program során nem kerültek felismerésre, egy évvel később jelentek meg az első tudományos közlemények melyek beszámoltak

arról, hogy ilyen jellegű variációk az egészséges személyek esetén is meglehetősen magas gyakorisággal fordulnak elő [10, 11].

2.2.1. Genetikai variációk vizsgáló módszerei

Az örökletes jellegek (különösen a komplex fenotípusok) genetikai hátterének tanulmányozása során nagy számú minta hatékony és gyors genotipizálása alapkövetelménynek mondható, nem meglepő tehát, hogy mind az SNP-k, mind az ismétlődési variációk elemzésére számos eljárást dolgoztak ki az elmúlt évek során.

Ezek zöme a vizsgált régió polimeráz láncreakcióval (PCR) történő felsokszorozásán, és a kapott fragmentumok elektroforetikus illetve fluoreszcens detektálásán alapul. A PCR során a polimorfizmust tartalmazó genomi régióról ciklusos folyamat során nagy számú azonos másolatot állítanak elő. Mivel a DNS-függő DNS-polimerázok egy lánc szintézisét elkezdni nem képesek, csupán egy már meglévő molekulát tudnak meghosszabbítani, így mesterséges, egyszálú DNS-molekulákkal, a primerekkel kijelölhető az amplifikálandó régió. A humán genom feltárása természetesen jelentős előrelépés volt ezen a területen is, mivel a vizsgált szekvencia ismerete a primerek tervezése során alapvető. Egy PCR-hez legalább két primer szükséges: ezek úgy hibridizálnak a minta-DNS egyik illetve másik szálához, hogy 3' végeik egymás felé néznek, így a ciklusos reakció során a primerek által közrefogott szakaszból exponenciálisan növekvő számú másolat keletkezik. A képződő DNS-fragmentumok gélelektroforetikus eljárásokkal vagy real-time PCR esetén a PCR alatt történő fluoreszcens technikákkal detektálhatók.

Ez a röviden összefoglalt alapkonceptió a kis kiterjedésű ismétlődési variációk (mikroszatelliták és VNTR-ek) elemzéséhez elegendő, mivel ebben az esetben éppen az adott régió hosszát kell meghatározni. Ennek megfelelően a polimorf régiót közrefogó primerek segítségével elvégezhető az amplifikáció, majd a PCR-termékek gélelektroforetikus elemzésével az ismétlődési szám meghatározható. Technikai szempontból kihívást jelentenek azok a variációk (mikroszatelliták és rövid inzerciók, deléciónok), melyeknél a variábilis modul hossza nagyon kicsi, mivel ebben az esetben a hagyományos horizontális agaróz gélelektroforézis felbontóképessége nem mindig elegendő az egyes allélok megbízható elkülönítésére. Ilyen esetekben a kapilláris elektroforézis [12] vagy a mikrofluidikai eszközök alkalmazása [6] jelentheti a megoldást.

SNP-k és nagy kiterjedésű ismétlődési variációk (CNV-k) elemzése estén viszont – különböző okokból – további illetve eltérő lépések szükségesek a genotípus meghatározása során. SNP-k esetén ennek oka az, hogy a báziscsere a polimorfizmus körüli DNS-szakasz hosszát nem változtatja meg, így a PCR-t követő elektroforetikus méret-meghatározás önmagában nem elegendő a genotípus megállapításához. Számos módszer látott napvilágot az elmúlt évek során, melyekkel a DNS-szekvencia eltérése elektroforézissel detektálható hosszúságkülönbséggé vagy meghatározott színű fluoreszcens jellé alakítható.

Az RFLP (restrikciós fragmentum hosszúság polimorfizmus) a II-es típusú restrikciós endonukleázok alkalmazásán alapul. Ezek az enzimek igen specifikusan adott szekvenciánál hasítják a dupla szálú DNS-t. Így ha az SNP az enzim felismerő helyén található, akkor a különböző genotípusok esetén eltérő hasítási mintázat jön létre a PCR-t követő emésztés során, ami gélelektroforézissel láthatóvá tehető.

A „Surveyor” nukleáz egy speciális DNS-t hasító enzim, ami szintén alkalmazható SNP-k kimutatására. Tulajdonsága, hogy a DNS-t olyan helyeken hasítja el, ahol hibás bázispár található, noha megjegyezendő, hogy az enzim különböző szabálytalan bázispárok iránti affinitása nem azonos. A technika lényege, hogy a PCR-t követően a mintákat ismert szekvenciájú fragmentummal hibridizáltatják, így azokon a helyeken, ahol a vizsgált minta szekvenciája ettől eltér, létrejöhetnek a hibás bázispárok. Ezt követően a gélelektroforézis során a hasítási mintázat alapján információ nyerhető arról, hogy a minta szekvencia a referencia fragmentumával azonos-e. Az eljárás jellegzetessége ennek megfelelően, hogy – szemben sok más technikával – a vizsgált régióban lévő bármilyen, akár eddig ismeretlen mutáció vagy SNP feltárására alkalmas, ugyanakkor annak pontos helye illetve a megjelenő új szekvencia csak további módszerekkel (leggyakrabban DNS-szekvenálással) azonosítható [13].

Az allélspecifikus amplifikáció (ARMS – Amplification-refractory mutation system) során olyan primert kell alkalmazni, melynek 3' vége éppen az SNP pozíciójára esik [14]. Ezekkel a primerekkel 3' exonukleáz aktivitással nem rendelkező enzimek használata esetén csak akkor keletkezik PCR-termék, ha a megfelelő allél jelen van az SNP helyén. Természetesen ún. külső primerekkel javasolt kontroll fragmentumot amplifikálni, hogy kizárható legyen, hogy a termék hiánya valamilyen technikai hiba következménye.

A DNS-polimeráz, a DNS-ligázhoz hasonlóan egy hiányzó foszfodiészter kötés létrehozására (azaz egy „nick” megszüntetésére) csak akkor képes, ha a DNS-szálak tökéletesen komplementerek egymással. Ennek megfelelően az enzim az allélspecifikus próbát a közvetlenül mellé hibridizáló DNS-molekulával csak akkor köti össze, ha megfelelő allél van jelen a DNS-mintában („oligonucleotide ligation assay” – allélspecifikus oligonukleotid ligálás), és így a próba minden nukleotidja kötődik ahhoz hidrogénkötésekkel. Ezt követi a képződő termék végére hibridizáló primerekkel végzett PCR, ami – értelemszerűen – csak akkor képez terméket, ha a ligálás végbement. Az eljárás kapilláris elektroforézis és eltérő hosszúságú próbák alkalmazásával hatékonyan multiplexálható: ez a technika az MLPA („multiplex ligation-dependent probe amplification” – multiplex ligálás-függő próba amplifikáció), mely az SNP-k és pontmutációk genotipizálása mellett kisebb és nagyobb kiterjedésű inzerciók, deléciók és kópia szám polimorfizmusok (CNV-k) vizsgálatára is alkalmazható [15-19].

DNS-láncok hibridizációján alapul a rendkívül nagy áteresztő képességű „DNS-chip” technológia is. Számos új platform az SNP-k és CNV-k elemzését párhuzamosan kínálja, a technika fejlődésének köszönhetően ma már elérhetőek olyan nagy sűrűségű microarray-ek, melyek segítségével több, mint 1,8 millió lókuszt (SNP illetve CNV) vizsgálható egyidejűleg [20]. Az eljárás lényege röviden, hogy a feldarabolt, fluoreszcens festékekkel jelölt, egyszálú vizsgálandó DNS-molekulák a chip felszínére rögzített próbákhoz kötődnek szekvenciájuk komplementaritása alapján. A detektáló rendszer ezt követően leolvassa az egyes pozíciókban mérhető fluoreszcens jelet: ennek alapján nem csak az adott szekvencia jelenléte vagy hiánya, hanem annak relatív mennyisége is meghatározható [21].

A primerextenzió nevű módszert egyes források miniszekvenálásként is említik, mivel a technika – kémiai szempontból – a Sanger-szekvenálással rokon. Ennél az eljárásnál – szemben az allélspecifikus PCR-rel – a primer 3' végével éppen a vizsgált lókuszt melletti nukleotidhoz kötődik, s a reakcióelegy a négyféle láncterminátor (leggyakrabban didezoxi- vagy aciklo-) nukleotidot tartalmazza négy különböző színű fluoreszcens festékekkel megjelölve. A reakció során a primer csupán egyetlen nukleotiddal hosszabbodik meg, mivel a DNS-szintézis természetes szubsztrátjai (dATP, dCTP, dGTP és dTTP) nincsenek jelen az oldatban. Azt pedig, hogy melyik

nukleotid épül be, vagyis milyen színű lesz a képződő termék, a minta genotípusa határozza meg. A képződő fragmentumok azonosítása erre alkalmas kapilláris elektroforézis berendezéssel történik, ami a négy szín detektálása, tehát a genotípus meghatározása mellett a multiplexálás lehetőségét is kínálja. Eltérő hosszúságú extenziós primerek alkalmazásával ugyanis az egyes polimorfizmusokhoz tartozó különböző színű jelek az elektroferogram eltérő pozícióiban jelennek meg, így egy reakcióban – a körülményektől függően – akár 6–8 SNP párhuzamos elemzése is megvalósítható [22]. Ugyanezen az elven alapul a SNPstream nevű, rendkívül nagy áteresztőképességű eljárás. A primer extenziós reakciók egy 384-es tálca mintahelyeiben elhelyezett apró „microarray”-ekhez rögzítve mennek végbe, így egyetlen mérés során több ezer genotípus határozható meg [23].

A valós idejű (real-time) PCR lényege, hogy a keletkező termékeket nem a reakció követően, hanem azzal párhuzamosan, folyamatosan detektálják. Erre két fő technikai lehetőség kínálkozik: az aspecifikus, DNS-interkalátor festékek (pl. SYBR Green, Eva Green, SYTO-család stb.) alkalmazása, illetve a szekvencia specifikus fluoreszcens próbák használata [24]. A ciklusról ciklusra történő detektálás nem csupán a teljes munkafolyamat lerövidítését, így a hatékonyság növelését szolgálja, hanem a mennyiségi mérések lehetőségét is kínálja. Lehetővé válik ugyanis annak meghatározása, hogy a reakció mely szakasza tekinthető a hatékony fázisnak, amikor a termékek mennyisége valóban jó közelítéssel ciklusról ciklusra megkétszereződik. Ebben a szakaszban a kiindulási minta mennyisége pontosan, megbízhatóan kiszámolható, s a módszer nagy előnye sok más technikához képest, hogy rendkívül tág, kb. 4 nagyságrendnyi az a koncentrációtartomány, ami egy mérésben felöllelhető [25].

A valós idejű PCR alapú technikák az SNP-genotipizálás során kedvelt eljárássá váltak. Bár itt nincs szükség mennyiségi meghatározásra, de a rendszer hatékonysága, gyorsasága és az eredmények kiértékelését is magában foglaló automatizálhatóság igen előnyös szempontok. Az eljárás lényege az, hogy a reakcióelegyben – a PCR-elegy szokásos összetevői mellett – jelen van két próba, melyek az egyik illetve másik alléllal komplementerek és eltérő színű fluoreszcens festékekkel vannak megjelölve. Többféle technika ismert: az egyik leggyakrabban alkalmazott eljárás a „molecular beacon” (molekuláris jelzőfény) nevű próbák használatán alapul, szintén széleskörűen elterjedtek a TaqMan próbák is [26]. Mindkét megközelítés alapja, hogy az intakt próbák

alapállapotban nem bocsátanak ki fluoreszcens jelet, mert egy csillapító („quencher”) molekula a próbán lévő fluoreszcens festék által kibocsátott fényt elnyeli. A „molecular beacon” esetén ezt a molekula hajtú szerű szerkezete biztosítja, a hurok-rész azonban – a megfelelő allél jelenléte esetén – a minta DNS-sel stabilabb kettős láncú szerkezetet képez, így a molekula „szétnyílik”, a fluoreszcens festék a csillapítótól eltávolodik, és a próba jelet bocsát ki [27]. Bár a TaqMan-próbák nem képeznek ilyen jellegű sajátos másodlagos szerkezetet, az alapelv hasonló. A DNS-polimeráz a PCR során 5' exonukleáz aktivitásával a mintához hibridizáló próbát lebontja, így a quencher és a fluoreszcens festék eltávolodik egymástól [28]. Mindkét esetben tervezhetők olyan próbák, melyek egyetlen nukleotidnyi szekvencia-különbségre érzékenyek, így az egyes minták esetén a két különböző színű fluoreszcens szignál aránya alapján a genotípus leolvasható. A TaqMan OpenArray rendszer a technika rendkívül nagy áteresztőképességű válfaja. Egy mikroszkópos tárgylemezhez hasonló méretű acéllemezen lévő lyukakban, 33 nl térfogatú reakcióelegyekben végezhetők el az amplifikációs reakciók, egy lemezen 48 db 64 mintahelyet tartalmazó régió található, így egy mérés során több, mint 3000 genotípus meghatározása valósítható meg [29]. A technika SNP genotipizálás mellett kvantitatív real-time PCR-ek kivitelezésére is alkalmas [30].

SNP-k kimutatása olvadáspont analízissel is elvégezhető. Ez a real-time PCR-alapú módszer az eddig bemutatottaktól lényegesen eltér: szekvencia specifikus próbák helyett DNS-interkalátor festékek képezik működésének elméleti hátterét. A technika elve az, hogy ezek a festékek csak a dupla szálú DNS-hez kötődnek, egy szálú DNS-sel viszont nem adnak jelet. Ily módon meghatározható a DNS olvadáspontja, vagyis az a hőmérséklet, ahol a molekula két lánc elválik egymástól, mivel ez a folyamat a fluoreszcens jel lecsökkenésével nyomon követhető. Megfelelő érzékenységű detektáló rendszert alkalmazva akár egyetlen nukleotidnyi szekvencia eltérés, azaz egy SNP is kimutatható [31]. Megjegyzendő, hogy az olvadáspont megváltozásának hátterében az adott fragmentumban lévő bármilyen szekvencia eltérés állhat, így a módszer önmagában nem nyújt biztos információt egy adott SNP genotípusáról, ugyanakkor éppen emiatt alkalmas új, eddig még ismeretlen polimorfizmusok felderítésére is [32].

A denaturáló gradiens gél elektroforézis (DGGE) és az egyszálú konformáció polimorfizmus (SSCP – single-strand conformation polymorphism) számos tekintetben

rokon az olvadáspont méréssel. Az alapelv ennél a két eljárásnál is az, hogy a DNS térszerkezetét illetve a hidrogén-hidak kialakulását a szekvencia befolyásolja, így a vizsgált szakaszon belül elhelyezkedő bármely – akár korábban még nem azonosított – variáció feltárható. A denaturáló gradiens gélelektroforézis során olyan gélt alkalmaznak, ami a molekulák vándorlási irányával párhuzamosan egyre növekvő mennyiségben tartalmazza a denaturáló ágenst (ureát vagy formamidot). Ennek megfelelően a különböző molekulák (szekvenciájuktól, azaz lényegében a H-kötések számától függően) a gél adott pontján denaturálódnak, elektroforetikus mobilitásuk itt jelentősen lecsökken, így a kapott mintázat alapján a szekvenciabeli különbségek azonosíthatók. A PCR amplifikáció során az alkalmazott egyik primer 5' végén egy GC-gazdag régió található („GC-horgony”), ez megakadályozza, hogy a két DNS-lánc teljesen elváljon az elválasztás alatt [33]. A módszer speciális változata a hőmérséklet gradiens gél elektroforézis (TGGE – temperature gradient gelelectrophoresis), itt az előbb bemutatott eljáráshoz hasonlóan a vizsgált DNS-ek olvadáspontja közötti különbség mutatható ki [34]. SSCP során az egyszálúvá tett DNS-t denaturáló körülmények között analizálják a gélelektroforézis során. Optimális esetben egyetlen nukleotidnyi eltérés is megváltoztatja a nukleinsav lánc feltekeredését, és a létrejött térszerkezetbeli módosulás eltérő elektroforetikus mobilitást eredményez [35].

Noha a CNV-k nagy kiterjedésű ismétlődési variációknak is tekinthetők, elemzésük mégsem mindig egyszerű feladat. Ez éppen méretükkel magyarázható: a variábilis régió rendszerint lényegesen nagyobb, mint amekkora DNS-szakasz a PCR során amplifikálható, így a VNTR-eknél vázolt PCR és azt követő gélelektroforézis genotipizálásukra nem alkalmas. Vizsgálatuk ezzel szemben kvantitatív mérésneként fogható fel: azt határozzák meg, hogy egy adott szekvencia a szokásos kettőtől eltérő számban van-e jelen a genomban. Ennek megfelelően több – mennyiségi elemzésre alkalmas – technika használható vizsgálatukra. Egyik legelterjedtebb, nagy hatékonyságú eljárás az aCGH (array based comparative genome hybridization). Ennek alapelve lényegében a DNS-chip technológiával azonos. A lapka felszínére rögzítetten található a teljes genomot reprezentáló próbák (rövid egyszálú DNS-molekulák), ezzel hibridizáltatják a vizsgált genomot megfelelően fragmentált formában egy ún. referencia genommal együtt. A két minta (vizsgált és referencia) DNS-molekulái eltérő színű fluoreszcens festékkel jelöltek. A különböző színű molekulák kompetitív módon

kötődnek a chipen lévő próbákhoz, eltérő génszám (1:1-nél nagyobb vagy kisebb arány) esetén a megfelelő pozíciók színe megváltozik, ami alapján a kópiaszám leolvasható [36].

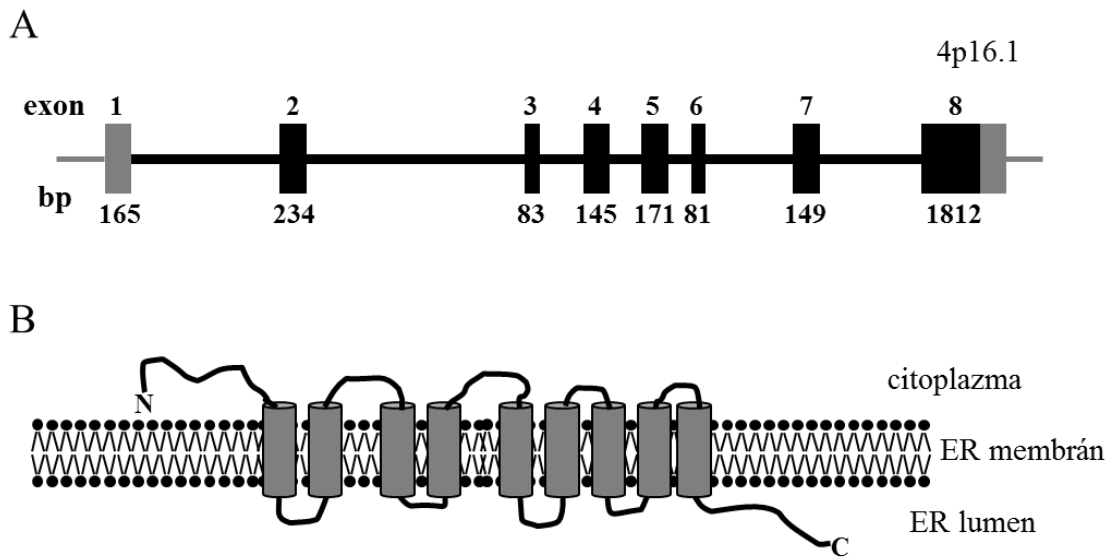
Célzott, egy vagy néhány régióra irányuló vizsgálat esetén a real-time PCR alapú eljárások rendkívül pontos és megbízható eredményt adnak. A mérés mind DNS-interkalátor, mind specifikus próbák alkalmazásával kivitelezhető, a relatív kvantifikálás során belső kontrollként olyan genomi régiót alkalmaznak, melyet egyetlen CNV sem érint, így kópiaszáma minden esetben 2-nek tekinthető [37].

A DNS vizsgálatára, a genetikai variációk azonosítására természetesen a DNS-szekvenálási technikák alapvető lehetőségként kínálkoznak. A ma már hagyományosnak mondható Sanger-szekvenálás mellett egyre inkább tért hódítanak az új generációs eljárások (NGS – next generation sequencing), ez utóbbiak a mennyiségi meghatározás (CNV-analízis) lehetőségét is kínálják, mivel a vizsgált szekvenciát rendkívül sok példányban, átfedő szakaszok összeillesztése révén határozzák meg [38]. Ezen technikák részletes bemutatása azonban meghaladná e dolgozat terjedelmi korlátait.

2.3. *WFS1* gén wolframin fehérje

A *WFS1* gén a 4. kromoszóma 4p16.1 régiójában helyezkedik el, 33,4 kb hosszúságú, s benne 8 exon található (1. ábra A rész) [39]. A génről 6 különböző transzkriptum íródhat át, amelyből 3 kódol fehérjét. A 890 aminosavból álló, 100 kDa tömegű wolframin fehérje az endoplazmatikus retikulum transzmembrán glikoproteinje. A wolframin fontossága főleg intracelluláris lokalizációjából adódik. A fehérjének 9 transzmembrán hidrofób tetramer régiója van, hidrofil N-terminálisa a citoplazma irányába, C-terminálisa pedig az ER lumene felé néz (1. ábra B rész). A humán *WFS1* ortológját 174 különböző fajban mutatták ki, 87%-os aminosav egyezést mutat az egérben kifejeződő homológ fehérjével. A wolframin szinte az összes eddig vizsgált szövetben expresszálódik, de a legmagasabb értékeket szívben, agyban [40], hasnyálmirigyben és inzulinoma β -sejtvonalakon mérték [41, 42]. Northern blotlal vizsgálva a *WFS1* jóval magasabb expressziót mutatott a hasnyálmirigy sziget sejteiben, mint az α -sejtekben vagy az exokrin pankreászban. Mivel a *WFS1* csak a β -sejtekben expresszálódik a hasnyálmirigyen belül, valamint inzulin szekréció során

expressziója növekszik, feltételezik, hogy a wolframin szerepet játszik az inzulin natív térszerkezetének kialakulásában a β -sejtek endoplazmatikus retikulumában [43]. A wolframin egy 400 kDa-os komplexet képez az ER membránjában, N-glikozilációja alapvetően fontos a fehérje érése illetve stabilizációja szempontjából [42]. A Wolfram-szindróma modell állataként létrehozott, *WFS1* mutáns egerekben glükóz hatására csökkent inzulin szekréciót figyeltek meg. Immunhisztokémiai vizsgálattal ezekben az egerekben csökkent β -sejtszámot detektáltak, míg a *WFS1*-et csak alig kifejező α -sejtek száma nem változott. Izolált szigetsejtek magas glükóz koncentrációra illetve ER stressz induktorokra megnövekedett apoptózist mutattak. Az eredmények alapján a wolframin fontos szerepet játszhat mind a β -sejtszám fenntartásában, mind pedig a glükóz indukálta inzulin exocitózisában [44]. Az ER stressz hatására mind a *WFS1* mRNS, mind pedig a wolframin fehérje mennyisége megnő. Az expresszió szabályozását az UPR (unfolded protein response) során az *Ire1 α* és a *Perk* szabályozzák. Egér hasnyálmirigy sziget sejtekben glükóz indukálta inzulin szekréció esetén megnőtt a *WFS1* expressziója. Bizonyították, hogy β -sejtekben a gén fontos szerepet játszik az ER homeosztázisának fenntartásában. Normál inzulin szekréció során is megemelkedik a *WFS1* expressziója. β -sejtekben a *WFS1* inaktiválása ER stresszt, és a sejtek diszfunkcióját okozza. Wolfram-szindróma patogenezise során a wolframin fehérje funkciójának kiesése krónikus ER stresszt okoz a hasnyálmirigy β -sejtjeiben [43]. *WFS1*-hiányos egerekben progresszív inzulin hiányt és diabéteszt mutattak ki. Ezekből az egerekből származó hasnyálmirigyek transzkriptomát illetve az inzulin szekréciót vizsgálva azt figyelték meg, hogy a szigetsejtek mennyisége jóval kevesebb volt, mint a heterozigóta és vad típusú egerekben, illetve glükóz indukció hatására jóval alacsonyabb szintű inzulin szekréció volt kimutatható. A proinzulin mennyiségében ugyanakkor nem volt szignifikáns eltérés [45]. Immunfluoreszcens elemzéssel és elektronmikroszkóppal vizsgálva azt találták, hogy a wolframin nem csak a β -sejtek ER-ában lokalizálódik, hanem a szekretált granulomok membránjában is jelen van. A wolframin azáltal, hogy szabályozza az inzulin tartalmú granulomok kémhatását, fontos szerepet játszik a proinzulin–inzulin átalakulásban és az exocitózisban [46]. A wolframin egy kalmodulin kötő fehérje, ami számos celluláris fehérjével kölcsönhatásban befolyásolja a sejt különböző Ca^{2+} -jelátviteli útvonalait, valamint fontos szerepet játszik a sejt belüli Ca^{2+} -homeosztázis szabályozásában [47].



1. ábra. A WFS1 gén és a wolframin szerkezete. A rész: A WFS1 a 4. kromoszóma rövid karján helyezkedik el, 8 exonból áll és 33,4 kb hosszúságú. B rész: A génről expresszálandó, 100 kDa tömegű wolframin fehérje az ER membránjában lokalizálódik, 9 transzmembrán régiót tartalmaz. N-terminálisa a citoplazma, C-terminálisa az ER lumene felé néz.

1938-ban Wolfram és Wagener 4 érintett testvért vizsgálva írta le először a róla elnevezett betegséget, a Wolfram-szindrómát (WFS; OMIM 222300). A DIDMOAD-ként is nevezett kórkép egy ritka autoszómális, neurodegeneratív betegség, ami diabétesz inszpidusszal, diabétesz mellitusszal, optikus atrófiával és siketséggel jár együtt, amely gyakran társul különböző mentális zavarokkal is. A klinikai manifesztációk sokszínűsége miatt meglehetősen nehéz a diagnózis felállítása, ami az inzulin függő diabétesz mellitusz és a kétoldali optikus atrófia alapján történik. Legtöbbször a fiatalok (15 év alatt) nem autoimmun inzulin függő diabétesz jelenik meg először. A betegség prevalenciája 0,013% [48] és 0,18% [49] között változhat a különböző populációkban [50, 51]. A szindróma igen magas mortalitással társul, a betegek 30 éves koruk körül leggyakrabban centrális légzési elégtelenség következtében halnak meg [39, 52]. A betegség leggyakrabban nem autoimmun, nem HLA-kapcsolt inzulin-függő diabéteszsel kezdődik 6 éves kor körül, és szinte minden betegnek szükséges inzulin terápia. A Wolfram-szindrómás betegeknél megjelenő inzulin-függő diabétesz klinikai tulajdonságai eltérnek az egyes típusú diabéteszes betegektől [53]. A diabéteszes betegek között ugyanakkor jóval gyakoribb a Wolfram-szindróma előfordulása 0,57–4,8% [48, 50]. Gyerekkori egyes típusú cukorbetegket vizsgálva azt

találták, hogy köztük átlagosan 7 évvel később diagnosztizálták csak a Wolfram-szindrómát a kezdeti téves T1DM diagnózis miatt [54]. A betegséggel számos neurológiai tünet társulhat (hallás károsodás, ataxia, perifériális neuropátia, mentális retardáció, demencia, pszichiátriai kórképek). Wolfram-szindrómás betegek 60%-ának volt már valamilyen depressziós epizódja, öngyilkossági kísérlete vagy pszichózisa [55]. Egy 1% gyakoriságú *WFS1* mutációt heterozigóta formában hordozó, kórházi ápolásra szoruló betegek között nyolcszor gyakrabban fordult elő valamilyen pszichiátriai kórkép illetve öngyilkosság [56]. Egy legújabb kutatás szerint a Wolfram-szindrómát okozó *WFS1* mutációk dominánsan és recesszíven is öröklődhetnek, illetve nagy variációt mutatnak a betegség kezdetét illetve a kórkép lefolyását illetően is [57].

Mindezen klinikai megfigyelések vetették fel annak gondolatát, hogy a gén – nagyobb gyakoriságú – polimorfizmusai pszichiátriai betegségek és diabétesz mellitusz rizikó faktorai lehetnek. Az rs4689388 SNP és a kettes típusú cukorbetegség kapcsolatát először 2009-ben mutatták ki egy GWAS vizsgálat során [58]. Több asszociáció vizsgálat metaanalízise bizonyította, hogy az rs1046320 és az rs10010131 SNP-k rizikó faktorai a kettes típusú diabétesznek [59]. A két SNP szorosan kapcsolt, az rs10010131 a gén 4. intronjában, az rs1046320 pedig a 3' UTR-ben helyezkedik el. Az elmúlt években az SNP-k illetve a DNS-szekvencia meghatározását célzó technikák robbanásszerűen fejlődtek, az egyes polimorfizmusok biológiai hatásának idő- és munkaigényes elemzése ugyanakkor ezzel legtöbbször nem tud lépést tartani. Ez lehet az oka annak, hogy a fenti SNP-k molekuláris funkciójának felderítése még várat magára, ami ebben az esetben azért is különösen jelentős, mivel két szorosan kapcsolt, de eltérő génszakaszon elhelyezkedő polimorfizmusról van szó. Ez ugyanakkor nem számít kivételnek: általánosságban elmondható, hogy a genom szintű asszociáció elemzések során felderített kandidáns gének legtöbbször valódi, molekuláris biológiai funkcióját mindmáig sem sikerült azonosítani.

2.4. A génexpresszió szabályozása

Az ún. konstitutív, vagy háztartási gének kivételével egy sejtben a génexpresszió folyamatos, és összetett szabályozás alatt áll, mely mind a transzkripció, mind pedig a transláció szintjén megvalósulhat. A folyamat összetettségét bizonyítja, hogy ezen szabályozási szintek között is gyakori a kapcsolat: pl. egy miRNS egy transzkripció

faktor átírását is gátolhatja. Eukarióták esetén ez időben és térben egymástól elválasztva zajlik. Folyamatosan változik, hogy egy adott pillanatban és szövetben melyik fehérjékre van éppen szükség, erre pedig a szervezetnek minél gyorsabban és gazdaságosabban reagálnia kell. A mai kutatások egyik fő irányelve ennek a differenciált génexpresszióknak, illetve annak molekuláris hátterének pontos megértése. Az átírás végtermékeként megjelenő fehérje mennyisége (előállítás és lebontás szintjén is) és minősége (különböző izoformák, poszttranszlációs módosítások) is szabályozható. Az alternatív splicing, RNS-interferencia és RNS-szerkesztés esetén pedig poszttranszkripciósan, de még a transzláció megkezdése előtt zajlik a szabályozás.

Számos transzkripciós faktort ismerünk, amelyek a DNS RNS-re történő átírását szabályozzák. Azonosításukat, és vizsgálatukat azonban nagyban megnehezíti, hogy az adott géntől viszonylag nagy távolságokban lévő DNS-szakaszhoz is kötődhetnek, valamint egy gén átírását egyszerre több transzkripciós faktor illetve koaktivátor különböző kombinációkban szabályozhatja. A DNS-kötő fehérjék szerepe viszonylag régóta ismert, az viszont, hogy egy adott betegség kandidáns génjeit hogyan szabályozzák a különböző transzkripciós faktorok, mindmáig kutatott. Hasnyálmirigyre specifikus transzkripciós faktorok segítségével a STAT3 jelpályán keresztül β -sejt képződést (neogenezis) sikerült indukálni [60]. Az ún. CpG-SNP-k különböző alléljaik révén létrehozhatnak, vagy törölhetnek egy lehetséges metilációs helyet a genomban, ezáltal szabályozva az adott gén expresszióját. Diabétesz kandidáns SNP-ket vizsgálva, pankreász szigetsejtek piroszekvenálásával kimutatták, hogy a *WFS1* promoterében lévő rs1801214 CpG-SNP különböző alléljainak hatására megváltozik a szigetsejtek metilációs mintázata. Így a genetikai és epigenetikai tényezők kölcsönhatása befolyásolhatja a β -sejtek funkcióját, ami hatással lehet a cukorbetegség kialakulására is [61].

A génkifejeződés szabályozása a miRNS-ek segítségével is végbe mehet, melyek kötődhetnek az mRNS 5' UTR-éhez, kódoló régiójához, illetve legtöbbször a 3' UTR-hez [62]. Ha létrejön az mRNS és a miRNS kapcsolódása, akkor rendszerint az adott fehérje expressziójának csökkenése tapasztalható. A miRNS-ek több módon fejthetik ki hatásukat: gátolhatják a transzláció iniciációját, lassíthatják vagy akár meg is állíthatják az elongációt, okozhatnak korai riboszóma leválást, fehérje degradációt, valamint az mRNS deadenilációját is. A fehérje mennyisége általában csökken, viszont ez

bekövetkezhet úgy is, hogy közben az mRNA szintje változatlan. A szabályozás rendkívül összetett, bioinformatikai adatok alapján egy génhez több száz miRNA is kötődhet, illetve egy miRNA-nek számos célgénje lehet [63]. Az érett miRNA-ek kb. 22 nukleotidból állnak, az mRNA–miRNA kapcsolódását döntően, viszont csak a miRNA 5' végétől számított 2–8. nukleotid közötti szakasz, az ún. seed régió határozza meg. Az interakciót ugyanakkor a molekula további komplementaritása is szabályozza. Épp ezért, a miRWalk2.0 adatbázisban található, kizárólag szekvencia adatok alapján jóslott 127 216 865 interakció csupán töredékét sikerült sejtes rendszerben is validálni. Ezek az *in vitro* mérések sem jelentenek azonban biztosítékot az *in vivo* fiziológiai jelentőségre, mivel ezekben a kísérletekben az adott szöveti expressziós mintázattól jóval eltérve, magasabb koncentrációban vizsgálják az mRNA–miRNA kölcsönhatást. A miRNA-ek illetve az általuk szabályozott célgének száma folyamatosan nő, mára több mint 2600 humán miRNA szekvenciáját ismerjük, amik több mint 29 000 gén átíródását szabályozzák. A miRNA-ek kétféle mechanizmussal képződhetnek. Ha az adott miRNA-nek saját génje van, akkor az az RNS-polimeráz II segítségével íródik át az ún. primer-miRNA (primer-miRNA), amely akár 3000 nukleotid hosszúságú is lehet, és több miRNA hurokszerű prekursorát is kódolhatja. Az érési folyamat során 5' végére 7-metilguanozin sapka (cap), 3' végére pedig poli-A-farok szintetizálódik. A DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region 8) fehérje felismeri a hajtű szerkezeteket, ami a Drosha-val komplexet képezve vágja ki az adott pre-miRNA szekvenciát. Ha a miRNA-nek nincs saját génje, akkor a pre-miRNA egy ún. host gén splicingja során, a kivágódó intronokból jön létre. Ebben az esetben azonban nem képződik rá sapka és poli-A-farok. A pre-miRNA a sejtmagból az exportin-5 transzporterén keresztül, energiaigényes folyamattal jut a citoplazmába, ahol további érési folyamatokon megy keresztül. Egy RNáz III családba tartó endonukleáz, a Dicer hasítja ki azt a hurok szerű szakaszt, ami a két dupla szálú részt összeköti. A molekula mindkét szálából képződhet érett miRNA, azonban általában az egyik lebomlik, és csak a másik vesz részt a szabályozásban. Ha főleg az egyik szál expresszálódik, akkor ezt miR-ként azonosítjuk, a másik szál pedig miR* jelölést kap. Más esetben, amikor mindkét szál hasonló mértékben fejeződik ki, a miR-5p és miR-3p elnevezés alkalmazható. Az érett miRNA fehérjékkel kapcsolódva hozza létre az RNS indukálta csendesítő komplexet (RISC: RNA-induced silencing complex), és ebben a formában kötődik az mRNA megfelelő régiójához [64]. Egy

miRNS expressziójának megváltozása szerteágazó változásokat eredményezhet. A folyamatosan átíródó, úgynevezett háztartási gének szekvenciájában kevesebb miRNS kötődési hely található. A miRNS általi szabályozás fontosságára utalhat az a tény is, hogy a pre-miRNS szekvenciák csupán 10%-ában dokumentáltak SNP-eket, a seed régiók érintettsége pedig mindössze 1% [65]. Többek között ez lehet az oka annak, hogy ezeket a polimorfizmusokat mindeközéig nem vizsgálták a GWAS tanulmányok. Ha azonban mégis előfordul egy polimorfizmus a miRNS szekvenciájában, az nagy hatással lehet a target gének expressziójára, ezáltal számos biológiai folyamaton keresztül a különböző betegségekre való hajlamra is. Az adott szövet expressziós mintázata is alapvetően meghatározza a potenciálisan, csupán szekvencia adatok alapján jósolt lehetséges kötődéseket. A miR-96 seed régiójában lévő pontmutáció hibás miRNS érést és target felismerést, ezáltal autoszomális domináns módon öröklődő siketséget okoz [66]. Kimutatták, hogy a pri-miR-124a-t érintő rs531564 SNP G allélja gyakrabban fordul elő T2DM betegek körében, illetve emelkedett miR-124a expresszióval jár [67]. Egy másik tanulmányban a pre-miR-34a-ben lévő SNP ritka allélja magasabb érett miR-34a szintet okoz a pankreász β -sejtekben, ami egyben a β -sejtek apoptózisával jár együtt [68]. Az *IGF2R* (insulin-like growth factor II receptor) 3' UTR-ében lévő T2DM-mel asszociációt mutató ACA inszerció / deléción [69] a miR-657 seed régióját érinti. HEP G2 sejt vonalat transzfektálva a miR-657 tökéletes kötőhelyének megfelelő deléción allél esetén csökkent fehérje expressziós szintet mértek [70]. Annak ellenére, hogy az már széles körben elfogadott, hogy miRNS-eket érintő SNP-k rizikófaktorai lehetnek a T2DM-nek, a háttérben húzódó pontos molekuláris mechanizmusok felderítése mindmáig várat magára.

Az elmúlt pár év kutatásai világítottak rá, hogy az úgynevezett UTR SNP-knek szintén fontos szerepük van a fehérjetermelés szabályozásában. Ebben az esetben nem a mikroRNS, hanem éppen a kötőhely szekvenciája változik meg, ami természetesen ugyanúgy befolyásolja a két RNS kapcsolódását és ennek megfelelően változhat a szabályozó folyamat hatékonysága. Ezzel együtt a gének 3' UTR szakaszaiban lényegesen gyakrabban találunk polimorfizmusokat feltehetően azért, mert ebben az esetben rendszerint csak egyetlen mRNS–miRNS kapcsolat módosul, ami legtöbbször enyhébb következményekkel jár. Ugyanakkor mégis valószínűsíthető, hogy ez a hatásmechanizmus is hozzájárulhat betegségek genetikai hátterének meghatározásához.

Munkacsoportunk korábban egy pszichogenetikai vizsgálat során kimutatta, hogy az rs1046322 A allélját hordozók magasabb pontszámot értek el az agressziót, impulzivitást, szorongást, valamint depressziót vizsgáló kérdőíveken. Ez a polimorfizmus egy miR-SNP, ami a miR-668 kötődését változtathatja meg. Riporter rendszerben vizsgálva sikerült kimutatnunk, hogy a miR-SNP különböző alléja megváltoztatja az adott mikro-RNS kötődésének hatékonyságát, így befolyásolja a keletkező fehérje mennyiségét [71]. A *HNF1B* (Hepatocyte nuclear factor 1-beta) 3' UTR régiójában lévő, diabétesszel asszociációt mutató rs2229295 egy olyan miR-SNP, amely több mikro-RNS felismerési helyét is megváltoztathatja. A gén terméke egy transzkripciós faktor, amely a hasnyálmirigyben szabályozza a növekedést és fejlődést. Kimutatták emellett, hogy *in vivo* szerepe van a májban az inzulin hatásának szabályozásában és a glükóz anyagcserében. Az SNP A alléja védő szerepet játszhat a T2DM kialakulása során. *In vitro* sejtes rendszerben luciferáz konstrukciókkal vizsgálták a lehetséges mikro-RNS-ek illetve a 3' UTR kapcsolódását, tehát az expresszió szabályozását. Két SNP (rs2229295 és rs1800929) helyezkedik el közvetlenül egymás mellett ebben a régióban, amely 4 mikro-RNS seed szekvenciáját is érinti. Igazolták, hogy az rs2229295 SNP A allélja esetén mind a miR-214-5p, mind pedig a miR-550a-5p hatására csökkent az expresszió. Két további mikro-RNS esetén viszont nem sikerült hasonló eredményeket kapni. Az rs1800929 szintén miR-SNP, közvetlenül az rs2229295 mellett helyezkedik el, ugyancsak a vizsgált 4 mikro-RNS seed régióján belül. Az eredmények alapján viszont ennek az SNP-nek nincs hatása az expresszió szabályozására: nem sikerült szignifikáns különbséget kimutatni a fehérjeszintekben a különböző allélok jelenléte esetén [72]. Ezen eredményekből is látszik annak a fontossága, hogy az *in silico* adatok alapján jósolt kötődéseket minden esetben egyesével igazolni kell kísérletes úton is.

3. CÉLKITŰZÉSEK

A kutatás fő célja a *WFS1* gén szabályozó régióiban elhelyezkedő néhány, kiválasztott genetikai polimorfizmus funkcionális és asszociáció vizsgálata volt. A tervezett munka fő feladatai közé tartozott:

- a vizsgálni kívánt polimorfizmusok *in silico* módszerekkel történő kiválasztása,
- hatékony genotipizáló rendszer kidolgozása, mely alkalmas az rs148797429 6 bp-os inzerció / delécio variáns vizsgálatára,
- olyan eljárás beállítása, melynek segítségével a szabályozó régió SNP-i multiplex rendszerben, egy reakcióban elemezhetők,
- a vizsgált SNP-k közötti LD és az általuk alkotott haplotípus blokkok meghatározása,
- genetikai asszociáció vizsgálat elvégzése annak elemzésére, hogy a kiválasztott polimorfizmusok bizonyos allélvariánsai gyakrabban fordulnak-e elő 1-es illetve 2-es típusú diabétesz mellituszban szenvedő betegekben,
- *in vitro* sejtes rendszer beállítása és alkalmazása a promoterben illetve 3' UTR-ben elhelyezkedő SNP-k biológiai hatásának (transzkripció illetve miRNS kötődés) vizsgálatára.

4. MÓDSZEREK

4.1. A vizsgálatban résztvevő személyek

Az asszociáció vizsgálat során 900 cukorbeteg ill. 892 egészséges személy DNS-mintáját vizsgáltuk. Mind a beteg, mind a kontroll személyek etnikailag homogén (kaukázusi) csoportot alkottak, egymással rokonsági kapcsolatban nem álltak. A kísérleteket az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (ETT-TUKEB) jóváhagyta (4514-0/2010-1018EKU), a DNS-mintavétel illetve a kísérletek megkezdése előtt minden résztvevő részletes tájékoztatót kapott (mely összefoglalta a tanulmány célját és menetét), majd írásos beleegyező nyilatkozatot töltött ki. A számozással kódolt mintákat anonim módon kezeltük. A kontroll csoportba tartozó egészséges személyek önkéntes alapon járultak hozzá a kutatáshoz.

A betegek a Semmelweis Egyetem II. Belgyógyászati Klinika járóbeteg-ambulanciáján és fekvőbeteg-részlegén álltak illetve állnak kezelés alatt. A diabetes diagnózisának felállítása éhomi vércukorértékek illetve 75 gramm orális glükózterhelés kiértékelése (OGTT) alapján történt a WHO kritériumainak megfelelően.

4.2. Mintavétel és DNS izolálás

A DNS-mintavétel a laboratóriumunkban kidolgozott nem-invazív módon történt. A kollaboráló munkatársak segítségével maguk a vizsgálati személyek vattapálcával 15–20 másodperces dörzsöléssel az íny és a bucca területéről szájnyalvákahártya-sejteket gyűjtöttek. Ez elegendő mennyiségű DNS-t biztosított a genotipizáláshoz. Egy személytől egyidejűleg két mintát („A” és „B”) vettünk, majd feldolgozásig -20 °C -on tároltuk. A párhuzamos minták feldolgozását – az eseteleges technikai hibák elkerülése, valamint a megbízhatóság fokozása céljából – a DNS-tisztítástól a genotípus meghatározásáig végig egymástól elkülönítve végeztük el. Az izoláláshoz a mintát $450\text{ }\mu\text{l}$ össztérfogatú mintavevő pufferbe helyeztük, amelynek összetétele: $0,1\text{ M NaCl}$, $0,01\text{ M Tris-HCl}$ ($\text{pH} = 8$), $0,5\%$ SDS, $0,2\text{ mg/ml}$ proteináz K (Sigma-Aldrich). A DNS-izolálást egy éjszakán át tartó 56 °C -os inkubálás előzte meg, amely alatt a sejtek lizáltak, az SDS denaturálta, a proteináz K pedig megemésztette a fehérjéket. Másnap, az éjszakai inkubációt követően a fültörlő pálcikákat tartalmazó mintavevő csöveket 10

percig centrifugáltuk (3000 rpm), és a nyers kivonatból 400 µl-t Eppendorf csövekbe mértünk át. Az RNS emésztését RNáz A-val végeztük, amit a fehérjék denaturálása követett telített NaCl oldattal. A DNS kicsapása izopropanollal és etanollal történt, majd a DNS csapadékot 100 µl 0,5× TE pufferben (5 mM Tris pH = 8, 0,5 mM EDTA) reszuszpendáltuk. Egy éjszakán át történő 4 °C-os inkubációt követően minden egyes minta DNS-koncentrációját Nanodrop 1000 spektrofotométerrel mértük meg.

4.3. *In silico* módszerek

Munkánk során számos online adatbázist használtunk. A *WFS1* gén szekvenciáját, illetve polimorfizmusainak adatait az NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>), és az Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) génbankjából töltöttük le. A mikro-RNS kötődést befolyásoló polimorfizmusok (miR-SNP-k) azonosítására a Patrocles [73], a PolymiRTS [74] és a miRWalk 2.0 [75] adatbázisok álltak rendelkezésünkre. A vizsgált mikro-RNS-ek szekvenciáit a miRBase (<http://www.mirbase.org/>) adatbázis tartalmazta. A transzkripció faktorok bekötődésének vizsgálatára az AliBaba 2.1 (<http://gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>) programot használtuk. A PCR során használt primerek tervezését az NCBI Primer Blast programjával (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) végeztük. A különböző luciferáz konstrukciókat irányított mutagenézissel hoztuk létre, az ehhez használt primereket a kitet forgalmazó cég QuikChange Primer Design programjával terveztük (<http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp>). A primerek ellenőrzését, olvadáspontjuk számítását az Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator [76] programmal végeztük. Az 1000Genomes projekt adatait a <http://browser.1000genomes.org/index.html> oldalról töltöttük le. Restriktív enzim hasító helyeket NEBcutter v2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) segítségével kerestünk.

4.4. SNP genotipizálási módszerek

4.4.1. *Real-time* PCR

A *WFS1* gén 7 SNP-jének genotipizálása Applied Biosystem 7300 real-time PCR készülék segítségével, a ThermoFisher cégtől rendelt TaqMan kitekkel történt (rs6824720: C__30903802_10; rs10010131: C__30473796_10; rs13147655: C__22272143_10; rs1801208: C__2401737_10; rs1046320: C__2873369_10;

rs1046322: C__8841086_1_; rs9457: C__2873371_10). Ezek a kitek tartalmazták a két primert, illetve az allélspecifikus, fluoreszcensen jelölt próbákat. A reakcióelegy kb. 4 ng genomi DNS-t, 1× végkoncentrációjú primer-próba kivet (ThermoFisher) és 1× végkoncentrációjú PCR TaqMan reakcióelegyet (AmpliTaq Gold[®] DNSpolimeráz, dNTP, ROX referencia festék, TaqMan PCR puffer és MgCl₂) tartalmazott 6 µl végtérfogatban. A 95 °C-on történő 10 perces elődenaturálást 40 kétlépcsős ciklus követte (95 °C 15 sec és 60 °C közös anneálás és extenzió 1 perc). A képződő fluoreszcens jelet a berendezés minden ciklusban a 60 °C-os szakasz alatt detektálta. Az amplifikálás után még egy 1 percgig tartó 60 °C-on történő detektálást végeztünk (allelic discrimination – végpont analízis). Az ebből nyert adatokat a 7300 System Software segítségével elemeztük. Egy reakció a két allélnak megfelelően két próbát tartalmazott, a próbák specifitása akkor a legnagyobb, ha az SNP pozíció az oligonukleotid középső harmadában helyezkedik el. A próbák 5' végükön fluoreszcens festékkel jelöltek: az egyik allélra specifikus próbán FAM, a másikon VIC riporter található; 3' végükre pedig MGB („minor groove binding”) quencher (ThermoFisher) van kötve. A riporter molekula által kibocsátott jel csak akkor detektálható, ha a próba a minta DNS-hez kötődik (azaz a próbának megfelelő allél jelen van a vizsgált mintában), és a DNS-polimeráz 5' exonukleáz aktivitása révén az extenzió során elhasítja azt. Így a riporter (FAM ill. VIC) fluoreszcens jele felszabadul a 3' végen lévő quencher (csillapító) molekula gátló hatása alól, ennek megfelelően a mért fluoreszcencia (FAM- és VIC-) jelek alapján az egyes minták genotípusa megállapítható.

4.4.2. Allélspecifikus amplifikáció

Az rs4273545 (T/G) SNP esetén egyirányú allélspecifikus amplifikáció segítségével végeztük a genotipizálást. Ennél a módszernél két, azonos irányú, allélspecifikus (a 3' végén a polimorfizmus egyik alléljára komplementer bázist tartalmazó), valamint két külső primert alkalmazunk. Egy minta elemzése két reakcióelegyben történik, melyek a két külső primer mellett az egyik illetve a másik allélspecifikus oligonukleotidot tartalmazzák. A specifikus primer csak a megfelelő allél jelenléte esetén kötődik be, így erről csak abban az esetben keletkezik termék, ha az adott allél jelen van a vizsgált SNP-lókuszon. Két különböző hosszúságú termék keletkezhet ennek megfelelően: a külső primerek által meghatározott hosszabb, valamint a specifikus primernek megfelelő allél jelenléte esetén egy rövidebb fragmentum. A külső primerek

segítségével keletkező hosszabb termék jelenléte utal arra, hogy a reakció megfelelően működik, a genotípus meghatározása pedig a rövidebb, allélspecifikus fragmentumok két párhuzamos reakcióban megjelenő mintázata alapján olvasható le. A primerek szekvenciáit (SigmaAldrich) és a keletkező termékek méretét az *1. táblázat* tartalmazza. A 10 µl-es reakcióelegy kb. 4 ng genomi DNS-t, 200 µM dATP-t, dCTP-t, dGTP-t és dTTP-t; 1× puffer oldatot, 1× Q-oldatot, 1–1 µM külső szenz és antiszenz primert, 0,25 U HotStarTaq DNS polimeráz enzimet (BioMarker) illetve 1 µM allélspecifikus primert tartalmazott. A PCR elődenaturációval kezdődött 95 °C-on 15 percig, majd 40 ciklus következett: 1 perc denaturálás 94 °C-on, 30 sec anneálás 67 °C-on, és 1 perc extenzió 72 °C-on. A reakció végén 10 perc végső extenzió történt 72 °C-on, majd a mintákat 8 °C-on tartotta a gép.

A PCR termékeket 1,5% agarózt és 2% metaphor agarózt (Biocenter) tartalmazó gélben választottuk el egymástól 1,5 órán át 110 V feszültségen futtatva. Molekulatömeg markerként 100 bp-os létrát használtunk. Az elektroforézist 10 perces etidium-bromidos (0,5 µg/ml 1× TAE oldatban) festés követte, majd UV-fény segítségével detektáltuk a képződött termékeket.

1. táblázat. Allélspecifikus amplifikáció Az rs4273545 SNP genotipizálásához használt primerek illetve a pcr során keletkező termékek tulajdonságai.

Név	Szekvencia (5'→3')	T _m (°C)	Keletkezett termék hossza (bp)
WFS1_p45_1	TCT TGC AGC GCC GGA ATA GGC	58,3	368
WFS1_p45_2	CTG AGT GGC CGG TGT AGC CG	60,0	
WFS1_p45_T2	AGC TGC GGC CCG GCA CTA	57,2	306
WFS1_p45_G2	AGC TGC GGC CCG GCA CTC	59,4	

4.4.3. PCR-RFLP

A PCR-RFLP módszere abban az esetben alkalmazható, ha a vizsgált SNP egy restrikciós endonukleáz felismerési szekvenciájában helyezkedik el. A genotipizálás első lépésben PCR segítségével felsokszoroztjuk a vizsgálandó polimorfizmus körüli régiót. Ezután a PCR-terméket megemésztjük egy adott restrikciós endonukleázzal,

majd hagyományos elektroforézissel tesszük láthatóvá az eredményt. A primereket úgy terveztük meg, hogy a keletkező termékben legyen egy kontroll hasító hely is, amivel a restrikciós endonukleáz megfelelő működését ellenőrizzük. Az rs4689388 esetén a PCR reakcióelegye kb. 4 ng genomi DNS-t, 1 μ M sense (5' CTC TGT CTT GCC ACA GTG GAT 3'), 1 μ M antisense (5' CCC TTT GCA GGG GCT CAT TA 3') primert, 200 μ M dATP-t, dCTP-t, dGTP-t és dTTP-t, 0,25 U HotStarTaq DNS polimerázt (BioMarker), valamint 1 \times puffert és 1 \times Q-oldatot tartalmazott. A PCR elegy végtérfogata 10 μ l volt. A termociklus elején 95 °C-on 15 percig zajlott az elődenaturálás illetve a polimeráz aktiválása, ezt 35 háromlépéses ciklus követte (denaturálás: 94 °C 1 perc, anneálás: 57 °C 30 sec, extenzió 72 °C 1 perc), majd egy végső extenzió (72 °C, 10 perc) következett. Így egy 618 bp hosszú terméket kaptunk, amelyet az *Nco* I enzimmel (Biocenter) emésztettük, melynek felismerési helye (C[^]CATGG) A allél esetén kétszer, míg G allél esetén csak egyszer szerepelt a PCR-amplikonban. Az emésztés után kapott termékek hossza így A allél esetén 62 bp, 153 bp és 403 bp, míg G allél esetén 62 bp és 556 bp. Az emésztés 37 °C-on 4 órán át tartott, amely során 0,05 U/ μ l *Nco* I enzimet és 1 \times CutSmart puffert alkalmaztunk, a reakcióelegy végtérfogata 20 μ l volt. A PCR termékeket ezután 2,5%-os agaróz gélen tettük láthatóvá. A futtatás időtartama 60 perc, az alkalmazott feszültség 110 V volt. Az elválasztást 10 perces etídium-bromidos (0,5 μ g/ml 1 \times TAE oldatban) festés követte, majd a fényképezés UV fény alkalmazásával történt, GelDoc 1000 gél dokumentációs berendezéssel (Biorad, Hercules, CA, USA).

4.4.4. Primer extenzió

Az rs4689388, rs4273545, rs1064320, rs1046322 és az rs9457 SNP-k esetén a genotípust primer extenziós módszerrel is meghatároztuk. A módszer első lépésében egy hagyományos PCR során sokszorosítottuk fel az adott SNP körüli régiót. Minden PCR elegy 200 μ M dATP-t, dCTP-t, dGTP-t és dTTP-t, 1 \times puffer oldatot, 1 \times Q oldatot, 1–1 μ M primert, 0,25 U HotStarTaq DNS polimeráz enzimet (BioScience) és kb. 4 ng DNS-mintát tartalmazott. Az elegyek végtérfogata 10 μ l volt. A PCR 15 perc elődenaturálással kezdődött 95 °C-on, majd 35 ciklus következett: 94 °C – 1 perc denaturáció, 63 °C – 30 sec anneálás, 72 °C – 1 perc extenzió, majd az utolsó ciklus után 72 °C – 10 perc extenzió. Az egyes SNP-k esetén alkalmazott primerek tulajdonságait a 2. táblázat tartalmazza. Mivel az ezt követő primer extenzió során az oldatban feleslegben maradt egyszálú primerek illetve PCR reagensek aspecifikus jelet

eredményeznének, a PCR terméket enzimes emésztéssel „megtisztítottuk”. A be nem kötődött primereket a rekombináns *E. coli* exonukleáz I enzimmel (Exo I) emésztettük, ami 3’–5’ exonukleáz aktivitással rendelkezik egyszálú DNS-molekulán. A feleslegben maradt dNTP-k hidrolízisét rekombináns alkalikus foszfatázzal (Shrimp Alkaline Phosphatase – rSAP) végeztük. A kétféle enzimmel történő emésztést egy lépésben végeztük, 7 µl PCR termékhez 5 µl enzimkeverék oldatot adtunk, ami 3,6 U rSAP (Kvalitex) illetve szintén 3,6 U *Exo I* (Kvalitex) enzimet tartalmazott. Ezt az elegyet inkubáltuk 37 °C-on 1 órán át, majd az enzim inaktiválása 75 °C-on 15 percen át történt.

2. táblázat. Primer extenzió. Az PCR amplifikáció során használt primerek illetve a keletkező termékek tulajdonságai

SNP	Név	Szekvencia (5' → 3')	T _m (°C)	PCR termék mérete (bp)
rs4689388	Wp88_1	GCTCACCTCTGTTTCCCCTCCAGCTCT	64,3	392
	Wp88_2	GCACTTCCCAAACCCTTTGCAGGGGC	64,3	
rs4273545	Wp45_1	GGGGACGCTGAGGCCGGAGTGG	66,0	441
	Wp45_2	CTGCGGCCGCGGGGGAGCAATC	66,0	
rs1046320 rs1046322 rs9457	W3u_1	GAGCACGACTGGCGCAGCACCG	64,2	776
	W3u_2	CCCACAGCCGCCCCACAGGGT	66,0	

A módszer következő lépése a primer extenzióval történő genotípus meghatározás volt. Az ennek során alkalmazott SNPstart[®] MasterMix oldat tartalmazta a reakcióhoz szükséges DNS polimeráz enzimet, a puffer oldatot és a négyféle fluoreszcens festékkel jelölt aciklo-, terminátor nukleotidot. A reakció 10 µl végtérfogatú elegyben zajlott, ami 1× SNPstart[®] MasterMix oldatot (BioScience), az egyes SNP-knek megfelelően beállított különböző mennyiségű primert és 1 µl emésztett PCR terméket tartalmazott. Az SNP-kre specifikus primerek mennyiségét, illetve szekvenciáját a 3. táblázat tartalmazza. Az extenziós reakció 30 ciklusból (90 °C – 10 sec, 55 °C – 20 sec, 72 °C – 1 perc) állt. Azért, hogy az elektroforézis során ne adjanak felesleges zavaró jelet, a reakcióelegyben feleslegben maradt fluoreszcens nukleotidok foszfátcsoportjait szintén enzimes emésztéssel távolítottuk el. 10 µl PCR termékhez 5 µl enzim mixet adtunk, ami 0,6 U rSAP enzimet és 1× CutSmart puffert (Kvalitex) tartalmazott. A reakcióelegyet

30 percig 37 °C-on inkubáltuk, majd az enzimet 15 percig 65 °C-on inaktiváltuk. A nukleotidok így elvesztették negatív töltésüket, és a gélben nem vándoroltak: nem adtak zavaró jelet az elektroforézis során.

3. táblázat. Primer extenzió. A primer extenzió során alkalmazott primerek és tulajdonságaik. pA: különböző hosszúságú poli-A farkat tartalmazó primer

SNP	Név	Szekvencia (5' → 3')	T _m (°C)	Koncentráció (μM)	Hossz (bp)
rs4689388	Wp88E1	TGCCTGTTGCTTTTTC AGTCTCTTAGCTCC	61,6	0,80	30
rs4273545	Wp45E1	CTCGGGCCCAACCAC GCAGGGG	66,0	0,80	22
rs1046320	Wu20E1pA	(A) ₇ CAGAGACCTTGCG ACCATGTGTAGATTGC	63,3	1,18	36
rs1046322	Wu22E1pA	(A) ₁₅ TCTCCACCCTGAG CCTGACCTTTCTGA	63,5	1,10	42
rs9457	Wu57E2pA	(A) ₁₉ CTTCACACATTCA CCCCTACCTGCTGGA	63,7	1,18	48

Az elválasztás előkészítése során 0,5 μl termékhez 0,5 μl markert és 39 μl Sample Loading Solutiont (SLS) (BioScience) adtunk. Kapilláris elektroforézis során alkalmazott Beckman „GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System” berendezésben 8 párhuzamos, 75 μm belső átmérőjű kapillárisban egyidejűleg zajlott az analízis. Az alkalmazott marker egy 13 és egy 80 nukleotid hosszúságú jelölt DNS-molekulát tartalmazott, ezek segítségével a 8 kapillárisban párhuzamosan lezajló elválasztás pontosan egymáshoz illeszthető, és a mintákban lévő DNS-molekulák mérete meghatározható. A minták gélbe történő injektálása elektrokinetikusán történt (2000 V, 30 sec). A kapilláris rendkívül nagy felszín-térfogat aránya miatt az elválasztás során lényegesen nagyobb feszültség alkalmazható (6000 V, 16 perc) a hagyományos, horizontális, alámerülő gélelektroforézishez képest. Ebben a rendszerben a minták analízise a cég által forgalmazott elválasztó mátrixban, 50 °C-on, denaturáló környezetben zajlott (90 °C, 1 perc), tehát az elektroforézis során egyszálú DNS-eket analizáltunk. A berendezés a DNS-molekulákat a detektor ablaknál lézer fény segítségével gerjeszti, és a különböző fluoreszcens festékek által kibocsátott fényt az optikai rendszer érzékeli. A detektálás időben történik, ami a hagyományos

elektroforézishez képest jóval magasabb érzékenységet eredményez: a mérés lényegében annak meghatározásán alapul, hogy a kapilláris effektív hosszát ($l = 30$ cm – a kapilláris elejétől a detektor ablakig mért távolságot) egy adott molekula mennyi idő alatt teszi meg. Az eredmények kiértékelése során az SNP ver2 korrekciót alkalmaztuk, ami a különböző festékek eltérő mobilitásával is számol.

4.5. Hosszúság polimorfizmus vizsgálata

Az rs148797429 (GGGGCG / – inszerció / deléció) hosszúság polimorfizmus esetén azt vizsgáltuk, hogy az adott mintában ez a 6 bázispár hosszúságú szekvencia szerepel (hosszú allél) vagy hiányzik (rövid allél). Ennek megbízható genotipizáláshoz három különböző, egymástól független módszert is beállítottunk. Mindhárom eljárás első lépéseként a polimorfizmus körüli régiót PCR segítségével felszorzósítottuk. A reakcióelegy végtérfogata 10 μ l volt, ami 1 μ M sense (5' TGT TAC AGG AGA AGG CGA GC 3'), 1 μ M antisense (5' CGA AAG TTT CCG AGC GGA CT 3') primert, 200 μ M dATP-t, dCTP-t, dGTP-t és dTTP-t, 0,25 U HotStarTaq DNS polimerázt (BioMarker), 1 \times puffert, 1 \times Q oldatot és kb 4 ng genomi DNS-t tartalmazott. Az elődenaturálás 95 °C-on 15 percig zajlott, amit 35 háromlépéses ciklus követett (denaturálás: 94 °C 1 perc, anneálás: 58 °C 30 sec, extenzió 72 °C 1 perc), majd egy végső extenzió (72 °C, 10 perc) zárta a reakciót, ami után a gép 8 °C-on tartotta a mintákat a további felhasználásig. Inszerció esetén 97 bp, míg deléciónál 91 bp hosszúságú DNS szakasz keletkezett. Mivel a különböző allélok között csupán 6 bp a különbség, ezért a termékeket különböző módszerekkel vizsgáltuk.

4.5.1. Hagyományos, horizontális gélelektroforézis

Az elválasztás során 1% agaróz és 3% metaphort (Biocenter) tartalmazó gélt és 100 bp-os molekulatömeg markert használtunk. A futtatás 2 órán át (8 V/cm) tartott, majd etídium-bromidos festést követően (0,5 μ g/ml 1 \times TAE oldatban) GelDoc 1000 berendezés segítségével UV fényvel megvilágítva tettük láthatóvá és fényképeztük le a mintákat.

4.5.2. Olvadásponat analízis

Az olvadásponat analízishez a PCR-t követően a reakcióelegyet optikai plate-be mértük át, majd hozzáadtunk 1x SYBR Green (ThermoFisher) interkalálódó festéket. A detektálást 7300 Real Time PCR (ThermoFisher) berendezés segítségével végeztük. A berendezés a termékeket felmelegítést majd lehűtést követően lassan ismét felmelegítette, és közben a fluoreszcens jelet folyamatosan detektálta. Az olvadásponat elérésekor a dupla szálú DNS-molekulák denaturálódnak (a két lánc elválik egymástól), ami jel hirtelen lecsökkenését eredményezi.

4.5.3. Kapilláris elektroforézis

A kapilláris elektroforézis analízishez a PCR protokollját kissé módosítottuk. A reakcióelegy 1 μM 5' végén Cy5 fluoreszcens festékkel jelölt sense primert (WFS1_148_1_Cy5: 5' Cy5-TGT TAC AGG AGA AGG CGA GC 3'), 1 μM jelöletlen antisense primert (WFS1_148_2: 5' CGA AAG TTT CCG AGC GGA CT 3'), 200 μM dATP-t, dCTP-t, dGTP-t és dTTP-t, 1x iProof GC puffert, 0,2 U iProof DNS polimerázt (BioCenter) és kb. 50 ng genomi DNS-t tartalmazott. Az enzim protokolljának megfelelően a termociklust is megváltoztattuk: 98 °C 30 sec, majd 40 ciklus: 98 °C – 10 sec, 60 °C – 30 sec, 72 °C – 90 sec, végül 72 °C – 7 perc. 0,5 μl PCR termékhez 0,5 μl 600 bp-os markert és 39 μl SLS-t (BioScience) adtunk. A denaturálást (90 °C, 2 perc) az injektálás (5000 V, 5 sec), majd az elválasztás (6000 V, 35 perc) követte.

4.6. *In vitro* funkcionális vizsgálatok során alkalmazott módszerek

4.6.1. Riporter konstrukciók létrehozása

A *WFS1* gén promoter illetve 3' UTR szabályozó régiójának vizsgálatához két különböző riporter vektort – pGL3B (Promega) és pMIR-REPORT (Ambion) – használtunk. Mindkét vektor tartalmazza a szentjánosbogár luciferáz enzimének génjét, valamint a könnyebb szelektálás érdekében egy ampicillin-rezisztencia gént is. A pGL3B vektort a gének expresszióját szabályozó promoter illetve enhanszer szekvenciák vizsgálatára tervezték, ennek megfelelően a 4818 bp hosszúságú vektorban a multiklónozó hely a luciferáz gén előtt helyezkedik el. A promoter vizsgálatához különböző hosszúságú konstrukciókat hoztunk létre: egy rövidebb (358 bp) illetve egy hosszabb (576 bp) szakaszt is klónoztunk a vektorba. A 6470 bp hosszúságú pMIR-

REPORT vektorban a multiklónozó hely a luciferáz gén mögött helyezkedik el, így a vektor optimális a mikro-RNS-ek célszekvenciáinak klónozására, tehát a mikro-RNS-ek szabályozó tulajdonságainak elemzésére. A *WFS1* gén teljes, 797 bp hosszúságú 3' szabályozó régióját (UTR-ét) vizsgáltuk. Első lépésben PCR segítségével sokszorosítottunk fel egy ismert genotípusú genomi DNS-t. A PCR során használt primereket úgy terveztük meg, hogy mindegyik tartalmazza egy olyan restrikciós enzim felismerési helyét, ami az adott vektor multiklónozó helyén is megtalálható. A klónozáshoz használt primereket a 4. táblázat tartalmazza. Emésztést követően mind a plazmid, mind a PCR termék ragadós végekkel rendelkezett, ami lehetővé tette a rekombináns DNS keletkezését. Fontos szempont volt továbbá, hogy a multiklónozó helyeken vágó enzimek közül olyat válasszunk, ami a PCR terméket csak a végén (a primer szekvenciájával bevitt felismerési helyen) emészteti.

4. táblázat. A klónozás során használt primerek és tulajdonságaik. A szekvenciában aláhúzás jelöli az adott restrikciós enzimek felismerési szekvenciáit, ^ mutatja a hasítás helyét.

Vizsgált régió	Név	Szekvencia 5'→3'	Restrikciós enzim (felismerési helye)
Promoter régió	WFS1_P8_1	GCAG <u>CTCGAG</u> GTCCGCT CGGAAACTTTCGCTGTGG	<i>Xho</i> I (<u>C[^]TCGAG</u>)
	WFS1_P8_1_1	GCCCTT <u>CTCGAG</u> TCTTGC AGCGCCGGAATAGGC	<i>Xho</i> I (<u>C[^]TCGAG</u>)
	WFS1_P8_2	GCAGA <u>AGCTT</u> AAGTTGT TCGGGAGCAGCTGAACG	<i>Hind</i> III (<u>A[^]AGCTT</u>)
3' UTR	WFS1_3U_1	TCGGCG <u>GAGCT</u> C GGATG GTCCGCCACGAGGAGC	<i>Sac</i> I (<u>GAGCT[']C</u>)
	WFS1_3U_2	AAAGGAA <u>AGCTT</u> GCGCTG CAGGTTCCACCAGAGG	<i>Hind</i> III (<u>A[^]AGCTT</u>)

A PCR során HotStarTaq polimerázt (Biomarker), és 57 °C-os anneálási hőmérsékletet alkalmaztunk, a termociklus többi lépése a már korábban bemutatott PCR-ekhez teljesen hasonló volt. Az így keletkezett inszertet és az adott üres vektort 3 órán át 37 °C-on emésztettük a megfelelő restrikciós endonukleázokkal. Ezt követően a vektort további 1 órán át CIAP foszfatázzal (Biocenter) emésztettük, hogy megakadályozzuk annak spontán záródását. Mindkét emésztett terméket 1%-os SeaKem[®] GTG[®] Agarose (Lonza, Rockland ME, USA) gélen választottuk el, vágtuk ki,

majd tisztítottuk meg (Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega). Az így létrehozott ragadós végű inszertet és vektort szobahőmérsékleten 3 órán át ligáltuk T4 ligáz enzim (ThermoFisher) segítségével. A ligátumokat XL10-Gold[®] ultrakompetens sejtekbe (Stratagene) transzformáltuk, majd a másnapra felnövő telepek közül egyet leolva növesztettük fel a sejteket, amikből PureYield[™] Midiprep Sytem (Promega) kittel tisztítottuk meg a kész konstrukciókat. A inszert megfelelő beépülését először emésztést követő elválasztással, majd a megfelelő bázissortet Sanger-szekvenálással is ellenőriztük.

5. táblázat. A különböző konstrukciók előállításánál használt mutagenézis primerei

Név	Szekvencia 5' → 3'	T _m (°C)	Mutagenézis célja
WFS1_45_T_1	CCACGCAGGGGGAGTGCCGGGCC	70	rs4273545 T → G
WFS1_45_T_2	GGCCCGGCACTCCCCCTGCGTGG		
WFS1_hr_1	TTCCGCGGGCGGGGCGGGGC	68	rs148797429 hosszú → rövid
WFS1_hr_2	GCCCCGCCCCGCCCCGCGGAA		
WFS1_57_G_1	CCTCATGACCCTCCTGTCCAGCAGGTAG	65,8	rs9457 C → G
WFS1_57_G_2	CTACCTGCTGGACAGGAGGGTCATGAGG		
WFS1_57_s_1	CAGGCTGCCTCATGACCCTCGAGAGGTG CAGGTAGTGGGTGAATGTG	75	miR185 seed régiójának komplement ere
WFS1_57_s_2	CACATTCACCCACTACCTGCACCTCTCGA GGGTCATGAGGCAGCCTG		

Az így létrehozott konstrukciókból irányított mutagenézissel hoztuk létre a vizsgálatok során használt további variánsokat. A seed mutáns esetében a miR-185 7 bázispár hosszú seed szekvenciájának komplementereire cseréltük a konstrukcióban szereplő bázisokat. Ehhez a QuikChange[®] Lightning Site-Directed Mutagenesis Kitet (Stratagene) használtuk. A kétszálú cirkuláris plazmid mindkét szálára olyan – ellenkező irányú – mutagén primereket terveztünk, amelyek közepén a létrehozni kívánt bázisok szerepelnek. Az alkalmazott mutagenizáló primerek szekvenciáit az 5. táblázat tartalmazza. Így a PCR során létrejöttek a módosított szekvenciájú konstrukciók. A keletkező PCR terméket *Dpn* I enzimmel (Biocenter) emésztettük, így az eredeti metilált DNS lebomlik, és csak az újonnan keletkezett, mutációt tartalmazó

konstrukciók maradnak meg. Ezekkel ismét XL10-Gold[®] ultrakompetens sejteket transzformáltunk, majd a leoltást követően PureYield[™] Midiprep Sytem (Promega) kittel tisztítottuk meg a kész konstrukciókat, és Sanger-szekvenálással ellenőriztük a mutagenézis sikerességét. A *WFS1* génben elhelyezkedő variánsok vizsgálatára ezzel az eljárással összesen 11 különböző konstrukciót hoztunk létre, melyekkel lehetővé vált a két promoter polimorfizmus (rs148797429 inszerció / delécio és rs4273545 SNP) és a 3' UTR-ben elhelyezkedő rs9457 SNP esetleges szabályozó szerepének tanulmányozása.

4.6.2. *Tranziens transzfecció*

A polimorfizmusok luciferáz rendszerrel történő elemzése során HEK293T (humán embrionális vese) sejtvonalat használtunk. A sejteket termosztátban (37 °C, 5% CO₂) növesztettük, 10% FBS (Lonza) illetve 1% Penicillin–Streptomycin antibiotikumot tartalmazó DMEM médiumban (Invitrogen Gibco). A transzfecciók kísérletekhez a sejteket 24 lyukú plate-be, 500 µl médiumba tettük ki, majd 24 óra elteltével Lipofectamine[™] 2000 (Invitrogen) segítségével végeztük a transzfecciót. A promoter régió vizsgálata esetén a különböző allél variánsokat tartalmazó pGL3B konstrukciókat „pMIR-REPORT β-galaktozidáz” vektorral kotranszfeccióztunk. A 3' UTR régió vizsgálatakor a pMIR-REPORT konstrukciókat „pMIR-REPORT β-galaktozidázzal” valamint a 185-ös prekursor mikro-RNS-sel együtt transzfeccióztunk. A transzfecciót 0,125 µg pGL3B konstrukciót, 0,2 µg „pMIR-REPORT β-galaktozidázt”, és Opti-MEM-et tartalmazó, 62,5 µl végtér fogatú elegy, valamint 2,5 µl 1 mg/ml Lipofectamine[™] 2000 és 60 µl Opti-MEM segítségével végeztük. A miR-SNP vizsgálatakor az előzőekhez képest 0,05 µg pMIR-REPORT konstrukciót illetve 5 pmol miR-185-t is alkalmaztunk. A liposzómák kialakulásához szükséges 20 perces inkubációt követően a sejtekhez 125 µl reakcióelegyet adtunk. Minden kísérlet során három párhuzamos mérést végeztünk.

4.6.3. *Sejtek begyűjtése, feltárása*

A transzfecciót követően a sejteket 24 órán át 37 °C-on inkubáltuk. Ezután a lyukakból a médiumot leszívtuk, a sejteket PBS-ben mostuk, majd 500 µl PBS-ben felfuszpendáltuk, és Eppendorf csövekbe gyűjtöttük. Centrifugálást (3000 rpm, 4 °C, 3 perc) követően a felülúszót eltávolítottuk, majd a sejteket 100 µl 250 mM-os Tris-HCl

pH = 8,0 pufferben vettük fel. A sejtek feltárását három egymást követő fagyasztásos–olvasztásos lépéssel végeztük 37 °C-os vízfürdő illetve folyékony nitrogén segítségével. Centrifugálás (13000 rpm, 4 °C, 15 perc) után az enzimeket tartalmazó felülúszót új Eppendorf csövekbe pipettáztuk.

4.6.4. Enzimaktivitás mérése

Az enzimaktivitás méréséhez a Varioskan Flash műszert használtuk, ami alkalmas mind luminometriai, mind fotometriai mérések elvégzésére. A luciferáz aktivitás meghatározása során 12 µl mintához 60 µl luciferin reagenst (a reagens 30 ml törzsoldata 5 mg Beetle Luciferin, kálium só (Promega), 1 ml 0,6 M Tricint, 1 ml 0,0321 M $(\text{MgCO}_3)_4 \cdot \text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ -t, 0,08 ml 1 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ -t, 1 ml 3 mM EDTA-t, 1 ml 1 M DTT-t, 1 ml 8,1 mM CoAl_3 -t, 0,15 ml 0,1 M ATPNa_2 -t tartalmazott) adtunk. A β -galaktozidáz aktivitásának méréséhez annak mesterséges szubsztrátját, az ONPG-t (orto-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid) használtuk. 20 µl sejtkivonathoz 130 µl ONPG oldatot (ONPG és $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$ puffer pH = 7,5 és Mg^{2+} puffer) adtunk.

4.6.5. RNS izolálás és mikro-RNS mérés

Az érett mikro-RNS szintek méréséhez első lépésben a HEK293T sejtekből RNS-t tisztítottunk. A sejteket TRI reagensben (ThermoFisher) gyűjtöttük be, ami meggátolta az RNS-ek lebomlását. Az RNS-t kloroformos extrakciót követően izopropanol és etanol segítségével tisztítottuk. Az RNS koncentrációját és minőségét NanoDroppal, illetve hagyományos 1%-os agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztük.

A mikro-RNS méréshez egy mikro-RNS-detektáló kitet használtunk (miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis Kit és High Specificity miRNA QPCR kit, Stratagene). Mivel a mikro-RNS-ek túl rövidek ahhoz, hogy két primert tervezzünk rájuk, első lépésben egy mesterséges poli-A szekvenciát szintetizáltunk azok végére. A cDNS szintézis során ez szolgált templátként a primernek, ami az 5' végén egy univerzális adapter szekvenciát is tartalmazott. Ez meghosszabbította a cDNS-t, így az már real-time PCR segítségével detektálható méretűvé vált. A mérés során az adapter szekvenciával komplementer univerzális primert, illetve a miR-185-re specifikus saját tervezésű primereket használtunk. A nem processzált, pre-miR-185 szintjét az 5' TCC TGA TGG TCC CCT CC 3' primerrel, míg az érett miR-185 mennyiségét az 5' TGG AGA GAA AGG CAG

TTC CTG A 3' primerrel mértük. A miR-185 relatív mennyiségét a belső kontrollként használt miR-196b segítségével határoztuk meg.

4.7. Statisztikai módszerek

A mintavétel valamint az alkalmazott genotipizáló eljárások megbízhatóságát a Hardy–Weinberg egyensúly tesztelésével ellenőriztük. A mért illetve a számított, várható genotípus gyakoriság értékek között egyik polimorfizmus esetében sem mutatkozott szignifikáns eltérés. A Hardy–Weinberg egyensúlytól való esetleges eltérést, valamint az eset–kontroll analíziseket χ^2 -próbával értékeltük ki az SPSS v17.0 program segítségével. Egyik esetben sem kaptunk szignifikáns eltérést a Hardy–Weinberg egyensúlytól, ami a genotípus adatok megbízhatóságát és a populáció homogenitását mutatja. Mivel több polimorfizmust elemeztünk egyidejűleg, a többszörös tesztelésre Bonferroni-korrekciót végeztünk, és a $p < 0,005$ értékeket fogadtuk el statisztikailag szignifikáns eredmények.

A mért luciferáz enzim aktivitási adatokat minden esetben a β -galaktozidáz értékekkel normalizáltuk, az egyszempontos ANOVA elemzést szintén az SPSS v17.0 segítségével végeztük el. A kapcsoltsági vizsgálat során a Lewinton-féle D' illetve az R^2 értékeket HaploView 4.2 software segítségével határoztuk meg [77].

5. EREDMÉNYEK

5.1. Vizsgált polimorfizmusok kiválasztása

A polimorfizmusok kiválasztásánál több szempontot is figyelembe vettünk. Az általunk elemzett populáció mérete miatt a ritka variánsok tanulmányozása nem ígérkezett célravezetőnek, ezért csak az 5%-nál magasabb MAF értékkel rendelkező polimorfizmusokat válogattuk be a vizsgálatunkba. A szelekciónál figyelembe vettük továbbá az addig megjelent irodalmi adatokat, valamint egy laborunkban elvégzett korábbi kísérlet eredményeit is, amiben 17 *WFS1* SNP-t vizsgáltunk [71]. Ezen saját, illetve az irodalomban elérhető kapcsoltsági eredmények alapján úgy választottunk ki a gén teljes szakaszából polimorfizmusokat, hogy minden haploblokkból legalább egyet vizsgálva a teljes gént lefedjük. Szerettünk volna továbbá azokra az SNP-kre fókuszálni, amelyeknek valódi molekuláris biológiai hatása lehet, így ténylegesen befolyásolhatják a keletkező wolframin fehérje mennyiségét. A promoter régió vizsgálatok a transzkripció start helyétől 2000 bp-nál közelebbi szakaszt elemeztük. Az AliBaba 2.1 (<http://gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>) program segítségével olyan polimorfizmusokat kerestünk, amelynek különböző alléljai a predikció alapján valamely transzkripció faktor eltérő hatékonyságú bekötődését eredményezik, ezáltal hatással lehetnek a keletkező fehérje mennyiségére. A 3' nem transzlálódó régió esetén pedig olyan SNP-kre koncentráltunk, amelyek egy mikro-RNS kötődési helyén találhatóak. Ezen miR-SNP-k azonosítását a Patrocles [73], a PolymiRTS [74] és a miRWalk 2.0 [75] adatbázisok segítségével végeztük. A genotipizáláshoz kiválasztott polimorfizmusokat illetve azok tulajdonságait a 6. táblázat tartalmazza.

Az rs4689388 és a kettes típusú diabetesz kapcsolatát már bizonyították [78], ezért mindenképp szerettük volna ezt mi is a saját populációnkon bemutatni. Az rs148797429 (- / GGGGCG) hosszúság polimorfizmusra az rs4273545 SNP genotipizálása során figyeltünk fel. Ezt a VNTR-t annak ellenére nem vizsgálták eddig, hogy *in silico* adatok alapján transzkripció faktorok (SP1, AP22 α) kötőhelyét érinti, és csupán 259 bp távolságra van a transzkripció start helyétől. Az rs10010131 illetve az rs1046320 SNP-eket már több közlemény is összefüggésbe hozta a cukorbetegséggel [59, 79, 80], azonban egyik sem tudta azok valódi, biológiai funkcióját megmagyarázni. Az

rs1046322 miR-SNP szabályzó hatását korábban már igazoltuk laborunkban *in vitro* sejtes rendszerben [71], azonban diabétesszel kapcsolatban még nem vizsgáltuk.

6. táblázat. A genotipizáláshoz kiválasztott 10 WFS1 polimorfizmus. A táblázat a genomi illetve génen belüli elhelyezkedést, az egymástól számított távolságot, valamint a ritka allélok gyakoriságát mutatja az irodalmi (1000 Genomes Project, EUR) adatok alapján

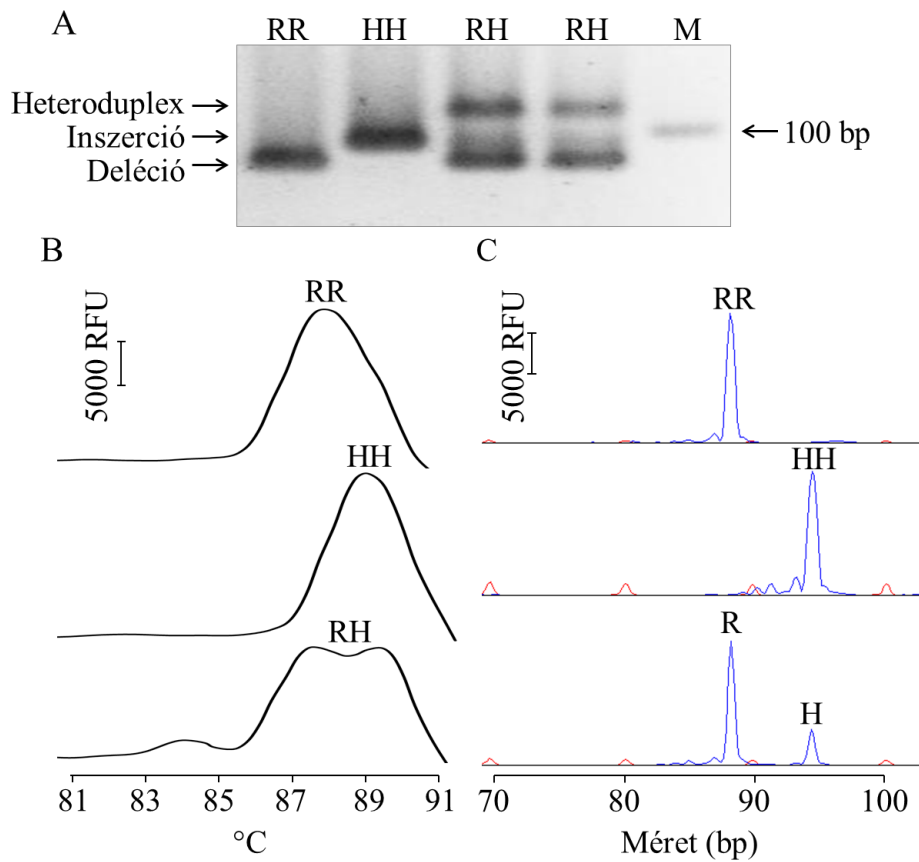
	Genomi pozíció (GRCh38.p7 alapján)	Elhelyezkedés	SNP-k távolsága (bp)	MAF (ritka allél)
rs4689388	4:6268329	promoter		0,38 (G)
rs148797429	4:6269591– 6269596	promoter	1262	0,32 (hosszú)
rs4273545	4:6269689	promoter	98	0,39 (G)
rs6824720	4:6276920	1. intron	7231	0,14 (A)
rs10010131	4:6291188	4. intron	14268	0,37 (A)
rs13147655	4:6291747	5. intron	559	0,37 (A)
rs1801208	4:6301162	8. exon	9415	0,05 (A)
rs1046320	4:6302617	3' UTR	1455	0,38 (G)
rs1046322	4:6302721	3' UTR	104	0,10 (A)
rs9457	4:6303072	3' UTR	351	0,41 (G)

5.2. Genotipizálási módszerek

5.2.1. rs148797429 VNTR genotipizálása

A mindössze 6 bp hosszú régiót (– / GGGGCG) érintő polimorfizmus megbízható genotipizálására három különböző módszert is beállítottunk. Mindhárom módszer első lépéseként egy PCR során a rövid („R”, deléción) illetve a hosszú („H”, GGGGCG inszerción) allélnak megfelelően egy 91, illetve egy 97 bp hosszú termék keletkezett. Ezen fragmentumok elválasztását aztán (1) hagyományos horizontális elektroforézis segítségével végeztük egyedi gél összetételt alkalmazva. A gélképen látott heteroduplex segítségével egyértelműen azonosíthatóak voltak a heterozigóták. A heteroduplex olyan kettős szálú DNS, melynek két lánc nem tökéletesen komplementer egymással. Ezen molekula elektroforetikus mobilitása – a nem komplementer szakaszon létrejövő

„szabálytalan” szerkezet miatt – mindig nagyobb, mint az azonos molekulatömegű, de szabályos szerkezetű DNS-é.



2. ábra. Az rs148797429 hosszúság polimorfizmus genotipizálása. RR: homozigóta a rövid allélra. HH: homozigóta a hosszú allélra. RH: heterozigóta. A: A PCR termék elválasztása hagyományos horizontális gél elektroforézis segítségével. B: A három genotípus azonosítása olvadáspont analízis segítségével. C: Fluoreszcensen jelölt PCR termékek elválasztása multikapilláris gélelektroforézissel.

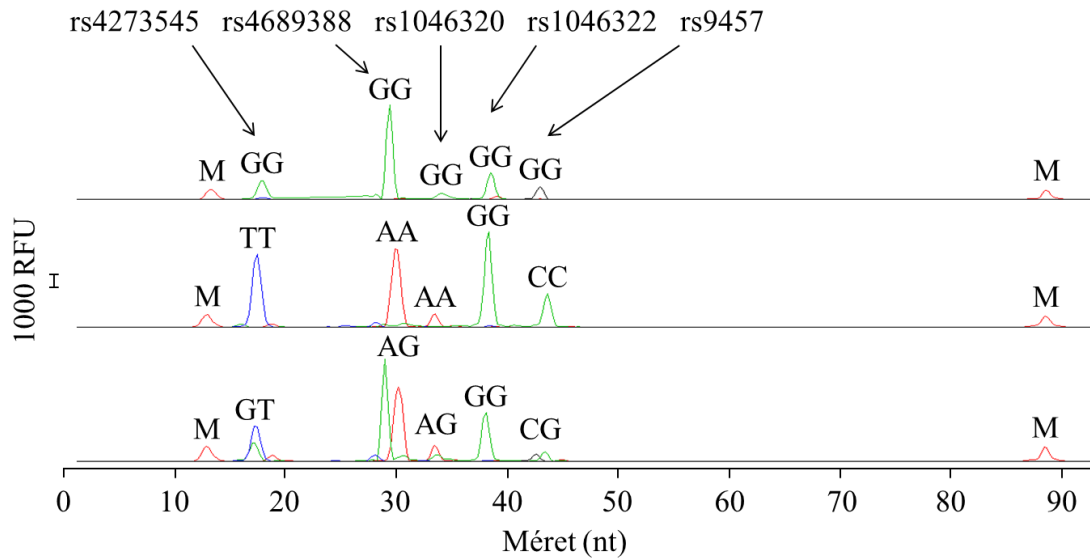
Munkacsoportunk korábban – egy másik VNTR genotipizálása kapcsán – egy egyszerű kísérlettel bizonyította, hogy a gélelektroforézis során látható legkisebb mobilitású termék valóban heteroduplex. Egy homozigóta „rövid/rövid” és egy szintén homozigóta „hosszú/hosszú” ge-notípusú DNS-ről készített PCR-terméket összekevertünk, és azt gélelektroforézissel vizsgáltuk. A vártak megfelelően az elválasztás során a két különböző méretű amplicon volt látható. Ezt követően az oldatot egyszer felmelegítettük 94 °C-ra, majd lassan lehűtöttük, aminek eredményeképp az elektroforézisen megjelent a – legalacsonyabb mobilitású, a heterozigóta minták genotipizálása során láthatóval azonos – harmadik termék. Ez egyértelműen bizonyítja,

hogy valóban heteroduplex kialakulásáról, s nem pl. aspecifikus PCR-termék képződéséről van szó. Emellett szól az az – indirekt – bizonyíték is, hogy a termék homozigóta genotípusú minták vizsgálata során sosem látható. A megfelelő hosszú futtatási idő segítségével a rövid és a hosszú allélok is megbízhatóan elváltak egymástól (2. *ábra* A része). Az olvadáspont analízis (2) gyors és egyszerű genotipizálást tett lehetővé. A rövid illetve a hosszú allélt tartalmazó homozigóták esetén egyetlen keskeny csúcsot kaptunk, köztük mindössze 1 °C-os olvadáspont különbséggel. A heterozigóták viszont egy szélesebb, gyakran két kisebb csúcsot mutató képet adtak (2. *ábra* B része). A megbízható genotipizálást azonban nehezítette az a tény, hogy az amplifikált régió más részein lévő ismeretlen szekvencia variációk is befolyásolhatják az olvadáspontot. Ha a PCR során az egyik primert Cy5 fluoreszcens festékkel jelöltük, az lehetővé tette, hogy a fragmentumok elválasztását multikapilláris gélelektroforézis segítségével (3) végezzük el. A berendezés nagy felbontóképességének segítségével egyértelműen elkülöníthetők egymástól a különböző hosszúságú termékek (2. *ábra* C része) [1].

5.2.2. A szabályozó régió SNP-inek multiplex genotipizálása

A szabályozó régiókban lévő 5 SNP egyidejű genotipizálására egy multikapilláris elektroforézisen alapuló módszert is beállítottunk. A módszer első lépésben egy hagyományos PCR segítségével amplifikáltuk a polimorfizmusok régióit. Mivel a két promoter SNP (rs4689388 és rs4273545) egymástól 1360 bp távolságra helyezkedik el, ezért két külön reakcióban történt a sokszorosítás. A 3' UTR-ben lévő SNP-k esetén (rs1046320, rs1046322, rs9457) viszont egyetlen, 776 bp hosszúságú termék tartalmazta mindhárom polimorfizmust. A terméket minden esetben enzimesen (rSAP és Exo I) tisztítottuk meg a főleg maradó dNTP-ktől, illetve a be nem kötődött primerektől. Az ezt követő extenziós PCR során olyan jelöletlen primert alkalmaztunk, melynek 3' vége az SNP-vel szomszédos nukleotidhoz hibridizál, ezt a primert a polimeráz csupán egyetlen láncterminátor, aciklo-nukleotiddal hosszabbítja meg. A láncterminátor nukleotidok különböző fluoreszcenciájú festékkel vannak megjelölve, így a kapott termék színe alapján a genotípus leolvasható. Az öt SNP egyidejű detektálását az extenziós primerek 5' végén lévő különböző hosszúságú poli-A szekvencia tette lehetővé: így az egyes SNP-khez tartozó jelölt termék mérete eltérő volt, így volt megvalósítható a multiplex elemzés, mivel a különböző nagyságú fragmentumok az

elválasztás során egymástól jól elkülöníthetők. Egy reprezentatív eredményt mutat be a 3. ábra. A termékek hosszából az adott SNP-re, míg a csúcsok színéből a genotípusra következtethetünk [I].



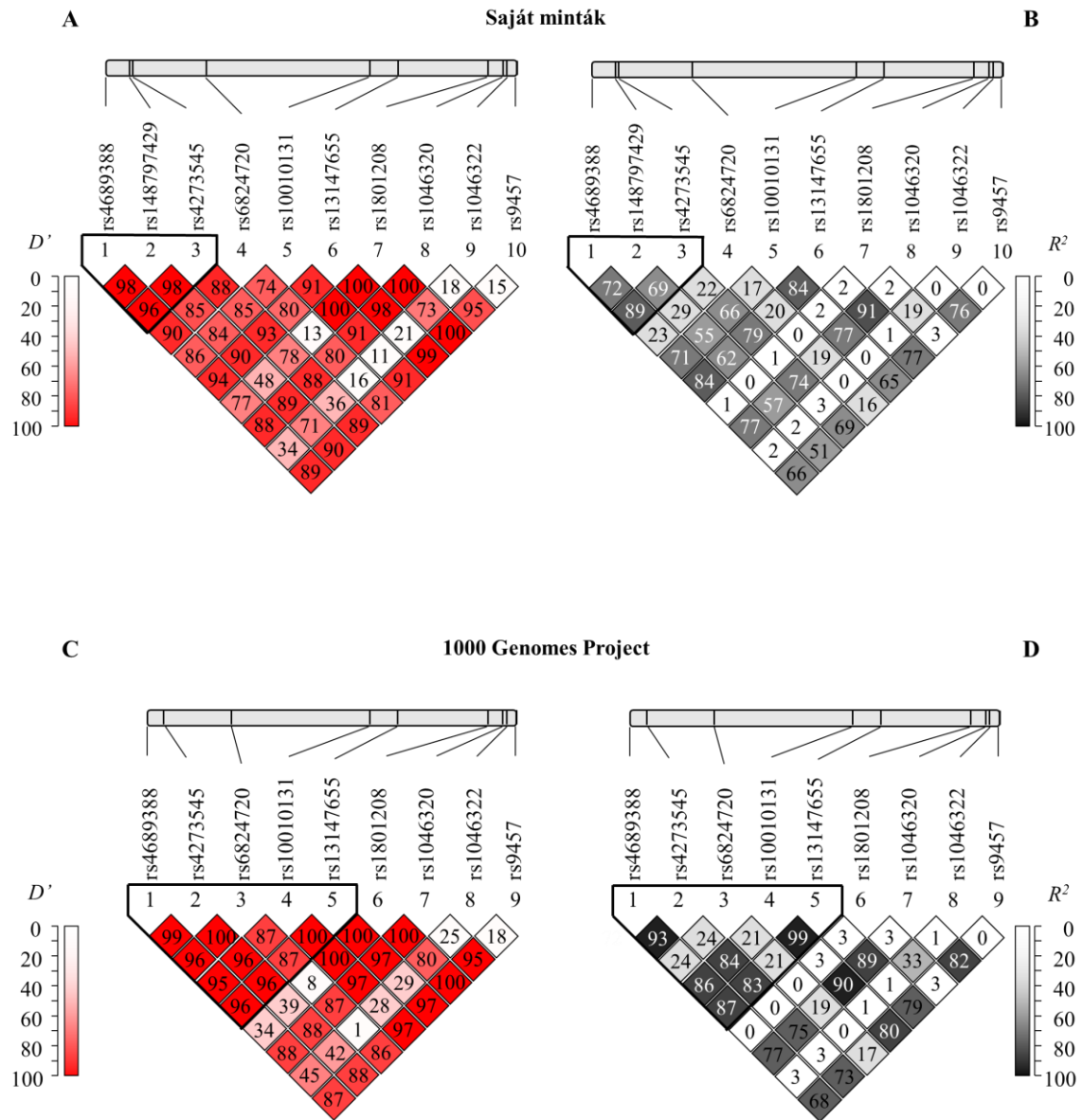
3. ábra. A szabályozó régió SNP-inek multiplex elválasztása kapilláris elektroforézis segítségével. M: egy 18 és egy 80 nukleotid hosszúságú marker. RFU: relatív fluoreszcenes egység

5.3. Kapcsoltság- és haplotípusanalízis

Az SNP-k kapcsoltságának megállapítása több okból is jelentős. Egyfelől olyan régiókon belül, ahol szoros LD (linkage disequilibrium) figyelhető meg, tehát nem létezik az összes elméletileg lehetséges haplotípus, elegendő egy vagy néhány SNP elemzése, mivel a többiek genotípusát ezek egyértelműen megmutatják. Ezeket az SNP-eket szokás tag-SNP-nek is nevezni. A másik fontos szempont az, hogy a genetikai asszociáció vizsgálatok során nem ritka, hogy a jelleggel asszociációt mutató polimorfizmusnak biológiai hatása nincs, csupán „kapcsolt” a tényleges fiziológiai funkcióval rendelkező SNP-vel. Amennyiben azonban a „funkcionális” SNP (tehát a biológiai hatással rendelkező SNP) megtalálása is célunk (ami a molekuláris háttér megismerése, illetve egy esetleges új gyógyszer célpont azonosítása stb. szempontjából jelentős), akkor az SNP-k közötti LD meghatározása alapvető fontosságú.

A kiválasztott *WFS1* polimorfizmusok kapcsoltságát a Haploview 4.2 program segítségével elemeztük. A 4. ábra mutatja az általunk vizsgált teljes populáció (beteg és kontroll minták is) kapcsoltsági térképét. Az ábra felső részén az egyes polimorfizmusok kromoszomális pozíciója, míg az alsó részen az egyes lókuszok páronkénti LD értékei láthatóak. Az egyes négyzetekbe írt számok tehát LD koefficiensnek jelentenek, melyek a négyzet két felső oldala irányában lévő polimorfizmusok kapcsoltságára vonatkoznak. A program kétféle LD értéket is számol, a Lewontin féle D' (sztenderdizált kapcsoltsági együttható – piros színnel jelölve) illetve R^2 (korrelációs koefficiens – fekete színnel jelölve) értékeket. Mindkét érték 0 és 1 közötti értéket vehet fel. A 0 jelenti azt, hogy a két allél függetlenül öröklődik egymástól, haplotípusuk frekvenciája megegyezik a külön-külön vett gyakoriságuk szorzatával, tehát egymással egyensúlyban („linkage equilibrium”) vannak. Ellenben ha ez az érték nagyobb (ennek megfelelően a négyzet sötétebb színű), akkor a megfelelő polimorfizmusok adott allélváltozatai nagyobb valószínűséggel fordulnak elő együtt, míg 1 esetén az elméleti 4 helyett csupán kettő allél-kombináció fordul elő az adott populációban. Bár a két mutató egymástól nem független, és a szélső értékeik is megegyeznek, mégsem teljesen ugyanúgy értelmezendők. A D' leginkább a kapcsoltsági egyensúly fennállását megbontó hatásokat jelzi, míg az R^2 az allélok függetlenségét, a lókuszok asszociációs jeleinek különbözőségét vizsgálja [81]. A program rajzolja meg azt a feketével bekeretezett területet, azaz haploblokkot, amelyen belül a polimorfizmusok között magas LD állapítható meg. Esetünkben a három, promoter régióban lévő polimorfizmus alkotott egy haploblokkot. Ezt az erős kapcsoltságot mutatja az a megfigyelés is, hogy az elméletileg lehetséges nyolcféle haplotípus közül több mint 90%-ban csupán két forma fordult elő (AHT: 62,9%, GHG: 28,5%). Ezekon kívül csupán másik két, jóval kisebb gyakoriságú haplotípust figyeltünk meg (GRG: 7%, ARG: 1,6%). A 1000Genomes adatbázis szabadon hozzáférhető adatait is letöltöttük, kiválasztottuk azokat a polimorfizmusokat, amelyeket mi is vizsgáltunk, és a kapcsoltsági elemzést ezen adatsor alkalmazásával is elvégeztük (4. ábra). Fontos megjegyezni, hogy az rs148797429 hosszúság polimorfizmus nem szerepelt a 1000Genomes adatai között. Látható, hogy az általunk vizsgált populáció nagy hasonlóságot mutat a 1000Genomes európai csoportjaival (FIN, IBS, GBR, TSI, CEU), azonban természetesen nem teljesen egyezik meg azzal. Általánosan magas kapcsoltsági értékek jellemzik ezt a régiót, mely

alól csupán az aminosav cserét okozó rs1801208, illetve a gén 3' UTR-ében elhelyezkedő rs1046322 miR-SNP jelent kivételt. A magas D' érték mellett megfigyelt viszonylag alacsony R^2 érték részleges kapcsoltságra utal, tehát a lehetséges négyféle haplotípus közül egy hiányzik [I].



4. ábra. WFS1 polimorfizmusainak kapcsoltsági ábrája. Az ábra felső részén a polimorfizmusok kromoszómális elhelyezkedése látható, míg alul az egyes kapcsoltsági értékek. A Lewontin féle D' (A és C rész) és az R^2 kapcsoltsági értékek (B és D rész) a saját genotípus adataink (A és B rész) illetve a 1000 Genom Projekt adatai (C és D rész) alapján.

5.4. Asszociáció vizsgálatok

A cukorbetegség háttérben álló genetikai tényezők azonosítása érdekében asszociáció vizsgálatot végeztünk. Mivel egy komplex kórkép genetikai háttérét vizsgáltuk, eset-kontroll modellt alkalmaztunk, amely során összehasonlítottuk a kiválasztott polimorfizmusok alléljainak gyakoriságát a beteg és az egészséges csoportban. Az asszociáció vizsgálatokban ma az allél alapú elemzés a leggyakoribb, amely esetén a mintaszám megkettőződik, mivel minden embernek egy apai és egy anyai allélja is van. A kettes típusú diabétesz allél szerinti elemzésének eredményeit a 7. táblázat tartalmazza.

7. táblázat. WFS1 polimorfizmusok és a kettes típusú diabétesz közötti allél szerinti asszociáció vizsgálata. *p*: a χ^2 -próba szignifikancia értéke. OR: esélyhányados (Odds ratio). Esetszámok kontroll: 2N = 1784, T2DM: 2N = 986.

Polimorfizmus	Rizikó allél	Gyakoriság		p	OR	OR 95%-os konfidencia intervalluma	
		Kontroll	T2DM				
rs4689388	A	0,58	0,67	4,62·10⁻⁵	1,47	1,22	1,76
rs148797429	R	0,66	0,74	1,55·10⁻⁴	1,45	1,20	1,76
rs4273545	T	0,58	0,66	5,34·10⁻⁵	1,46	1,21	1,75
rs6824720	G	0,875	0,824	0,004	1,505	1,137	1,990
rs10010131	G	0,689	0,609	2,5·10⁻⁴	1,425	1,178	1,722
rs13147655	G	0,689	0,606	4,5·10⁻⁴	1,444	1,176	1,774
rs1801208	G	0,956	0,950	0,550	1,151	0,725	1,828
rs1046320	A	0,674	0,592	1,1·10⁻⁴	1,429	1,191	1,714
rs1046322	A	0,139	0,094	0,001	1,555	1,191	2,032
rs9457	C	0,631	0,546	8,1·10⁻⁵	1,421	1,193	1,698

Mivel több polimorfizmust vizsgáltunk egyszerre, a statisztikai szignifikancia szintjét ennek megfelelően korrigálni kellett (többszörös tesztelésre történő korrekció). A meglehetősen konzervatív Bonferroni korrekciót alkalmaztuk, mely jelentősen lecsökkenti a statisztikai hipotézis-vizsgálatok első fajú hibájából eredő álpozitív eredmények valószínűségét. A korrekciót alkalmazva a statisztikai szignifikancia szintje

10 polimorfizmussal számolva $p \leq 0,005$ volt. A Bonferroni korrekció elvégzése után is szignifikáns eredményeket a táblázatokban kiemeléssel jelöltük. A viszonylag alacsony esélyhányados értékek a cukorbetegség bonyolult genetikai hátteréből fakadnak. Ezek az értékek magas szignifikancia szinttel párosulva ugyanakkor azt bizonyítják, hogy az általunk vizsgált *WFS1* polimorfizmusok egyenként kicsi, viszont egyértelmű szerepet játszanak a kettes típusú diabétesz genetikai hátterében. Noha nem egyedülálló, mégis talán érdekes, hogy az rs1046322 SNP kivételével a gyakori allél jelenti a rizikófaktort. Az egyes típusú diabétesz vizsgálatokor (8. táblázat) az rs1046322 SNP kiemelkedően magas szignifikancia és esélyhányados értéket mutatott, ami a polimorfizmus meghatározó szerepére utal.

8. táblázat. *WFS1* polimorfizmusok és az egyes típusú diabétesz közötti allél szerinti asszociáció vizsgálat. p : a χ^2 -próba szignifikancia értéke. OR: esélyhányados (Odds ratio). Esetszámok kontroll: $2N = 1634$, T1DM: $2N = 814$.

Polimorfizmus	Rizikó allél	Gyakoriság			p	OR	OR 95%-os konfidencia intervalluma	
		Kontroll	T1DM					
rs6824720	G	0,671	0,726	0,104	1,297	0,947	1,775	
rs10010131	G	0,366	0,430	0,046	1,305	1,004	1,696	
rs13147655	G	0,377	0,450	0,043	1,354	1,009	1,817	
rs1801208	G	0,919	0,919	0,988	1,004	0,597	1,688	
rs1046320	A	0,352	0,388	0,224	1,169	0,909	1,503	
rs1046322	A	0,012	0,086	$7,0 \cdot 10^{-10}$	7,641	3,608	16,186	
rs9457	C	0,303	0,375	0,013	1,377	1,068	1,776	

A 3' UTR-ben lévő SNP-k (rs1046320, rs1046322 és rs9457) esetén haplotípus elemzést is végeztünk, melynek eredményei a 9. és a 10. táblázatban láthatóak. Az adatok azt sugallják, hogy egyes típusú diabétesz esetén az rs1046322 SNP hatása a legjelentősebb. Azok a haplotípusok esetében figyelhető meg legnagyobb eltérés a beteg és a kontroll csoport gyakoriság értékei között, melyek tartalmazzák ezen polimorfizmus „A” (rizikó) allélját. A kapott alacsony p értékek ráadásul kimagasló

esélyhányadossal is járnak, ami megerősíti az SNP kiemelkedő szerepét a betegség genetikai hátterében. A kettes típusú diabétesz esetén ez a hatás nem volt megfigyelhető.

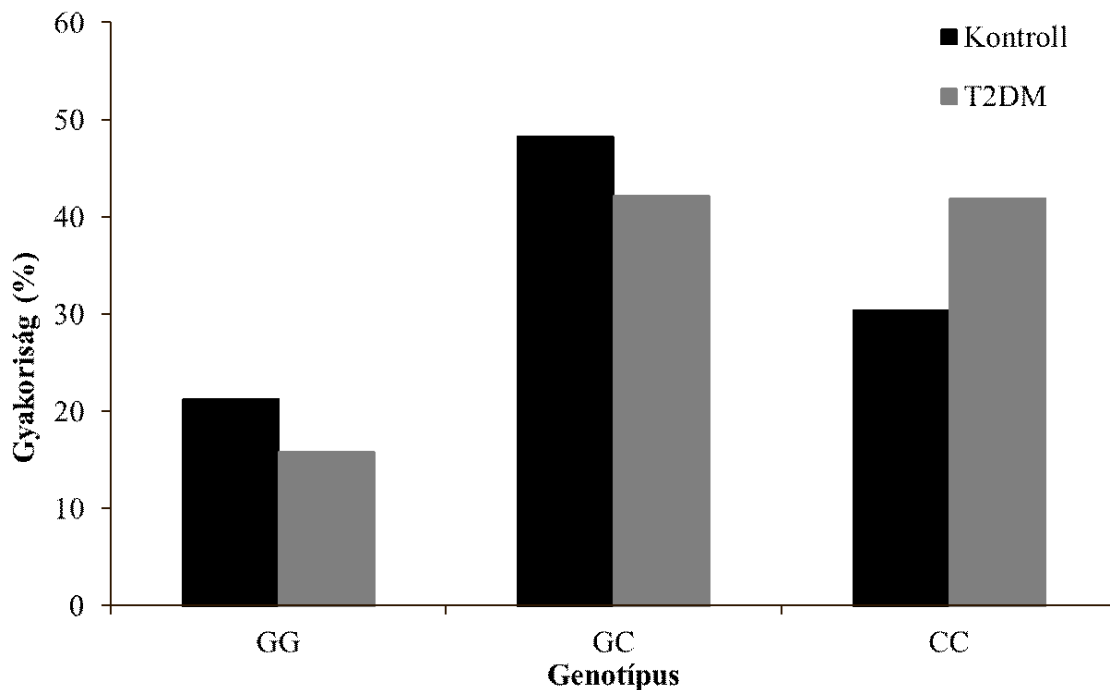
9. táblázat. A WFS1 gén 3' UTR-ében lévő SNP-k és az egyes típusú diabétesz közötti haplotípus elemzés. p: a χ^2 -próba szignifikancia értéke. OR: esélyhányados (Odds ratio). Esetszámok kontroll: 2N = 1634, T2DM = 814.

Haplotípus, rizikó allél	Gyakoriság		p	OR	OR 95%-os konfidencia intervalluma	
	Kontroll	T1DM				
rs1046322–rs9457, AC	0,042	0,124	3,4·10⁻¹⁴	3,262	2,369	4,492
rs1046320–rs9457, AC	0,542	0,548	0,790	1,023	0,864	1,211
rs1046320–rs1046322, AA	0,043	0,124	1,1·10⁻¹³	3,165	2,304	4,347
rs1046320–rs1046322–rs9457, AAC	0,042	0,120	2,8·10⁻¹³	3,152	2,285	4,348

10. táblázat. A WFS1 gén promoterében illetve 3' UTR-ében lévő SNP-k és a kettes típusú diabétesz közötti haplotípus elemzés. p: a χ^2 -próba szignifikancia értéke. OR: esélyhányados (odds-ratio). Esetszámok kontroll: 2N = 1784, T2DM: 2N = 986.

Haplotípus, rizikó allél	Gyakoriság		p	OR	OR 95%-os konfidencia intervalluma	
	Kontroll	T2DM				
rs148797429–rs4273545, RT	0,580	0,660	0,004	1,405	0,792	2,494
rs4689388–rs148797429, AR	0,586	0,671	0,002	1,441	1,201	1,729
rs4689388–rs4273545, AT	0,573	0,657	0,003	1,427	1,191	1,711
rs4689388–rs148797429–rs4273545, ART	0,573	0,656	0,003	1,421	1,186	1,703
rs1046322–rs9457, AC	0,067	0,038	0,001	1,843	1,267	2,681
rs1046320–rs9457, AC	0,626	0,555	0,001	1,341	1,127	1,596
rs1046320–rs1046322, AA	0,070	0,040	0,001	1,809	1,254	2,609
rs1046320–rs1046322–rs9457, AAC	0,066	0,038	0,002	1,805	1,238	2,630

Napjainkban a szakirodalomban a genetikai polimorfizmusok asszociáció elemzése során leggyakrabban az allél szerinti összehasonlítással találkozunk, ennek megfelelően munkánk során – alapesetben – mi is ezt a megközelítést alkalmaztuk. Bizonyos szemszögből mégis szemléletesebb, és a heterozigótákról valamint az öröklésmenetről több információt nyújt az az elemzési mód, ha a három genotípus csoportot külön-külön vizsgáljuk. Ezért az eset–kontroll elemzést minden polimorfizmus esetében ezen csoportosítás szerint is elvégeztük. Ennek egyik szemléletes példáját az 5. ábra mutatja, ahol a későbbiekben tovább vizsgált miR-SNP genotípus eloszlásai láthatóak.



5. ábra. Az rs9457 SNP genotípusainak eloszlása a kettes típusú diabéteszben szenvedő betegekben illetve a kontroll csoportban. Az eset–kontroll vizsgálat során a χ^2 -próba szignifikáns ($p = 2,7 \cdot 10^{-4}$) eltérést mutatott a beteg és a kontroll csoport között.

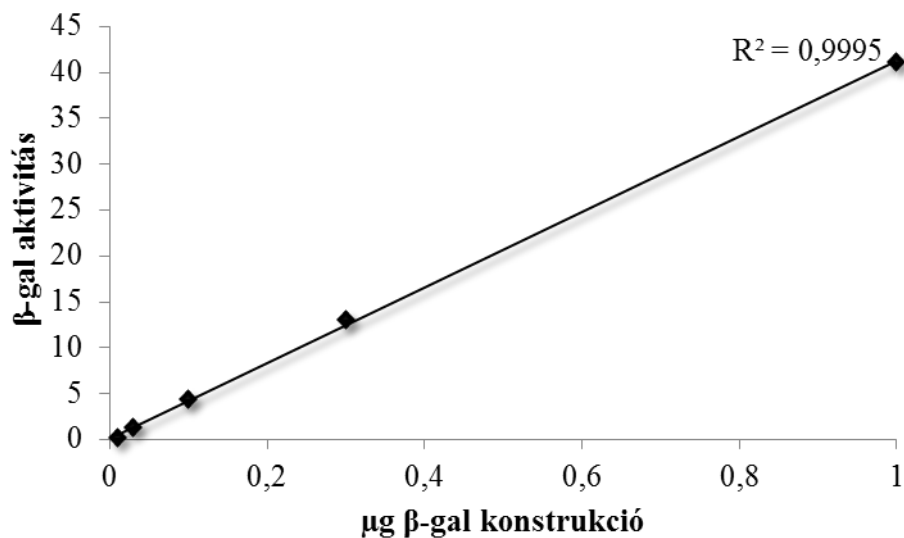
χ^2 -próba segítségével teszteltük a három genotípus csoport előfordulásának gyakoriságát a kettes típusú diabéteszes betegek illetve a kontroll személyek körében. Az ábra jól szemlélteti, hogy CC genotípus lényegesen gyakrabban fordult elő a betegek körében (42%, míg ez az érték a kontroll csoportban csupán 30%-nak bizonyult), ezzel szemben a heterozigóta GC csoport a GG homozigótákhoz hasonlóan az egészségesek között volt gyakoribb. A χ^2 -próba eredménye alapján a genotípus gyakoriságok megoszlásában megfigyelhető különbség statisztikailag szignifikáns ($p = 2,7 \cdot 10^{-4}$).

Ennek megfelelően a *WFS1* rs9457 C allélja a kettes típusú diabétesznek egyike lehetséges genetikai rizikófaktorának tekinthető [II].

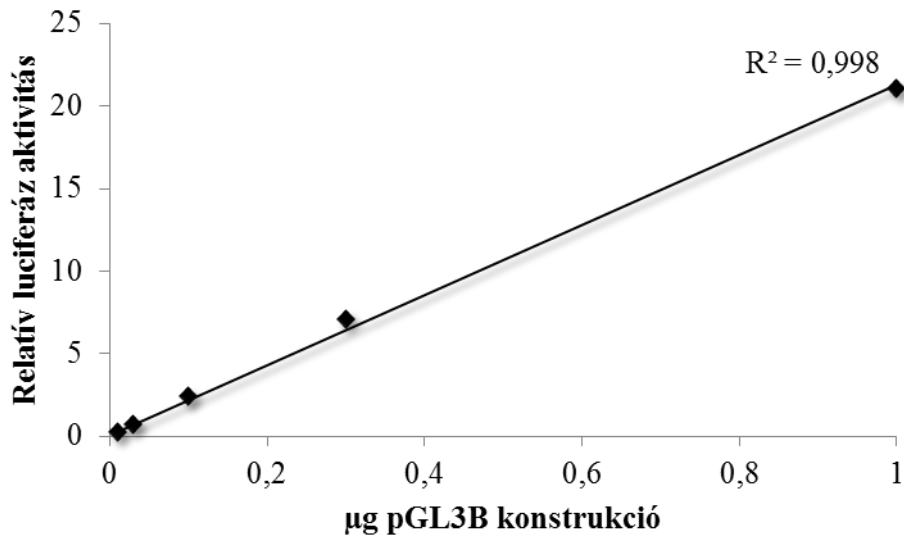
5.5. Szabályozó régiók polimorfizmusainak funkcionális vizsgálata

Munkánk további fő célkitűzése volt annak elemzése, hogy a vizsgált valamint cukorbetegséggel asszociációt mutató polimorfizmusokhoz biológiai hatás rendelhető-e. Mivel ezek az SNP-k a gén promoterében illetve 3' UTR-ében helyezkednek el, lokalizációjuknak megfelelően elsősorban szabályozó hatás: a transzkripció vagy a mikro-RNS kötődés befolyásolása révén a transláció aktivitásának megváltozása várható. Ezen funkciók elemzését *in vitro* sejtes rendszerben riporter konstrukciók alkalmazásával végeztük el. Első lépésként olyan rendszer kialakítása volt feladatunk, melynek alkalmazásával a mérések hatékonyan és megbízhatóan elvégezhetők, vagyis jól mérhető, kellően magas jelet kapunk anélkül, hogy az egyes fehérjéket a sejtekben a szükségesnél nagyobb mértékben túltermeltetnénk a transzfekciós kísérletek során. Előkísérleteink során ennek megfelelően meghatároztuk a transzfektálandó konstrukciók legoptimálisabb mennyiségét. A belső kontrollként használt β -galaktozidázt tartalmazó konstrukcióból hígítási sorot készítettünk, majd ezekkel transzfektáltunk, és ONPG szubsztrát alkalmazásával, fotométerrel enzimaktivitás mérést végeztünk (6. ábra A része). A pGL3B (6. ábra B része) illetve a pMIR (6. ábra C része) konstrukciók esetén is hasonló hígítási sor elemzését végeztük el luminometriás elemzéssel.

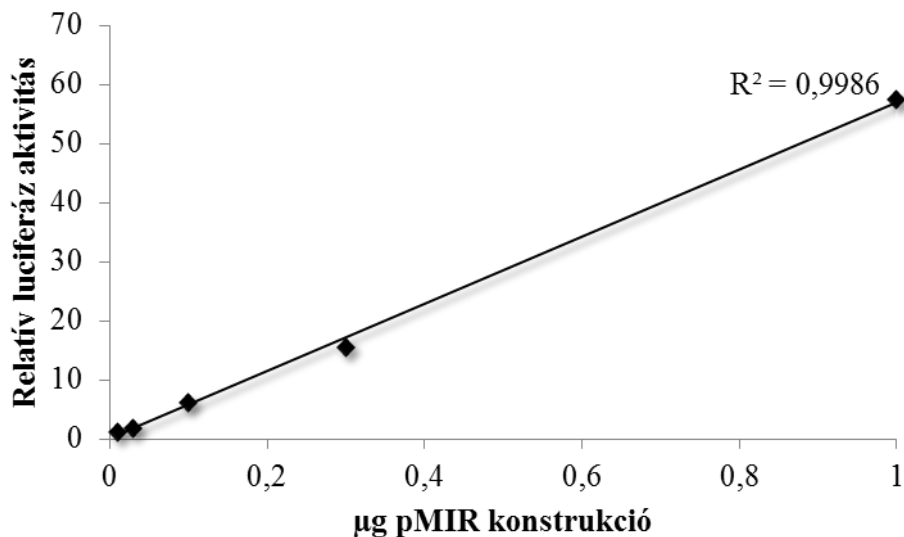
A



B



C



6. ábra. A transzekciónál használt konstrukciók optimális mennyiségének meghatározása. A megfelelő konstrukcióból (A: pMIR-REPORT β -galaktozidáz, B: pGL3B, C: pMIR-REPORT) hígítási sort készítettünk, és fotometriás ill. luminometriás módszerrel határoztuk meg az enzimaktivitást (ami a képződő fehérje mennyiségével arányos). A lineáris regresszió során kapott magas determinációs együttható értékek (R^2) azt mutatják, hogy a rendszer az alkalmazott koncentráció tartományban megbízhatóan működik.

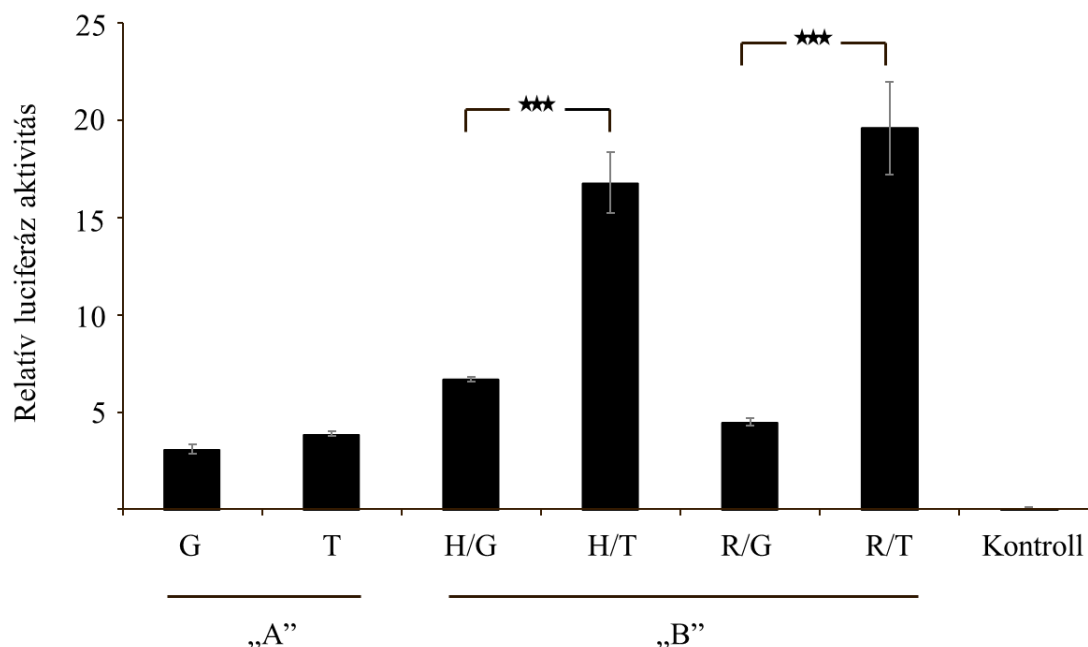
A végső kísérletekhez a β -galaktozidáz esetén a 0,2 μg , a pGL3B esetén 0,125 μg , míg a pMIR konstrukciónál a 0,05 μg mennyiségeket választottuk. Mindig próbáltunk olyan koncentrációt választani, ahol a mért luciferáz aktivitás értékek már elég magasak

ahhoz, hogy megbízható méréseket végezzünk, viszont ezzel együtt szeretnénk volna még abban a dinamikus tartományban maradni, ahol a változásokat legnagyobb megbízhatósággal ki lehet mutatni.

5.5.1. Promoter régió

Az rs148797429 és az rs4273545 polimorfizmusok a *WFS1* gén promoter régiójában helyezkednek el, ezek expresszióra gyakorolt hatását *in vitro* sejtes rendszerben vizsgáltuk. Ricketts és mtsai [82] eredményei alapján a *WFS1* minimál promotere a –233. és a +104. nukleotid között helyezkedik el, az 5' szekvencia hosszának további növelése a promoter aktivitásban szignifikáns emelkedését nem eredményezi. Ezt szem előtt tartva egy rövidebb (338 bp, „A”) és egy hosszabb (554 bp, „B”) konstrukciót hoztunk létre a polimorfizmusok biológiai hatásának elemzéséhez. A „minimál promotert” magában foglaló rövidebb konstrukció csupán az rs4273545 SNP-t tartalmazta. Szerettük volna azonban a korábban mások által még nem vizsgált hosszúság polimorfizmus (rs148797429) hatását is tanulmányozni. Ezért hoztuk létre a hosszabb („B”-vel jelölt) konstrukciót, ami a gén –449-től +106-ig tartó régióját tartalmazta. Ebben a konstrukcióban mind az rs148797429, mind pedig az rs4273545 polimorfizmus megtalálható. A különböző allélokat tartalmazó konstrukciókat (összesen 6 variánst) irányított mutagenézissel hoztuk létre. Egy HEK293T sejtvonalon végzett reprezentatív luciferáz mérés eredményét mutatja be a 7. ábra. Kontroll vektorként egy üres pGL3Basic vektort használtunk, amihez képest mind a rövidebb („A”), mind pedig a hosszabb („B”) konstrukció szignifikánsan magasabb relatív luciferáz enzim aktivitás értékeket mutatott. Ezek az eredmények alátámasztják, hogy mind a rövidebb, mind a hosszabb régió promoter aktivitással rendelkezik. Ha a rövidebb („A”), csupán az rs4273545 SNP-t tartalmazó konstrukciót alkalmaztuk, nem mutatkozott szignifikáns különbség a „G” illetve a „T” allélt tartalmazó promoter szakasz expresszióra kifejtett hatása között. A hosszabb („B”), rs148797429 hosszúság polimorfizmust is tartalmazó konstrukciók vizsgálata azonban több érdekes megfigyelést is eredményezett. A rs148797429 – (R) / GGGGCG (H) polimorfizmus önmagában nem befolyásolja a transzkripció aktivitását, tehát ha az SNP ugyanazon allélja mellett a konstrukció különböző hosszúságú formát tartalmaz (H/G illetve R/G, vagy H/T illetve H/G), hasonló relatív luciferáz aktivitások figyelhetők meg. Ugyanakkor mégis úgy tűnik, hogy ezen variáns – illetve a polimorfizmust tartalmazó génszakasz – hozzájárul a promoter aktivitásának szabályozásához. Ha ugyanis ez a régió is jelen van a konstrukcióban, az rs4273545 SNP G

illetve T allélja eltérő transzkripciós aktivitáshoz vezet. T variáns jelenléte esetén a relatív luciferáz aktivitás kb. 2,5-szer akkora, mint a G allél jelenléte esetén, tekintet nélkül arra, hogy mellette az rs148797429 polimorfizmus hosszabb vagy a rövidebb allélja áll [I].

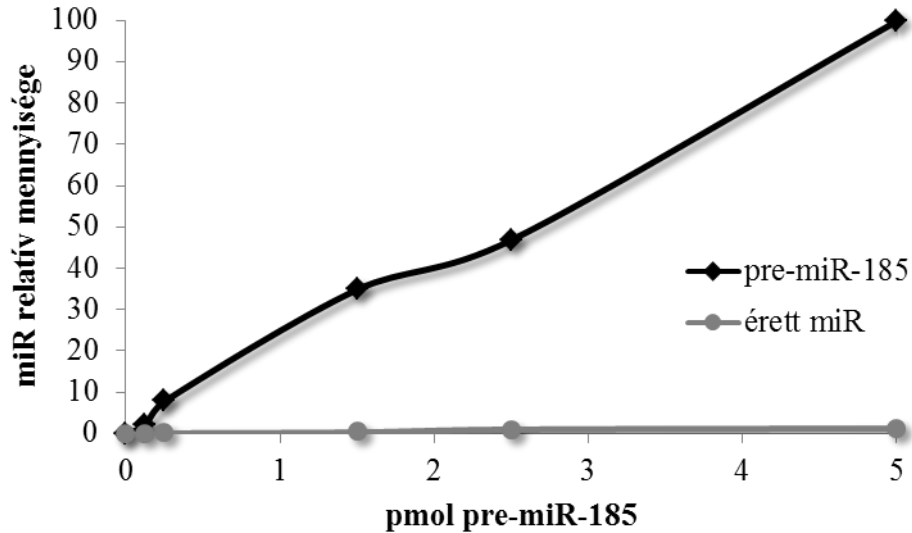


7. ábra. Különböző hosszúságú („A” és „B”) promoter régiók, illetve az azokban lévő polimorfizmusok expresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata in vitro sejtes rendszerben. Az „A” 338 bp hosszúságú konstrukció csak az rs4273545 SNP-t tartalmazza. A „B” 554 bp hosszúságú konstrukció, mind az rs148797429 VNTR-t, mind pedig az rs4273545 SNP-t tartalmazza. Kontroll: üres pGL3Basic vektor. A relatív szórások három független kísérlet eredményeit mutatják (***) $p < 0,001$

5.5.2. 3' nem transzlálódó régió

A 3' UTR vizsgálatok a különböző konstrukciók és a β -galaktozidáz mellett egyidejűleg pre-miR-185-tel is transzfektáltuk a sejteket. Ezért először arra voltunk kíváncsiak, hogy az általunk alkalmazott sejtes rendszerben rendelkezésre áll-e az összes feltétel ahhoz, hogy a pre-mikro-RNS-ből elkészüljön az érett mikro-RNS. Ehhez a sejteket növekvő mennyiségű pre-mikro-RNS-sel transzfektáltuk, majd real-time PCR segítségével mértük mind a prekursor, mind pedig az érett mikro-RNS szintjét. Az 8. ábrán látható, hogy a kísérlet során a pre-mikro-RNS szintje nem változott, végig a nullához közel maradt, míg az érett mikro-RNS mennyisége

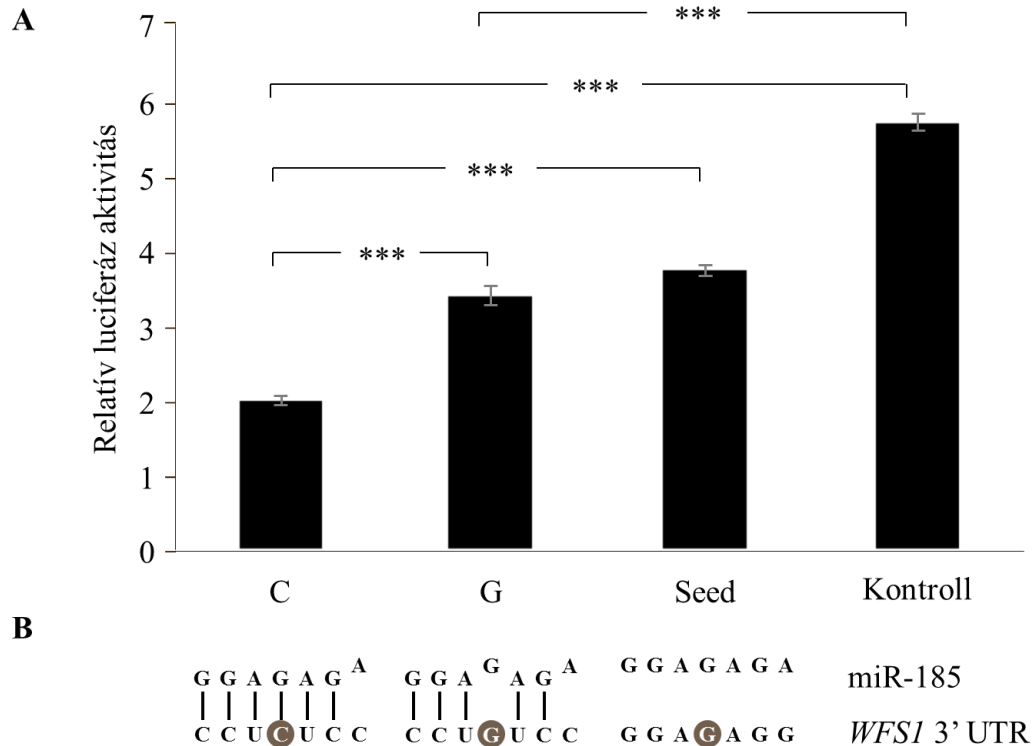
folyamatosan nőtt. Ebből arra következtethetünk, hogy az összes prekurzor átalakult érett mikro-RNS-sé. Ezen eredmények illetve irodalmi adatok alapján a további kísérletek során 5 pmol mikro-RNS-t használtunk.



8. ábra. A miR-185 érésének vizsgálata. HEK293T sejtek transzfektáltunk különböző mennyiségű pre-mikro-RNS-sel, majd real-time PCR alkalmazásával határoztuk meg az érett illetve a pre-mikro-RNS szintjét.

Az rs9457 mikro-RNS kötődését befolyásoló szerepét *in vitro* sejtes rendszerben luciferáz konstrukció alkalmazásával vizsgáltuk. A PolymiRTS [74] adatbázis szerint ez az SNP a miR-185-ös mikro-RNS seed régiójában helyezkedik el. Ezt az *in silico*, csupán szekvencia adatokon alapuló feltételezést biológiai rendszerben eddig nem bizonyították: erre a mikro-RNS-re vonatkozó adat sem az irodalmi adatok között, sem a miRTarBase [83] valamint a Mirwalk [75] adatbázisban nem szerepelt. A fehérje expresszióra kifejtett hatás elemzéséhez a *WFS1* gén ismert genotípusú (AA), teljes 3' UTR régióját pMIR-Report vektorba klónoztuk. Irányított mutagenézis segítségével hoztuk létre a másik allélváltozatot tartalmazó konstrukciót, valamint a seed mutánst. Ezen utóbbi konstrukcióban a miR-185 seed szekvenciájának mind a hét bázisát kicseréltük az eredeti komplementerére, tehát ekkor a seed régióban egyáltalán nem történik bázispárosodás a mRNS és a mikro-RNS között. Létrehoztunk továbbá egy olyan kontroll konstrukciót is, amelyben az inzert a *WFS1* gén 3' UTR-ével megegyező hosszúságú, de attól különböző szekvenciájú, valamint a miR-185 felismerési szekvenciáját nem hordozó DNS-fragmentum volt. A további méréseket ezen 4

konstrukció alkalmazásával végeztük el. A mért luciferáz enzim szinteket minden esetben β -galaktozidáz aktivitás értékekkel korrigáltuk.



9. ábra. A *WFS1* rs9457 miR-SNP miR-185 kötődésére gyakorolt hatásának vizsgálata luciferáz riportter konstrukció segítségével. A *WFS1* teljes 3' UTR régióját pMIR-Report vektorba klónoztuk. A „C” konstrukció az rs9457 C allélját, a „G” konstrukció pedig annak G allélját tartalmazta. A „Seed” konstrukció a miR-185 seed szekvenciájának komplementerét tartalmazta. Kontrollként a *WFS1* 3' UTR-ével megegyező hosszúságú, de attól eltérő szekvenciájú konstrukciót használtunk. A relatív szórások három független kísérlet eredményeinek mutatják (***) $p < 0,001$). Az ábra B részén a miR-185 és a gén 3' UTR-ének szekvenciái, illetve a lehetséges bázispárosodások láthatóak, sötét háttér: rs9457 SNP.

A legalacsonyabb relatív luciferáz aktivitást az rs9457 SNP C alléljának esetében mértünk, ami csupán 35%-a volt a kontroll plazmid aktivitásnak (9. ábra). Az ettől csupán egy bázisban eltérő G allél 1,7-szeres enzimaktivitás növekedést mutatott, ami gyakorlatilag megegyezett a seed mutáns aktivitás értékeivel. A szekvencia adatok alapján C allél esetén a miR-185 7 bázis hosszú „seed” régiójából csupán 6 komplementer a *WFS1* mRNS 3' UTR régiójával. A G allél így már csak 5 komplementer bázist jelent, ami még tovább gyengíti a miR-185 bekötődésének hatékonyságát [II].

6. MEGBESZÉLÉS

6.1. A wolframin szerepe a cukorbetegségben

Az elmúlt pár évtizedben világszerte megnégyszereződött a cukorbetegek száma. A kórkép több, mint 425 millió diabéteszes embert érint, és évente 1,6 millió ember halálát okozza közvetlenül, és további 2,2 millióan a magas vércukorszint valamilyen következményeként veszítik életüket. Az egészségügyre fordított kiadások 12%-át a cukorbetegek kezelése teszi ki (<https://www.who.int/diabetes/en/>). Egészséges étkezéssel, rendszeres sportolással, dohányzásmentes étellel azonban nagymértékben megelőzhető illetve késleltethető a kettes típusú diabétesz kialakulása. A késői diagnózis megnöveli a szövődmények kialakulásának kockázatát. Noha számos lehetséges genetikai rizikótényezőt azonosítottak már a betegség hátterében, a pontos patomechanizmus mindmáig ismeretlen. Több diabétesz vizsgálatban vetődött föl a *WFS1* gént a lehetséges kandidáns gének körében [59, 78-80, 84-86], ugyanakkor a pontos molekuláris magyarázat – azaz a gén termékének funkciója és a cukorbetegség közötti egyértelmű molekuláris szintű kapcsolat – még nem teljesen tisztázott. Eredményeinkkel magyar populáción is igazoltuk, hogy a gén több SNP-je asszociációt mutat a cukorbetegséggel. A polimorfizmusok molekuláris szerepét tovább kutatva, *in vitro* vizsgálatokkal elemeztük, hogy hogyan befolyásolhatják a különböző polimorf variánsok a keletkező fehérje mennyiségét. Eredményeink alapján a gén 3' UTR szakaszában lévő miR-SNP-k valamint a transzkripció faktor kötőhelyeket érintő polimorfizmusok sejtes rendszerben jelentősen megváltoztatják a gén kifejeződésének mértékét, ami egy lehetséges molekuláris mechanizmust jelenthet arra vonatkozóan, hogy hogyan befolyásolhatja egy SNP a fenotípust. A hasnyálmirigyben megjelenő megváltozott wolframin szintje az ER diszfunkcióját okozhatja, ami az inzulinszekréción keresztül fontos szerepet játszhat a betegség patomechanizmusában. Egy másik vizsgálatban a *WFS1*-hiányos β -sejtekben szintén megnövekedett ER stresszt illetve csökkent inzulin mennyiséget figyeltek meg. ER stressz indukció hatására ezekben a β -sejtekben sérült az inzulin feldolgozása, valamint a glükóz indukálta inzulin szekréció [87, 88]. *WFS1*-hiányos egerekben megnövekedett inzulin igény hatására fokozódott a β -sejtek apoptózisa [89]. A *WFS1* gátolja az ATF6 α -t, így gyengíti az ERSE (ER stress response element) promoterének aktivitását, tehát az ER stressz

jelátviteli útvonalait [41]. Több kutatás bizonyította, hogy ER-stressz hatására fokozódik a *WFS1* expressziója. Az ER-stresszt kiváltó thapsigargin illetve dithiothreitol kezelés hatására a szigetsejtekben megnövekedett *WFS1* mRNS illetve wolframin expressziót mutattak ki. Tunikamicin hatására az mRNS szintje szintén megnőtt, viszont a fehérje mennyisége ezzel nem korrelált, mivel a tunikamicin N-glikoziláció gátlása révén a wolframin stabilitásának csökkenését okozta[90]. MIN6 sejtvonalat a *WFS1* promoterét tartalmazó konstrukciókkal, illetve tapsigarginnal vagy tunikamicinnel együtt transzfektálva azt tapasztalták, hogy ezen ER-stressz induktorok fokozták a *WFS1* promoterének aktivitását [91]. Az ER-stressz során fontos szereppel bíró *XBPI* hatására közel 10000 gént vizsgálva, leginkább a *WFS1* expressziója fokozódott. A *WFS1* promoter régiója tartalmaz egy ERSE (ER-stress response element) szekvenciát, és noha az *XBPI* nem köt közvetlenül ehhez a régióhoz, mégis alapvető fontosságú a *WFS1* *XBPI* által történő szabályozása során [92].

6.2. A szabályzó régiók szerepe

A *WFS1* gén promoter régiójának feltérképezése során *in silico* illetve *in vitro* riporter konstrukciók alkalmazásán alapuló eljárásokat alkalmaztak. A tanulmány eredményei alapján a „minimál promoter” régió a -49. és a +104. bp között található, -49 és -233 között egy fontos aktiváló régió helyezkedik el, míg a -233. és a -327. nukleotid közötti szakaszon egy negatív szabályozó szekvencia van. *In vitro* EMSA (electrophoretic mobility band shift assay) valamint *in vivo* ChIP (Chromatin Immuno Precipitation) módszerek segítségével igazolták, hogy mind az Sp1, mind pedig az Sp3 transzkripciós faktorok kötődnek a minimál promoter régiójában lévő GC-boxokhoz. Riporter konstrukciók mutagenézisével bizonyították, hogy a *WFS1* megfelelő expressziójához ugyanakkor nem csak ezek a minimál promoter régióban lévő GC boxok, hanem az aktiváló régió CCAT boxai is szükségesek [82]. Saját eredményeink azt sugallják, hogy bár a rövidebb régió is rendelkezik promoter aktivitással, a teljes transzkripciós mechanizmushoz szükség van további az 5' régió hosszabb szakaszára, és a minimál promoter szekvencia nem mindig elégséges a teljes szabályozó mechanizmus megvalósulásához. Egy másik tanulmány szintén luciferáz rendszerben vizsgálta a *WFS1* promoterében lévő 5 SNP (rs4689388, rs4320200, rs13107806, rs13127445, rs4273545) expresszióra gyakorolt hatását. Ezek az SNP-k egy haploblokkot alkotnak,

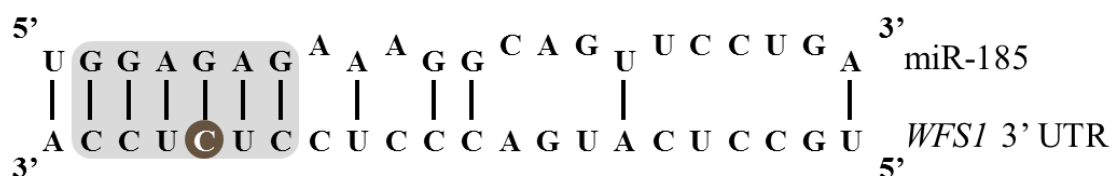
és szekvencia adatok alapján különböző alléljaik megváltoztatják transzkripciós faktorok kötőhelyének szekvenciáját. Ezen munka eredményei alátámasztják az rs4273545 SNP általunk is megfigyelt fontos szerepét, amely szorosan kapcsolt a GWAS vizsgálatokból ismert kandidáns rs4689388 SNP-vel. Az eredmények alapján azonban úgy tűnik, hogy az rs4689388 SNP-nek nincs szignifikáns hatása az expresszióra, ez a polimorfizmus tehát – a magas kapcsolttság révén – a tényleges biológiai funkcióval rendelkező variáns illetve a betegség „genetikai markere”. Számos más kutatáshoz hasonlóan ez a munka is csupán SNP-k elemzését tűzte ki célul, így az irodalomban a – technikailag nehezebben genotipizálható – rs148797429 inzerció / deléció típusú variációról lényegesen kevesebb adat áll rendelkezésre [93]. Egy hosszabb génszakaszt érintő polimorfizmus – éppen kiterjedéséből adódóan – ugyanakkor valamilyen szabályozó faktor bekötődésére sok esetben jelentősebb hatással van, mint az egyetlen nukleotidot érintő SNP, munkánk során ezért fektettünk nagy hangsúlyt ezen polimorfizmus vizsgálatára.

Csak az elmúlt évtizedben – az intergénikus régiók vizsgálata során – derült ki, hogy a mikro-RNS-eknek is épp oly fontos szerepe van a gének szabályozásában, mint a korábban már jól ismert fehérjéknek, a transzkripciós faktoroknak. Több tanulmány igazolta, hogy a miRNS-ek szerepet játszanak mind a T1DM mind pedig a T2DM patogenezisében. A megváltozott miRNS szintek markerként szolgálhatnak a diagnózis, illetve a prognózis során. A diabétesz vizsgálatok során a miRNS-ek illetve célgénjeik azonosítása új terápiás célpontokat jelenthetnek. Kimutatták, hogy a T1DM-ben kialakuló autoimmunitásban és β -sejt diszfunkcióban is szerepet játszhatnak ezek a szabályozó molekulák. A miR-150, miR-146a és a miR-424 T1DM betegek vérmintáiban csökkent expressziót mutatott mind a T2DM, mind pedig az egészséges mintákhoz képest. A glutaminsav dekarboxiláz elleni antitestek (glutamic acid decarboxylase antibodies, GADA) kimutatása segíthet az autoimmun eredetű T1DM diagnózisa során, valamint a családi érintettség felderítésében. GADA pozitív személyeket a GADA negatívakkal összehasonlítva, szintén az említett miRNS-ek szintjének szignifikáns csökkenést tapasztalták, ami a vizsgált miRNS-ek autoimmun folyamatokban való részvételét veti fel. Ez alapján ez a három miRNS a T1DM biomarkerének tekinthető, valamint segítségükkel új bepillantást nyerhetünk a betegség hátterében álló molekuláris folyamatokba [94]. A pankreász szigetsejtekben legnagyobb

mennyiségben a miR-375 expresszáldik [95]. A vérből izolált miR-375 megnövekedett mennyisége a β -sejtek pusztulására utal, így ez a miRNS is az egyes típusú cukorbetegség potenciális biomarkere lehet [96]. A miR-375 gátolja a glükóz stimulálta inzulin szekréciót. Az endogén miR-375 funkciójának gátlása növelte az inzulin felszabadulását, míg túltermeltetése célgénje, a MTPN (myotrophin) expressziójának csökkentése révén károsította az inzulin szekréciójának útvonalát [97]. A foszfatidil-inozitol-3 kináz útvonalában szereplő PDK1 (foszfatidil-inozitol függő kináz-1) szintén a miR-375 egyik célgénje. Inzulinoma sejtvonalon és patkány modellen a miR-375 hatására csökkent PDK1 expressziót és glükóz szekréciót figyeltek meg. Glükóz hatására pedig csökkent a miR-375 prekursorának szintje, ezáltal nőtt a PDK1 expressziója [98]. A T2DM-ben kimutatott miRNS mintázat megváltozásával kapcsolatos széleskörű irodalmi adatokat az *in silico* elemzésekkel egybevetve kiderült, hogy a mikro-RNS-eknek fontos szerepük van mind a szénhidrát-, mind pedig a lipidanyagcserében, valamint részt vesznek az inzulin jelpályában is [99]. T2DM betegek plazmájának miRNS mintázatát vizsgálva csökkent miR-126 mutattak ki [100]. T2DM patkánymodellen vizsgálva a betegség kialakulását, a különböző stádiumokra eltérő miRNS mintázat volt jellemző. Ezeknek a miRNS-eknek a segítségével a betegség progressziója, a kezelés hatásossága jósolható lehet [101].

A miR-185, illetve szabályozó szerepének fontossága akkor került középpontba, amikor felismerték, hogy expressziójának szintje fontos szerepet játszik az onkogenezis során [102]. Így a miR-185-tel kapcsolatos korai vizsgálatok főként a különböző tumoros betegségekre koncentráltak [103-105]. Az így szerzett ismeretek mind azt bizonyították, hogy a miR-185 hozzájárulhat a sejtproliferáció illetve az apoptózis szabályozásához. Az újabb kutatások ugyanakkor rávilágítottak arra, hogy a miR-185-nek a β -sejtek fejlődésében is szerepe lehet. Kettes típusú cukorbetegség plazmájában, illetve diabéteszes egerek sziget sejteiben szignifikánsan alacsonyabb miR-185 szintet mutattak ki. Sejtvonalakon a miR-185 gátlásával csökkent glükóz indukálta inzulin szekréciót figyeltek meg. Alacsony miR-185 szint mellett magasabb apoptózist tapasztaltak. A miR-185 egyik célgénje a SOCS3 (suppressor of cytokine signaling 3). Cukorbetegségben az alacsonyabb miR-185 szint magasabb SOCS3 expresszióval társult [106], ami többféle hatásmechanizmussal szintén hozzájárulhat az inzulin jelátviteli út befolyásolásához. Magas zsírtartalmú táplálékkal etetett egerekben emelkedett miR-

185- illetve koleszterinszintet mértek. Magas koleszterin szinttel rendelkező betegek szérumban ötszörös mennyiségű miR-185 expressziót mértek a kontroll személyekhez képest [107]. Noha igazolták a miR-185 szabályozó szerepét a koleszterin szintézisében, a kulcsgének szabályozásában betöltött szerepe, a különböző jelátviteli útvonalakon keresztül a diabétesz hátterében álló pontos biológiai szerepe mindmáig tisztázatlan. Az eddig megjelent irodalmi eredmények, és a saját funkcionális vizsgálataink alapján a miR-185, illetve annak kötőhelyét érintő rs9457 miR-SNP egy lehetséges diagnosztikus, prognosztikus biomarkere, és terápia célpontja lehet a cukorbetegségnek.



10. ábra. A miR-185 és a WFS1 3' UTR-ének szekvenciája, illetve a lehetséges bázispárosodások. A szekvenciában szürkével kiemelve a 6 bázis hosszúságú, komplementer seed szekvencia, illetve az általunk vizsgált rs9457-es miR-SNP látható.

Bár számos adatbázis tanúsága szerint a miR-185 kötődik a WFS1 gén 3' UTR-éhez, a gén illetve a miRNS szekvenciájának elemzése alapján látható, hogy a komplementaritás még a miRNS 5' 2–8. nukleotidnyi szakaszában sem tökéletes (10. ábra). Nem ismeretlen ugyanakkor, hogy a rövidebb (jelen esetben 6 nukleotid hosszúságú) vagy tökéletlenül bázispárosodó seed szakasz ellenére a két RNS között stabil kapcsolat alakul ki, ehhez hozzájárulhat az, hogy a miRNS 3' régiója is H-kötéseket képez a szabályozott mRNS-sel. A rövidebb seed régió közepén elhelyezkedő SNP (10. ábra) ugyanakkor mégis várhatóan nagyobb mértékben befolyásolja a két molekula kapcsolódásának hatékonyságát: ez állhat a hátterében annak, hogy a luciferáz mérések során az rs9457 G allél a seed mutánsához hasonló magas expressziót mutatott, azaz a miRNS bekötődése feltételezhetően jelentősen csökkent [108]. Kimutatták, hogy a mikro-RNS kötődése 8 nukleotid hosszúságú seed szekvencia esetén a leghatékonyabb, ami – a fentiekben megfelelően – az mRNS és a mikro-RNS további szakaszainak komplementaritása jelentősen befolyásolhat. A két nukleinsav közötti

kapcsolódás hatékonyságát emellett jelentősen növelheti az, ha a miRNS kötőhelye több kópiában jelen van a célgén 3' UTR-ében [109]. Noha az mRNS–mikro-RNS kapcsolódás mechanizmusát régóta kutatják, a kötődés minimális feltételei mindmáig tisztázatlanok. Kiderült, hogy csupán a seed szekvencia tökéletes bázispárosodása sem jár mindig együtt az expresszió csökkenésével. *In vitro* eredmények alapján a 3' UTR-ben lévő AU gazdag régió jelenléte, a felismerési hely 3' UTR-en belüli lokalizációja szintén hozzájárulhat a mikro-RNS kötődésének befolyásolásához, ezáltal hatással lehet a génkifejeződés szabályozására [110]. Ezek a szempontok állnak annak háttérében, hogy a több adatbázisban csupán szekvencia analízis alapján jóslott mRNS–miRNS interakcióknak csupán töredékét sikerült eddig *in vitro* vagy *in vivo* rendszerben bizonyítani.

6.3. Hiányzó örökletesség

Az emberi genomot alkotó DNS-molekulák bázissorrendje 2003 óta ismert, és bárki számára elérhető: alapvető kiindulási pontot jelent ez mind az orvosi genetikai területén mind elméleti (kutatás), mind gyakorlati (diagnosztika) szempontból. Ugyanakkor az elmúlt kb. 1,5 évtized eredményei és kutatási irányvonalai egyértelműen bizonyítják, hogy a genom ismerete csupán kiindulópontnak tekinthető: ezen információ megértése, alkalmazása számos területen a mai napig komoly kihívást jelent. Ennek egyik példája a komplex jellegek és kórképek genetikai háttérének kutatása, mely napjainkban is számos – sok esetben nemzetközi kollaboráción alapuló – projekt célkitűzése. Az intenzív kutatások ellenére a már feltárt örökletes komponensekkel a különböző kórképek heritabilitásának csupán 6–50%-a magyarázható [111, 112]: a fennmaradó, még azonosítatlan genetikai tényezők összességét hiányzó örökletességnek („missing heritability”) nevezzük [113]. Ennek háttérében több tényező is állhat, ugyanakkor valószínűnek tűnik hogy a még nem ismert genetikai faktorok azonosítása elsősorban nem „technikai” feladat. A kulcs nem a DNS-szekvenciát vizsgáló eljárások további fejlesztésében rejlik, hanem a megoldást a koncepció újragondolása és a különböző szakterületek (klinikum, molekuláris biológia, bioinformatika) hatékony együttműködése jelentheti.

A komplex kórképek háttérében álló genetikai variációk feltárását elsősorban a genom szintű asszociáció analízisek (GWAS – genome-wide association analysis)

eredményeitől várták. Ezek az elemzések hipotézis-mentes módon az összes kromoszóma szakaszt lefedve vizsgálják nagy számú SNP-t. A GWAS-k a 2-es típusú diabétesz mellitusz esetén több, mint 80 polimorfizmust valószínűsítettek genetikai rizikófaktorként, melyek egyenként 5–40%-kal emelték a kórkép kialakulásának kockázatát [114]. A 115 T2DM-szal foglalkozó GWAS tanulmányból 8 mutatta ki a *WFS1*-t, mint kandidáns gént, illetve annak 4 SNP-jét (rs4458523, rs1801214, rs4234733, rs4689388) [58, 59, 79]. A GWAS elemzések során a különböző betegségekkel asszociáló SNP-k 93%-a a DNS-nek a fehérjéket nem kódoló régiójába esik [115]. Ez nem meglepő annak ismeretében, hogy a teljes genom csupán kb. 1,1%-a felel a fehérjék aminosavsorrendjének meghatározásáért, és a fehérjék primer szerkezetének (jelentős) megváltozása sok esetben súlyos funkcióvesztéssel jár, így az ezen szakaszokon lévő genetikai variációk ritkábban vetődnek fel a gyakori betegségek örökletes rizikófaktorként. A nem kódoló szakaszokon lévő SNP-k a fehérje felépítésének illetve működésének megváltoztatása helyett annak mennyiségét befolyásolhatják, ami ugyanakkor szintén alapvető fontosságú lehet az adott betegség patomechanizmusában. A korábbi, GWAS eredményekből származó, a betegséggel asszociációt mutató *WFS1* SNP-k szoros kapcsoltságot mutatnak az általunk funkcionálisan is vizsgált polimorfizmusokkal. Mivel azok molekuláris biológiai szerepe mindmáig tisztázatlan, feltételezhetjük, hogy csupán markerei a betegségnek, és a háttérben húzódó molekuláris patomechanizmust többek között az általunk vizsgált, tényleges funkcióval bíró polimorfizmusok okozzák.

Bár mai tudásunkat az így kapott eredmények alapozták meg, a GWAS-k mégsem váltották be maradéktalanul a hozzájuk fűzött reményeket. Ennek egyik oka éppen ezen vizsgálatok alaptulajdonságából fakad. Bár a teljes genomra kiterjedő, akár több 100000 SNP-t magában foglaló elemzés rendkívül átfogó és nagy mennyiségű eredményt kínál, ennek elemzése ugyanakkor buktatókat is rejt magában. Az eredmények értékelése során a többszörös tesztelésre korrigálni kell, emiatt a statisztikai szignifikancia szintje a megszokott 0,05-nél lényegesen alacsonyabb: rendszerint a 10^{-8} -os nagyságrendbe esik [116]. Annak ellenére, hogy napjainkban meta- és mega-analízisek során rendkívül nagy számú minta elemzésére is lehetőség van, mégis az ilyen „szigorú” statisztikai korrekció ál-negatív eredményhez vezethet: a kis hatású és/vagy ritka variációk kimutatása meghiúsul.

A GWAS-k másik jellegzetessége, hogy – csaknem mindig – kizárólag SNP-k elemzését foglalják magukban. Bár ezen polimorfizmusok száma lényegesen magasabb, mint az ismétlődési variációké, ugyanakkor – nagyobb kiterjedésük és variabilitásuk miatt – mégis az SNP-knél nagyobb mértékben járulnak hozzá az emberek közötti genetikai különbséghez. Két nem rokon személy DNS-e között átlagosan 0,5% különbség van, ennek csupán egy ötöde (azaz 0,1%) származik az SNP-kből, a maradék 0,4%-ot az ismétlődési variációk okozzák. Érthető emiatt, hogy ezen polimorfizmus család nem hanyagolható el. Az ismétlődési variációk kiterjedésüket tekintve is rendkívül különbözőek. Az 2–9 bázispáros mikroszatelliták (vagy STR-ek, azaz „short tandem repeat”-ek) valamint a valamivel hosszabb (10–100 bp nagyságrend) miniszatelliták [1] mellett sajátos csoportot képviselnek a CNV-k (copy number variation) melyek igen hosszú (10^4 – 10^5 bp-os) DNS-szakaszok ismétlődését jelentik. Kimutatták, hogy ezen variációk gyakran megtalálhatók egészséges személyekben is [10, 11], mégis valószínűsíthető, hogy a CNV-k hozzájárulnak a komplex jellegek genetikai hátterének meghatározásához. Noha ismertek és elérhetőek módszerek a CNV-k genom-szintű elemzésére [36], ezek nagy populációkra vonatkozó elemzése az SNP-kéhez képest jóval kevésbé elterjedt.

További lényeges szempont, hogy a komplex jellegek hátterében álló genetikai tényezők hatása nem egyszerűen additív, az örökletes (és környezeti) faktorok egymással – hálózatot alkotva – bonyolult kölcsönhatásban, interakcióban állnak (episztázis) [117]. Ezen összefüggések feltárása komoly nehézséget jelent, mivel GWAS szintű vizsgálat esetén a lehetséges kombinációk száma csaknem végtelen, ami a többszörös tesztelésre való korrekció miatt a kis hatású variációk kimutatásának esélyét tovább rontja; célzott elemzések (pl. kandidáns gén vizsgálat) esetén pedig lehetséges, hogy a kutatásban az egyes variációk lényeges interakciós partnere nem is szerepel. Fontos mindezek mellett megemlíteni, hogy a genetikai variációk nem csak egymással, hanem a környezeti tényezőkkel is kölcsönhatásban állnak, az adott jelleg szempontjából releváns környezeti hatásoknak pedig kell legyen molekuláris szintű következménye. A teljes kép tehát csak úgy tárható fel, ha a DNS-szekvenciájának vizsgálata (polimorfizmusok genotipizálása) mellett epigenetikai elemzéseket is végzünk, ami a hiszton módosulások valamint a CG-dinukleotidok metilációs mintázatának meghatározását jelenti első sorban. Ismert, hogy a két szint egymással is

szoros összefüggésben áll: a polimorfizmusok több ponton hatással lehetnek a kromatin szerkezet vagy a metilációs mintázat kialakulására, illetve módosíthatják a génműködést befolyásoló további tényezőket: pl. a transzkripció faktorok vagy mikroRNS-ek kötődésének hatékonyságát [118].

A hiányzó örökölhetőséggel kapcsolatban felmerülő további szempont az, hogy a napjainkban alkalmazott klinikai diagnózisok kategorizálása gyakran nem a kiváltó okok, hanem elsősorban a tünetek szerint történik. A molekuláris biológiai alapok megismerése illetve az ezen alapuló diagnosztikai kategóriák definiálása viszont nem elméleti, nevezéktani kérdés csupán: a betegségek molekuláris hátterének ismerete és ennek megfelelő besorolása a célzott, oki illetve egyénre szabott terápiás stratégiák kidolgozásának lehetőségét kínálja. A génműködés befolyásolása egyes betegségek kezelése során napjainkban már nem ismeretlen: a leggyakrabban miRNS-ekkel vagy siRNS-ekkel történő géncsendesítés több rosszindulatú megbetegedés esetében eredményesen alkalmazható [119].

7. KÖVETKEZTETÉSEK

A technika, ezen belül az informatika néhány évtized óta tapasztalható nagy ütemű fejlődése jelentősen hozzájárul a természettudományi kutatások fellendüléséhez is. Ez a hatás már a Humán Genom Program során is megfigyelhető volt. Néhány évvel a munka megkezdése után – 1992-ben – az addig elért eredmények lehangoló képet mutattak: az évente kb. százezer bázispár hosszúságú szekvencia meghatározásának tükrében a 3 milliárd nukleotidból álló teljes genom bázissorrendjének feltárása beláthatatlan feladatnak tűnt. Bár a projekt során – éppen emiatt – elvi újítások is bevezetésre kerültek, a munka sikeréhez mégis jelentősen hozzájárult a fluoreszcens festékekkel jelölt didezoxi-nukleotidok valamint a 96 kapillárisos gélelektroforézis berendezések megjelenése, ami a Sanger-szekvenálás új távlatait nyitotta meg. A fejlődés az ezt követő évtizedekben napjainkig töretlen: felsorolni sem lehet az elméleti genetikai és molekuláris biológiai valamint a gyakorlati klinikai tudományágak azon területeit a kutató munkától a diagnosztikán át a kezelésig, ahol a mind modernebb technikai eszközök eddig elképzelhetetlen új lehetőségeket kínálnak.

Ezen a módszerek segítségével egyre több esetben megvalósítható a betegségek hátterében meghúzódó hibás molekuláris szintű folyamatok kimutatása, ami a kórképek diagnosztizálásának és kezelésének új szintjét jelenti. Míg régebben a gyógyítás sok esetben a tünetek enyhítését célozta, ma már sokkal inkább a kiváltó ok feltárása és – lehetőség szerint – ezen kóros mechanizmusok javítása a terápia feladata. Ezek tükrében nem meglepő, hogy a cukorbetegséggel kapcsolatban egy az endoplazmás retikulumban elhelyezkedő, a Ca^{2+} -homeosztázisban szerepet játszó fehérje, a wolframin szerepe valószínűsíthető, és – saját eredményeink illetve más kutatócsoportok munkája alapján – felmerül, hogy a kóros folyamatok kialakulásában a génkifejeződés miRNS-ek által történő szabályozásának megváltozása áll. Kétségtelen ugyanakkor az is, hogy egy-egy ilyen jelenség az adott komplex jelleg hátterében álló bonyolult folyamatrendszer csupán egy-egy apró elemét jelenti. Mégis az ehhez hasonló kutatási eredmények apránként a jövőben kiadják a teljes képet, s a genetikai faktorok, a molekuláris szintű patomechanizmus ismerete a diagnosztika mellett a primer és szekunder prevenció valamint a célzott, egyénre szabott kezelés alapjául szolgálhat.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A széles körű nemzetközi összefogás keretében megvalósuló Humán Genom Projekt eredményeként 2003. áprilisa óta ismert az emberi genomot alkotó DNS-molekulák bázissorrendje. Ez az eredmény a genetikai kutatások lényegi kiindulópontját jelenti, ezek közül az egyik legtöbbet vizsgált terület a komplex jellegek – daganatok, pszichiátriai rendellenességek, szív-, és érrendszeri megbetegedések, cukorbetegség stb. – háttérben álló genetikai faktorok, megváltozott molekuláris folyamatok azonosítása.

Több kutatócsoport vizsgálta már a *WFS1* gén polimorfizmusait az 1-es illetve 2-es típusú cukorbetegség feltételezett rizikófaktoraként többek között azért, mert a génben lévő funkcióvesztő mutációk felelnek a DIDMOAD-ként is ismert ritka betegség kialakulásáért, amely neurodegeneratív folyamatok mellett diabétesz mellitusszal is jár. A gén terméke, a wolframin, – más sejttípusok mellett – a β -sejtekben is jelentős expressziót mutató glikoprotein, feltételezetten szerepe van a Ca^{2+} -homeosztázis fenntartásában, és mennyisége endoplazmás retikulum stressz esetén megemelkedik.

Munkánk során a *WFS1* gén 5' illetve 3' szabályozó régióiban elhelyezkedő néhány kiválasztott genetikai polimorfizmus funkcionális és asszociáció elemzését végeztük el. Hatékony, olvadáspont mérésen valamint kapilláris gélelektroforézisen alapuló eljárást állítottunk be a promoterben lévő 6 bp-os inzerció / deléción (rs148797429) elemzésére. Kidolgoztunk továbbá egy olyan, primer extenzió alapú eljárást, amely alkalmas 5 SNP egyidejű, multiplex genotipizálására. Az ezen módszerek alkalmazásával végzett eset-kontroll vizsgálat eredményei alapján a 3' UTR-ben lévő rs1046322 SNP az 1-es típusú cukorbetegség rizikófaktorának tekinthető, s a gén több polimorfizmusa (az 5' régió haplotípus blokkot alkotó variánsai, az irodalomból ismert rs10010131 SNP, az rs9457 SNP) mutatott asszociációt a 2-es típusú diabétesz mellitusszal. Az *in vitro* luciferáz rendszerrel végzett funkcionális elemzések eredményei alapján a promoter régió rs4273545 SNP-je, valamint – valószínűsíthetően a miR-185 kötődési hatékonyságának megváltozása révén – az rs9457 polimorfizmus hozzájárul a génkifejeződés szabályozásához. Feltételezhető tehát, hogy a polimorfizmusok nem genetikai markerek csupán, hanem tényleges szerepet játszanak a kórkép patomechanizmusában. A molekuláris háttér, a betegségek genetikai rizikófaktorainak ismerete a prevenció, a betegségek biológiai alapon nyugvó kategorizálása, valamint hatékony, célzott, egyénre szabott kezelés szempontjából is jelentős.

9. SUMMARY

DNA-sequence of the whole human genome has been known since 2003 April, it was one of the major achievements of a worldwide scientific collaboration, referred to as Human Genome Project. These data provide fundamental base for genetic research. One of the most thoroughly investigated fields is the identification of genetic risk factors and molecular dysfunctions in the background of complex phenotypes, such as tumors, psychiatric disorders, cardiovascular diseases and diabetes.

Several research groups have studied the polymorphisms of the *WFS1* gene as putative genetic risk factors of type 1 and 2 diabetes mellitus because of the observation, that loss-of-function mutations of the gene are responsible for a rare disease, called DIDMOAD-syndrome including neurodegenerative symptoms and diabetes. The gene codes for the glycoprotein “wolframin”, and shows a high expression level in β -cells as well is in numerous other tissues. Wolframin was suggested to play a role in the maintenance of Ca^{2+} -homeostasis, the gene was demonstrated to be induced in ER-stress.

The major goal of our project was the functional and association analyses of selected polymorphisms in the 5' and 3' regulatory regions of the *WFS1* gene. Robust and reliable techniques were elaborated for the analysis of a 6 bp insertion / deletion in the promoter region, based on melting point analysis and capillary gel electrophoresis, respectively. Furthermore a multiplex, SNP analysis protocol, based on primer extension, was also designed for the simultaneous genotype determination of 5 loci. These techniques were used in a downstream case-control study, and it was observed, that the rs1046322 SNP localized in the 3' UTR can be considered as the genetic risk factor of type 1 diabetes mellitus. Moreover several polymorphisms in the gene (variants forming haploblock in the 5' region, the already well characterized rs10010131 and the rs9457 SNPs) showed an association with type 2 diabetes. *In vitro* functional studies employing luciferase system suggested that the rs4273545 SNP in the promoter region as well as the rs9457 polymorphism – the latter one putatively by influencing the binding affinity of miR-185 – might contribute to the regulation of gene expression. Consequently it can be proposed that these polymorphisms are not genetic markers, instead they functionally contribute to the pathomechanism of the disease. Discovery of the genetic risk factors and molecular background of diseases is crucial for prevention, for the definition of biologically relevant diagnostic categories, as well as for efficient, targeted and individualized therapy.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Szalai Csaba AP, Falus András, Oberfrank Ferenc. A genomika alapjai – a humán genom. In: SzalaiCs (szerk.), Orvosi Genomika és bioinformatika. Semmelweis Egyetem, Budapest, 2012:13-26.
2. Bentley DR. (2000) The Human Genome Project--an overview. *Med Res Rev*, 20:189-196.
3. (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 431:931-945.
4. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, McCarthy MI, Ramos EM, Cardon LR, Chakravarti A, Cho JH, Guttmacher AE, Kong A, Kruglyak L, Mardis E, Rotimi CN, Slatkin M, Valle D, Whittemore AS, Boehnke M, Clark AG, Eichler EE, Gibson G, Haines JL, Mackay TF, McCarroll SA, Visscher PM. (2009) Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*, 461:747-753.
5. Ebstein RP, Novick O, Umansky R, Priel B, Osher Y, Blaine D, Bennett ER, Nemanov L, Katz M, Belmaker RH. (1996) Dopamine D4 receptor (D4DR) exon III polymorphism associated with the human personality trait of Novelty Seeking. *Nat Genet*, 12:78-80.
6. Szantai E, Szilagyí A, Guttman A, Sasvari-Szekely M, Ronai Z. (2004) Genotyping and haplotyping of the dopamine D4 receptor gene by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, 1053:241-245.
7. Xu FL, Wu X, Zhang JJ, Wang BJ, Yao J. (2018) A meta-analysis of data associating DRD4 gene polymorphisms with schizophrenia. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 14:153-164.
8. Bonvicini C, Faraone SV, Scassellati C. (2016) Attention-deficit hyperactivity disorder in adults: A systematic review and meta-analysis of genetic, pharmacogenetic and biochemical studies. *Mol Psychiatry*, 21:872-884.
9. Gatt JM, Burton KL, Williams LM, Schofield PR. (2015) Specific and common genes implicated across major mental disorders: a review of meta-analysis studies. *J Psychiatr Res*, 60:1-13.

10. Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C. (2004) Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet*, 36:949-951.
11. Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Maner S, Massa H, Walker M, Chi M, Navin N, Lucito R, Healy J, Hicks J, Ye K, Reiner A, Gilliam TC, Trask B, Patterson N, Zetterberg A, Wigler M. (2004) Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science*, 305:525-528.
12. Toth-Petroczy A, Szilagyi A, Ronai Z, Sasvari-Szekely M, Guttman A. (2006) Validation of a tentative microsatellite marker for the dopamine D4 receptor gene by capillary gel electrophoresis. *J Chromatogr A*, 1130:201-205.
13. Qiu P, Shandilya H, D'Alessio JM, O'Connor K, Durocher J, Gerard GF. (2004) Mutation detection using Surveyor nuclease. *Biotechniques*, 36:702-707.
14. Little S. Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. In: *Current Protocols in Human Genetics*. Wiley, Medford, 2001: 9.8.1-9.8.12.
15. Konecny M, Zavodna K, Vranova V, Vizvaryova M, Weismanova E, Milkva I, Kuglik P, Kausitz J, Bartosova Z. (2008) Identification of rare complete BRCA1 gene deletion using a combination of SNP haplotype analysis, MLPA and array-CGH techniques. *Breast Cancer Res Treat*, 109:581-583.
16. Li PQ, Zhang J, Fan JH, Zhang YZ, Hou HY. (2014) Development of noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21 by RT-MLPA with a new set of SNP markers. *Arch Gynecol Obstet*, 289:67-73.
17. Volikos E, Robinson J, Aittomaki K, Mecklin JP, Jarvinen H, Westerman AM, de Rooji FW, Vogel T, Moeslein G, Launonen V, Tomlinson IP, Silver AR, Aaltonen LA. (2006) LKB1 exonic and whole gene deletions are a common cause of Peutz-Jeghers syndrome. *J Med Genet*, 43:e18.
18. Yau SC, Bobrow M, Mathew CG, Abbs SJ. (1996) Accurate diagnosis of carriers of deletions and duplications in Duchenne/Becker muscular dystrophy by fluorescent dosage analysis. *J Med Genet*, 33:550-558.
19. Bunyan DJ, Eccles DM, Sillibourne J, Wilkins E, Thomas NS, Shea-Simonds J, Duncan PJ, Curtis CE, Robinson DO, Harvey JF, Cross NC. (2004) Dosage

- analysis of cancer predisposition genes by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Br J Cancer*, 91:1155-1159.
20. Li X, Quigg RJ, Zhou J, Gu W, Nagesh Rao P, Reed EF. (2008) Clinical utility of microarrays: current status, existing challenges and future outlook. *Curr Genomics*, 9:466-474.
 21. Dalma-Weiszhausz DD, Warrington J, Tanimoto EY, Miyada CG. (2006) The affymetrix GeneChip platform: an overview. *Methods Enzymol*, 410:3-28.
 22. Esteves LM, Bulhoes SM, Brilhante MJ, Mota-Vieira L. (2013) Three multiplex snapshot assays for SNP genotyping in candidate innate immune genes. *BMC Res Notes*, 6:54.
 23. Bell PA, Chaturvedi S, Gelfand CA, Huang CY, Kochersperger M, Kopla R, Modica F, Pohl M, Varde S, Zhao R, Zhao X, Boyce-Jacino MT, Yassen A. (2002) SNPstream UHT: ultra-high throughput SNP genotyping for pharmacogenomics and drug discovery. *Biotechniques*, Suppl:70-72, 74, 76-77.
 24. Gudnason H, Dufva M, Bang DD, Wolff A. (2007) Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucleic Acids Res*, 35:e127.
 25. Gibson UE, Heid CA, Williams PM. (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*, 6:995-1001.
 26. De la Vega FM, Lazaruk KD, Rhodes MD, Wenz MH. (2005) Assessment of two flexible and compatible SNP genotyping platforms: TaqMan SNP Genotyping Assays and the SNPlex Genotyping System. *Mutat Res*, 573:111-135.
 27. Abravaya K, Huff J, Marshall R, Merchant B, Mullen C, Schneider G, Robinson J. (2003) Molecular beacons as diagnostic tools: technology and applications. *Clin Chem Lab Med*, 41:468-474.
 28. Tapp I, Malmberg L, Rennel E, Wik M, Syvanen AC. (2000) Homogeneous scoring of single-nucleotide polymorphisms: comparison of the 5'-nuclease TaqMan assay and Molecular Beacon probes. *Biotechniques*, 28:732-738.
 29. Pomeroy R, Duncan G, Sunar-Reeder B, Ortenberg E, Ketchum M, Wasiluk H, Reeder D. (2009) A low-cost, high-throughput, automated single nucleotide polymorphism assay for forensic human DNA applications. *Anal Biochem*, 395:61-67.

30. Patel SN, Wu Y, Bao Y, Mancebo R, Au-Young J, Grigorenko E. (2013) TaqMan(R) OpenArray(R) high-throughput transcriptional analysis of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Methods Mol Biol*, 997:191-201.
31. Tucker EJ, Huynh BL. (2014) Genotyping by high-resolution melting analysis. *Methods Mol Biol*, 1145:59-66.
32. Bruzzone CM, Steer CJ. (2015) High-resolution melting analysis of single nucleotide polymorphisms. *Methods Mol Biol*, 1310:5-27.
33. Knapp LA. (2009) Single nucleotide polymorphism screening with denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Mol Biol*, 578:137-151.
34. Viglasky V. (2013) Polyacrylamide temperature gradient gel electrophoresis. *Methods Mol Biol*, 1054:159-171.
35. Dong Y, Zhu H. (2005) Single-strand conformational polymorphism analysis: basic principles and routine practice. *Methods Mol Med*, 108:149-157.
36. Haraksingh RR, Abyzov A, Urban AE. (2017) Comprehensive performance comparison of high-resolution array platforms for genome-wide Copy Number Variation (CNV) analysis in humans. *BMC Genomics*, 18:321.
37. Ceulemans S, van der Ven K, Del-Favero J. (2012) Targeted screening and validation of copy number variations. *Methods Mol Biol*, 838:311-328.
38. Behjati S, Tarpey PS. (2013) What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed*, 98:236-238.
39. Inoue H, Tanizawa Y, Wasson J, Behn P, Kalidas K, Bernal-Mizrachi E, Mueckler M, Marshall H, Donis-Keller H, Crock P, Rogers D, Mikuni M, Kumashiro H, Higashi K, Sobue G, Oka Y, Permutt MA. (1998) A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nat Genet*, 20:143-148.
40. Takeda K, Inoue H, Tanizawa Y, Matsuzaki Y, Oba J, Watanabe Y, Shinoda K, Oka Y. (2001) WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain. *Hum Mol Genet*, 10:477-484.
41. Fonseca SG, Ishigaki S, Oslowski CM, Lu S, Lipson KL, Ghosh R, Hayashi E, Ishihara H, Oka Y, Permutt MA, Urano F. (2010) Wolfram syndrome 1 gene

- negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *J Clin Invest*, 120:744-755.
42. Hofmann S, Philbrook C, Gerbitz KD, Bauer MF. (2003) Wolfram syndrome: structural and functional analyses of mutant and wild-type wolframin, the WFS1 gene product. *Hum Mol Genet*, 12:2003-2012.
 43. Fonseca SG, Fukuma M, Lipson KL, Nguyen LX, Allen JR, Oka Y, Urano F. (2005) WFS1 is a novel component of the unfolded protein response and maintains homeostasis of the endoplasmic reticulum in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem*, 280:39609-39615.
 44. Ishihara H, Takeda S, Tamura A, Takahashi R, Yamaguchi S, Takei D, Yamada T, Inoue H, Soga H, Katagiri H, Tanizawa Y, Oka Y. (2004) Disruption of the WFS1 gene in mice causes progressive beta-cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion. *Hum Mol Genet*, 13:1159-1170.
 45. Ivask M, Hugill A, Koks S. (2016) RNA-sequencing of WFS1-deficient pancreatic islets. *Physiol Rep*, 4.
 46. Hatanaka M, Tanabe K, Yanai A, Ohta Y, Kondo M, Akiyama M, Shinoda K, Oka Y, Tanizawa Y. (2011) Wolfram syndrome 1 gene (WFS1) product localizes to secretory granules and determines granule acidification in pancreatic beta-cells. *Hum Mol Genet*, 20:1274-1284.
 47. Osman AA, Saito M, Makepeace C, Permutt MA, Schlesinger P, Mueckler M. (2003) Wolframin expression induces novel ion channel activity in endoplasmic reticulum membranes and increases intracellular calcium. *J Biol Chem*, 278:52755-52762.
 48. Barrett TG, Bunday SE, Macleod AF. (1995) Neurodegeneration and diabetes: UK nationwide study of Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Lancet*, 346:1458-1463.
 49. Lombardo F, Salzano G, Di Bella C, Aversa T, Pugliatti F, Cara S, Valenzise M, De Luca F, Rigoli L. (2014) Phenotypical and genotypical expression of Wolfram syndrome in 12 patients from a Sicilian district where this syndrome might not be so infrequent as generally expected. *J Endocrinol Invest*, 37:195-202.

50. Medlej R, Wasson J, Baz P, Azar S, Salti I, Loiselet J, Permutt A, Halaby G. (2004) Diabetes mellitus and optic atrophy: a study of Wolfram syndrome in the Lebanese population. *J Clin Endocrinol Metab*, 89:1656-1661.
51. Matsunaga K, Tanabe K, Inoue H, Okuya S, Ohta Y, Akiyama M, Taguchi A, Kora Y, Okayama N, Yamada Y, Wada Y, Amemiya S, Sugihara S, Nakao Y, Oka Y, Tanizawa Y. (2014) Wolfram syndrome in the Japanese population; molecular analysis of WFS1 gene and characterization of clinical features. *PLoS One*, 9:e106906.
52. Kumar S. (2010) Wolfram syndrome: important implications for pediatricians and pediatric endocrinologists. *Pediatr Diabetes*, 11:28-37.
53. Cano A, Molines L, Valero R, Simonin G, Paquis-Flucklinger V, Vialettes B. (2007) Microvascular diabetes complications in Wolfram syndrome (diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy, and deafness [DIDMOAD]): an age- and duration-matched comparison with common type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 30:2327-2330.
54. Zmyslowska A, Borowiec M, Fichna P, Iwaniszewska B, Majkowska L, Pietrzak I, Szalecki M, Szypowska A, Mlynarski W. (2014) Delayed recognition of Wolfram syndrome frequently misdiagnosed as type 1 diabetes with early chronic complications. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 122:35-38.
55. Swift RG, Sadler DB, Swift M. (1990) Psychiatric findings in Wolfram syndrome homozygotes. *Lancet*, 336:667-669.
56. Swift RG, Perkins DO, Chase CL, Sadler DB, Swift M. (1991) Psychiatric disorders in 36 families with Wolfram syndrome. *Am J Psychiatry*, 148:775-779.
57. Chausseot A, Rouzier C, Quere M, Plutino M, Ait-El-Mkadem S, Bannwarth S, Barth M, Dollfus H, Charles P, Nicolino M, Chabrol B, Vialettes B, Paquis-Flucklinger V. (2015) Mutation update and uncommon phenotypes in a French cohort of 96 patients with WFS1-related disorders. *Clin Genet*, 87:430-439.
58. Rung J, Cauchi S, Albrechtsen A, Shen L, Rocheleau G, Cavalcanti-Proenca C, Bacot F, Balkau B, Belisle A, Borch-Johnsen K, Charpentier G, Dina C, Durand E, Elliott P, Hadjadj S, Jarvelin MR, Laitinen J, Lauritzen T, Marre M, Mazur A, Meyre D, Montpetit A, Pisinger C, Posner B, Poulsen P, Pouta A, Prentki M, Ribel-Madsen R, Ruukonen A, Sandbaek A, Serre D, Tichet J, Vaxillaire M,

- Wojtaszewski JF, Vaag A, Hansen T, Polychronakos C, Pedersen O, Froguel P, Sladek R. (2009) Genetic variant near *IRS1* is associated with type 2 diabetes, insulin resistance and hyperinsulinemia. *Nat Genet*, 41:1110-1115.
59. Fawcett KA, Wheeler E, Morris AP, Ricketts SL, Hallmans G, Rolandsson O, Daly A, Wasson J, Permutt A, Hattersley AT, Glaser B, Franks PW, McCarthy MI, Wareham NJ, Sandhu MS, Barroso I. (2010) Detailed investigation of the role of common and low-frequency *WFS1* variants in type 2 diabetes risk. *Diabetes*, 59:741-746.
 60. Miura M, Miyatsuka T, Katahira T, Sasaki S, Suzuki L, Himuro M, Nishida Y, Fujitani Y, Matsuoka TA, Watada H. (2018) Suppression of *STAT3* signaling promotes cellular reprogramming into insulin-producing cells induced by defined transcription factors. *EBioMedicine*, 36:358-366.
 61. Dayeh TA, Olsson AH, Volkov P, Almgren P, Ronn T, Ling C. (2013) Identification of CpG-SNPs associated with type 2 diabetes and differential DNA methylation in human pancreatic islets. *Diabetologia*, 56:1036-1046.
 62. Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. (2007) Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104:9667-9672.
 63. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, 433:769-773.
 64. Ha M, Kim VN. (2014) Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15:509-524.
 65. Saunders MA, Liang H, Li WH. (2007) Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104:3300-3305.
 66. Solda G, Robusto M, Primignani P, Castorina P, Benzoni E, Cesarani A, Ambrosetti U, Asselta R, Duga S. (2012) A novel mutation within the *MIR96* gene causes non-syndromic inherited hearing loss in an Italian family by altering pre-miRNA processing. *Hum Mol Genet*, 21:577-585.
 67. Ciccacci C, Di Fusco D, Cacciotti L, Morganti R, D'Amato C, Greco C, Rufini S, Novelli G, Sangiuolo F, Spallone V, Borgiani P. (2013) MicroRNA genetic variations: association with type 2 diabetes. *Acta Diabetol*, 50:867-872.

68. Locke JM, Lango Allen H, Harries LW. (2014) A rare SNP in pre-miR-34a is associated with increased levels of miR-34a in pancreatic beta cells. *Acta Diabetol*, 51:325-329.
69. Villuendas G, Botella-Carretero JI, Lopez-Bermejo A, Gubern C, Ricart W, Fernandez-Real JM, San Millan JL, Escobar-Morreale HF. (2006) The ACAA-insertion/deletion polymorphism at the 3' UTR of the IGF-II receptor gene is associated with type 2 diabetes and surrogate markers of insulin resistance. *Eur J Endocrinol*, 155:331-336.
70. Lv K, Guo Y, Zhang Y, Wang K, Jia Y, Sun S. (2008) Allele-specific targeting of hsa-miR-657 to human IGF2R creates a potential mechanism underlying the association of ACAA-insertion/deletion polymorphism with type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*, 374:101-105.
71. 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.
72. Goda N, Murase H, Kasezawa N, Goda T, Yamakawa-Kobayashi K. (2015) Polymorphism in microRNA-binding site in HNF1B influences the susceptibility of type 2 diabetes mellitus: a population based case-control study. *BMC Med Genet*, 16:75.
73. Hiard S, Charlier C, Coppieters W, Georges M, Baurain D. (2010) Patrocles: a database of polymorphic miRNA-mediated gene regulation in vertebrates. *Nucleic Acids Res*, 38:D640-651.
74. Bhattacharya A, Ziebarth JD, Cui Y. (2014) PolymiRTS Database 3.0: linking polymorphisms in microRNAs and their target sites with human diseases and biological pathways. *Nucleic Acids Res*, 42:D86-91.
75. Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. (2011) miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. *J Biomed Inform*, 44:839-847.
76. Kibbe WA. (2007) OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res*, 35:W43-46.

77. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 21:263-265.
78. Long J, Edwards T, Signorello LB, Cai Q, Zheng W, Shu XO, Blot WJ. (2012) Evaluation of genome-wide association study-identified type 2 diabetes loci in African Americans. *Am J Epidemiol*, 176:995-1001.
79. Sandhu MS, Weedon MN, Fawcett KA, Wasson J, Debenham SL, Daly A, Lango H, Frayling TM, Neumann RJ, Sherva R, Blech I, Pharoah PD, Palmer CN, Kimber C, Tavendale R, Morris AD, McCarthy MI, Walker M, Hitman G, Glaser B, Permutt MA, Hattersley AT, Wareham NJ, Barroso I. (2007) Common variants in WFS1 confer risk of type 2 diabetes. *Nat Genet*, 39:951-953.
80. Torkamandi S, Bastami M, Ghaedi H, Tarighi S, Shokri F, Javadi A, Mirfakhraie R, Omrani MD. (2017) Association of CpG-SNP and 3'UTR-SNP of WFS1 with the Risk of Type 2 Diabetes Mellitus in an Iranian Population. *Int J Mol Cell Med*, 6:197-203.
81. Barnes MR. (2006) Navigating the HapMap. *Brief Bioinform*, 7:211-224.
82. Ricketts C, Zatyka M, Barrett T. (2006) The characterisation of the human Wolfram syndrome gene promoter demonstrating regulation by Sp1 and Sp3 transcription factors. *Biochim Biophys Acta*, 1759:367-377.
83. Chou CH, Shrestha S, Yang CD, Chang NW, Lin YL, Liao KW, Huang WC, Sun TH, Tu SJ, Lee WH, Chiew MY, Tai CS, Wei TY, Tsai TR, Huang HT, Wang CY, Wu HY, Ho SY, Chen PR, Chuang CH, Hsieh PJ, Wu YS, Chen WL, Li MJ, Wu YC, Huang XY, Ng FL, Buddhakosai W, Huang PC, Lan KC, Huang CY, Weng SL, Cheng YN, Liang C, Hsu WL, Huang HD. (2018) miRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res*, 46:D296-D302.
84. van Hoek M, Dehghan A, Witteman JC, van Duijn CM, Uitterlinden AG, Oostra BA, Hofman A, Sijbrands EJ, Janssens AC. (2008) Predicting type 2 diabetes based on polymorphisms from genome-wide association studies: a population-based study. *Diabetes*, 57:3122-3128.
85. Cheng S, Wu Y, Wu W, Zhang D. (2013) Association of rs734312 and rs10010131 polymorphisms in WFS1 gene with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *Endocr J*, 60:441-447.

86. Franks PW, Rolandsson O, Debenham SL, Fawcett KA, Payne F, Dina C, Froguel P, Mohlke KL, Willer C, Olsson T, Wareham NJ, Hallmans G, Barroso I, Sandhu MS. (2008) Replication of the association between variants in WFS1 and risk of type 2 diabetes in European populations. *Diabetologia*, 51:458-463.
87. Shang L, Hua H, Foo K, Martinez H, Watanabe K, Zimmer M, Kahler DJ, Freeby M, Chung W, LeDuc C, Goland R, Leibel RL, Egli D. (2014) beta-cell dysfunction due to increased ER stress in a stem cell model of Wolfram syndrome. *Diabetes*, 63:923-933.
88. Lemaire K, Schuit F. (2012) Integrating insulin secretion and ER stress in pancreatic beta-cells. *Nat Cell Biol*, 14:979-981.
89. Akiyama M, Hatanaka M, Ohta Y, Ueda K, Yanai A, Uehara Y, Tanabe K, Tsuru M, Miyazaki M, Saeki S, Saito T, Shinoda K, Oka Y, Tanizawa Y. (2009) Increased insulin demand promotes while pioglitazone prevents pancreatic beta cell apoptosis in Wfs1 knockout mice. *Diabetologia*, 52:653-663.
90. Yamaguchi S, Ishihara H, Tamura A, Yamada T, Takahashi R, Takei D, Katagiri H, Oka Y. (2004) Endoplasmic reticulum stress and N-glycosylation modulate expression of WFS1 protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 325:250-256.
91. Ueda K, Kawano J, Takeda K, Yujiri T, Tanabe K, Anno T, Akiyama M, Nozaki J, Yoshinaga T, Koizumi A, Shinoda K, Oka Y, Tanizawa Y. (2005) Endoplasmic reticulum stress induces Wfs1 gene expression in pancreatic beta-cells via transcriptional activation. *Eur J Endocrinol*, 153:167-176.
92. Kakiuchi C, Ishiwata M, Hayashi A, Kato T. (2006) XBP1 induces WFS1 through an endoplasmic reticulum stress response element-like motif in SH-SY5Y cells. *J Neurochem*, 97:545-555.
93. Ryu J, Lee C. (2016) Differential promoter activity by nucleotide substitution at a type 2 diabetes genome-wide association study signal upstream of the wolframin gene. *J Diabetes*, 8:253-259.
94. Wang G, Gu Y, Xu N, Zhang M, Yang T. (2018) Decreased expression of miR-150, miR146a and miR424 in type 1 diabetic patients: Association with ongoing islet autoimmunity. *Biochem Biophys Res Commun*, 498:382-387.
95. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, Pfeffer S, Rice A, Kamphorst AO, Landthaler M, Lin C, Socci ND, Hermida L, Fulci V, Chiaretti

- S, Foa R, Schliwka J, Fuchs U, Novosel A, Muller RU, Schermer B, Bissels U, Inman J, Phan Q, Chien M, Weir DB, Choksi R, De Vita G, Frezzetti D, Trompeter HI, Hornung V, Teng G, Hartmann G, Palkovits M, Di Lauro R, Wernet P, Macino G, Rogler CE, Nagle JW, Ju J, Papavasiliou FN, Benzing T, Lichter P, Tam W, Brownstein MJ, Bosio A, Borkhardt A, Russo JJ, Sander C, Zavolan M, Tuschl T. (2007) A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*, 129:1401-1414.
96. Erener S, Mojibian M, Fox JK, Denroche HC, Kieffer TJ. (2013) Circulating miR-375 as a biomarker of beta-cell death and diabetes in mice. *Endocrinology*, 154:603-608.
 97. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, Pfeffer S, Tuschl T, Rajewsky N, Rorsman P, Stoffel M. (2004) A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*, 432:226-230.
 98. El Ouaamari A, Baroukh N, Martens GA, Lebrun P, Pipeleers D, van Obberghen E. (2008) miR-375 targets 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and regulates glucose-induced biological responses in pancreatic beta-cells. *Diabetes*, 57:2708-2717.
 99. He Y, Ding Y, Liang B, Lin J, Kim TK, Yu H, Hang H, Wang K. (2017) A Systematic Study of Dysregulated MicroRNA in Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*, 18.
 100. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, Mayr A, Weger S, Oberhollenzer F, Bonora E, Shah A, Willeit J, Mayr M. (2010) Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res*, 107:810-817.
 101. Delic D, Eisele C, Schmid R, Luippold G, Mayoux E, Grempler R. (2016) Characterization of Micro-RNA Changes during the Progression of Type 2 Diabetes in Zucker Diabetic Fatty Rats. *Int J Mol Sci*, 17.
 102. Takahashi Y, Forrest AR, Maeno E, Hashimoto T, Daub CO, Yasuda J. (2009) MiR-107 and MiR-185 can induce cell cycle arrest in human non small cell lung cancer cell lines. *PLoS One*, 4:e6677.

103. Imam JS, Buddavarapu K, Lee-Chang JS, Ganapathy S, Camosy C, Chen Y, Rao MK. (2010) MicroRNA-185 suppresses tumor growth and progression by targeting the Six1 oncogene in human cancers. *Oncogene*, 29:4971-4979.
104. Li Q, Wang JX, He YQ, Feng C, Zhang XJ, Sheng JQ, Li PF. (2014) MicroRNA-185 regulates chemotherapeutic sensitivity in gastric cancer by targeting apoptosis repressor with caspase recruitment domain. *Cell Death Dis*, 5:e1197.
105. Liu M, Lang N, Chen X, Tang Q, Liu S, Huang J, Zheng Y, Bi F. (2011) miR-185 targets RhoA and Cdc42 expression and inhibits the proliferation potential of human colorectal cells. *Cancer Lett*, 301:151-160.
106. Bao L, Fu X, Si M, Wang Y, Ma R, Ren X, Lv H. (2015) MicroRNA-185 targets SOCS3 to inhibit beta-cell dysfunction in diabetes. *PLoS One*, 10:e0116067.
107. Yang M, Liu W, Pellicane C, Sahyoun C, Joseph BK, Gallo-Ebert C, Donigan M, Pandya D, Giordano C, Bata A, Nickels JT, Jr. (2014) Identification of miR-185 as a regulator of de novo cholesterol biosynthesis and low density lipoprotein uptake. *J Lipid Res*, 55:226-238.
108. Nemeth N, Kovacs-Nagy R, Szekely A, Sasvari-Szekely M, Ronai Z. (2013) Association of impulsivity and polymorphic microRNA-641 target sites in the SNAP-25 gene. *PLoS One*, 8:e84207.
109. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. (2005) Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*, 3:e85.
110. Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. (2007) MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*, 27:91-105.
111. Maller J, George S, Purcell S, Fagerness J, Altshuler D, Daly MJ, Seddon JM. (2006) Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet*, 38:1055-1059.
112. Zeggini E, Scott LJ, Saxena R, Voight BF, Marchini JL, Hu T, de Bakker PI, Abecasis GR, Almgren P, Andersen G, Ardlie K, Bostrom KB, Bergman RN, Bonnycastle LL, Borch-Johnsen K, Burt NP, Chen H, Chines PS, Daly MJ, Deodhar P, Ding CJ, Doney AS, Duren WL, Elliott KS, Erdos MR, Frayling TM, Freathy RM, Gianniny L, Grallert H, Grarup N, Groves CJ, Guiducci C, Hansen

- T, Herder C, Hitman GA, Hughes TE, Isomaa B, Jackson AU, Jorgensen T, Kong A, Kubalanza K, Kuruvilla FG, Kuusisto J, Langenberg C, Lango H, Lauritzen T, Li Y, Lindgren CM, Lyssenko V, Marvelle AF, Meisinger C, Midthjell K, Mohlke KL, Morken MA, Morris AD, Narisu N, Nilsson P, Owen KR, Palmer CN, Payne F, Perry JR, Pettersen E, Platou C, Prokopenko I, Qi L, Qin L, Rayner NW, Rees M, Roix JJ, Sandbaek A, Shields B, Sjogren M, Steinthorsdottir V, Stringham HM, Swift AJ, Thorleifsson G, Thorsteinsdottir U, Timpson NJ, Tuomi T, Tuomilehto J, Walker M, Watanabe RM, Weedon MN, Willer CJ, Illig T, Hveem K, Hu FB, Laakso M, Stefansson K, Pedersen O, Wareham NJ, Barroso I, Hattersley AT, Collins FS, Groop L, McCarthy MI, Boehnke M, Altshuler D. (2008) Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. *Nat Genet*, 40:638-645.
113. Maher B. (2008) Personal genomes: The case of the missing heritability. *Nature*, 456:18-21.
114. Stancakova A, Laakso M. (2016) Genetics of Type 2 Diabetes. *Endocr Dev*, 31:203-220.
115. Tak YG, Farnham PJ. (2015) Making sense of GWAS: using epigenomics and genome engineering to understand the functional relevance of SNPs in non-coding regions of the human genome. *Epigenetics Chromatin*, 8:57.
116. Bush WS, Moore JH. (2012) Chapter 11: Genome-wide association studies. *PLoS Comput Biol*, 8:e1002822.
117. Hemani G, Knott S, Haley C. (2013) An evolutionary perspective on epistasis and the missing heritability. *PLoS Genet*, 9:e1003295.
118. Ziller MJ, Gu H, Muller F, Donaghey J, Tsai LT, Kohlbacher O, De Jager PL, Rosen ED, Bennett DA, Bernstein BE, Gnirke A, Meissner A. (2013) Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature*, 500:477-481.
119. Osaki M, Okada F, Ochiya T. (2015) miRNA therapy targeting cancer stem cells: a new paradigm for cancer treatment and prevention of tumor recurrence. *Ther Deliv*, 6:323-337.

11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

11.1. A dolgozat témájához kapcsolódó közlemények

- I. Elek Z, Denes R, Prokop S, Somogyi A, Yowanto H, Luo J, Souquet M, Guttman A, Ronai Z. (2016) Multicapillary gel electrophoresis based analysis of genetic variants in the WFS1 gene. *Electrophoresis*, 37:2313-2321. (IF: 2,744)
- II. Elek Z, Nemeth N, Nagy G, Nemeth H, Somogyi A, Hosszufalusi N, Sasvari-Szekely M, Ronai Z. (2015) Micro-RNA Binding Site Polymorphisms in the WFS1 Gene Are Risk Factors of Diabetes Mellitus. *PloS one*, 10:e0139519. (IF: 3,057)

11.2. A disszertáció témájához nem kapcsolódó publikációk

- III. Banlaki Z, Elek Z, Nanasi T, Szekely A, Nemoda Z, Sasvari-Szekely M, Ronai Z. (2015) Polymorphism in the serotonin receptor 2a (HTR2A) gene as possible predisposal factor for aggressive traits. *PloS one*, 10:e0117792. (IF: 3,057)
- IV. Kis A, Bence M, Lakatos G, Pergel E, Turcsan B, Pluijmakers J, Vas J, Elek Z, Bruder I, Foldi L, Sasvari-Szekely M, Miklosi A, Ronai Z, Kubinyi E. (2014) Oxytocin receptor gene polymorphisms are associated with human directed social behavior in dogs (*Canis familiaris*). *PloS one*, 9:e83993. (IF: 3,234)
- V. Kotyuk E, Biro V, Bircher J, Elek Z, Sasvari M, Szekely A. (2017) ABCA1 polymorphism, a genetic risk factor of harm avoidance. *Journal Of Individual Differences*, 38:189-195. (IF: 1,283)
- VI. 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. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 162B:404-412. (IF: 3,271)
- VII. Ronai Z, Kovacs-Nagy R, Szantai E, Elek Z, Sasvari-Szekely M, Faludi G, Benkovits J, Rethelyi JM, Szekely A. (2014) Glycogen synthase kinase 3 beta gene structural variants as possible risk factors of bipolar depression. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official*

publication of the International Society of Psychiatric Genetics, 165B:217-222.
(IF: 3,416)

- VIII. Spiro Z, Arslan MA, Somogyvari M, Nguyen MT, Smolders A, Dancso B, Nemeth N, Elek Z, Braeckman BP, Csermely P, Soti C. (2012) RNA interference links oxidative stress to the inhibition of heat stress adaptation. *Antioxidants & redox signaling*, 17:890-901. (IF: 7,189)
- IX. Szantai E, Elek Z, Guttman A, Sasvari-Szekely M. (2009) Candidate gene copy number analysis by PCR and multicapillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 30:1098-1101. (IF: 3,077)
- X. Wan M, Hejjas K, Ronai Z, Elek Z, Sasvari-Szekely M, Champagne FA, Miklosi A, Kubinyi E. (2013) DRD4 and TH gene polymorphisms are associated with activity, impulsivity and inattention in Siberian Husky dogs. *Animal genetics*, 44:717-727. (IF: 2,210)

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani

Prof. Mandl Józsefnek, és Prof. Bánhegyi Gábornak, hogy PhD hallgatóként kutatómunkámat a Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézetében végezhettem,

Prof. Sasvári Máriának, a laboratórium vezetőjének, aki lehetővé tette és támogatta munkámat, mind elméleti, mind gyakorlati téren maximális segítséget nyújtott, ötleteivel mindvégig segítette munkámat,

Rónai Zsoltnak, témavezetőmnek, rendkívüli türelméért, szakmai tudásáért és irányításáért, nem szűnő lelkesedéséért, mérhetetlenül sok segítségéért, humoráért,

Somogyi Anikónak, a II. sz. Belgyógyászati Klinika egyetemi tanárának, a munka klinikai részében való részvételéért,

Szántai Eszternek az elméleti és gyakorlati munkában nyújtott segítségéért, türelméért,

valamint a laboratórium összes munkatársának a munkában való együttműködésért, kedvességükért és a jó hangulatért.