

# *WFS1* gén polimorfizmusok funkcionális és asszociáció elemzése

Doktori tézisek

**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

## BEVEZETÉS

A humán genetika és genomika tudományágainak alapvető mérföldköve volt az emberi genomot alkotó kb. 3 milliárd bázispárnnyi DNS-szekvencia megismerése, ez az információ több, mint másfél évtizede Internetes adatbázisokban hozzáférhető. Ez az eredmény azonban korántsem jelentette a genetikai kutatások végét; épp ellenkezőleg: annak számos új lehetőséget, irányvonalat kínált.

Az egyik – mind elméleti, mind gyakorlati szempontból alapvető jelentőségű – terület a komplex jellegek örökletes hátterének kutatása, mely mindmáig számos kutatócsoport fő érdeklődése. A kórképek hátterében 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 hátterét teljes körűen, egyértelműen feltárni.

A *WFS1* gén a 890 aminosavból álló, 100 kDa tömegű wolframin fehérjét kódolja, ami 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. A wolframin szinte az összes eddig vizsgált szövetben expresszálódik, de a legmagasabb értékeket szívben, agyban, és a hasnyálmirigy  $\beta$ -sejtjeiben mérték.

A *WFS1* gén funkcióvesztő mutációi felelnek a Wolframszindróma (WFS; OMIM 222300) kialakulásáért. A DIDMOAD-ként is ismert kórkép egy ritka neurodegeneratív betegség, ami diabétesz inszpidusszal, diabétesz mellitusszal, optikus atrófiával és siketséggel jár együtt, amely gyakran társul különböző mentális

zavarokkal is. A Wolfram-szindróma modell állataként létrehozott, *WFS1* mutáns egerekben glükóz hatására csökkent inzulin szekréciót, immunhisztokémiai vizsgálattal pedig alacsonyabb  $\beta$ -sejtszámot figyeltek meg. Izolált szigetsejtek magas glükóz koncentrációra illetve ER stressz induktorokra megnövekedett apoptózist mutattak. Az eredmények alapján a wolframin fontos szerepet játszhat mind a  $\beta$ -sejtszám fenntartásában, mind pedig az inzulin exocitózisában. A wolframin emellett kalmodulint köt, s ennek révén számos celluláris fehérjével kölcsönhatásban befolyásolja a sejt különböző  $\text{Ca}^{2+}$ -jelátviteli útvonalait, valamint fontos szerepet játszik a sejten belüli  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázis szabályozásában.

Mindezen 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 genom szintű asszociáció elemzés (GWAS) vizsgálat során. Több tanulmány metaanalízise bizonyította, hogy az rs1046320 és az rs10010131 SNP-k rizikó faktorai a kettes típusú diabétesznek. A két SNP szorosan kapcsolatos, 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 kapcsolatos, 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.

## 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.

## **MÓDSZEREK**

### **A vizsgálatban résztvevő személyek, mintavétel, DNS-izolálás**

Az asszociáció vizsgálat során 900 cukorbeteg ill. 892 egészséges személy DNS-mintáját vizsgáltuk. 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 DNS-mintavétel nem-invazív módon történt: a vizsgálati személyek vattapálcával az íny és a bucca területéről szájnyalkahártya-sejteket gyűjtöttek. Ez elegendő mennyiségű DNS-t biztosított a genotipizáláshoz. A DNS-izolálás első lépését a sejtek lízise, valamint a fehérjék SDS-sel történő denaturálása és a proteináz K általi megemésztése jelentette. NaCl-os fehéré kicsapást követően a DNS kicsapása izopropanollal és etanollal történt, majd a DNS csapadékot TE pufferben reszuszpendáltuk.

### ***In silico* módszerek**

Munkánk során számos online adatbázist használtunk. A *WFS1* gén szekvenciáját, illetve polimorfizmusainak adatait az NCBI és az Ensembl génbankjából töltöttük le. A mikro-RNS kötődést befolyásoló polimorfizmusok (miR-SNP-k) azonosítására a Patrocles, a PolymiRTS és a miRWalk 2.0 adatbázisok álltak rendelkezésünkre. A vizsgált mikro-RNS-ek szekvenciáit a miRBase adatbázis tartalmazta. A PCR során használt primerek tervezését az NCBI Primer Blast programjával végeztük. Restriktions enzimek helyeket NEBcutter v2.0 segítségével kerestünk.

### **Genotipizáló módszerek**

A *WFS1* gén 7 SNP-jének genotipizálása real-time PCR-en alapuló eljárás segítségével történt. Az rs4273545 (T/G) SNP-t egyirányú allélspecifikus amplifikációval elemeztük. Ennél a módszer-

nél két, azonos irányú, allélspecifikus (a 3' végén a polimorfizmus egyik alléljára komplementer bázist tartalmazó), valamint két külső primert alkalmazunk. Egy minta elemzése két reakcióelegyben történt. A PCR termékeket agaróz gél-elektroforézissel tettük láthatóvá. Az rs4689388 SNP-t PCR–RFLP-vel genotipizáltuk. A módszer alapja, hogy a vizsgált SNP egy restriktív endonukleáz felismerési szekvenciájában helyezkedik el. A PCR-primereket úgy terveztük meg, hogy a keletkező termékekben legyen egy kontroll hasító hely is, amivel a restriktív endonukleáz megfelelő működése ellenőrizhető. Az rs4689388, rs4273545, rs1064320, rs1046322 és az rs9457 SNP-k esetén a genotípust primer extenziós módszerrel is meghatároztuk. A módszer első lépésében hagyományos PCR-rel sokszorozítottuk fel az adott SNP körüli régiót, majd a genotípus meghatározása a négyféle fluoreszcens festékkel jelölt aciklo-, terminátor nukleotid alkalmazásával történt multiplex reakcióban eltérő hosszúságú extenziós primerek alkalmazásával. A kapott termékeket kapilláris gélelektroforézissel tettük láthatóvá.

Az rs148797429 inszerció / deléciónak elemzésének első lépéseként a polimorfizmus körüli régiót PCR segítségével felsokszorozítottuk. A kapott terméket hagyományos gélelektroforézis mellett – a megbízhatóbb genotipizálás érdekében – kapilláris gélelektroforézissel valamint olvadáspont analízissel vizsgáltuk.

### **Polimorfizmusok *in vitro* funkcionális elemzése**

A *WFS1* gén promoter illetve 3' UTR szabályozó régiójának vizsgálatához pGL3B illetve pMIR-REPORT luciferáz vektort használtunk. A promoter vizsgálatához különböző hosszúságú konstrukciókat hoztunk létre. A pMIR-REPORT vektorba a *WFS1* gén teljes 3' UTR-ét illesztettük be a mikro-RNS-ek szabályozó hatásának elemzésére. A inszert megfelelő beépülését először emésztést követő elválasztással, majd a megfelelő bázisrendet Sanger-szekvenálással is ellenőriztük. Az így elkészített konstrukciókból

irányított mutagenézissel hoztuk létre a vizsgálatok során használt további variánsokat.

A polimorfizmusok luciferáz rendszerrel történő elemzése során HEK293T sejtvonalat használtunk. A promoter régió vizsgálatánál a különböző allél variánsokat tartalmazó pGL3B konstrukciókat  $\beta$ -galaktozidáz vektorral kotranszfektáltuk. A 3' UTR régió vizsgálatokhoz a pMIR-REPORT konstrukciókat  $\beta$ -galaktozidázzal valamint a 185-ös prekursor mikro-RNS-sel együtt transzfektáltuk. Minden kísérlet során három párhuzamos mérést végeztünk.

24 órás inkubálást követően a sejtek feltárását három egymást követő fagyasztásos–olvasztásos lépéssel végeztük el. Az enzimaktivitás méréséhez a Varioskan Flash műszert használtuk, ami alkalmas mind luminometriai, mind fotometriai mérések elvégzésére.

### **RNS-izolálás, mikro-RNS mérés**

A mikro-RNS szintek meghatározásához a sejteket TRI reagensben gyűjtöttük be, ami meggátolta az RNS-ek lebomlását, az RNS-t kloroformos extrakciót követően izopropanol és etanol segítségével tisztítottuk. A mikro-RNS-ek szintjét real-time PCR segítségével határoztuk meg, melynek – a templát kis mérete miatt – előfeltétele volt, hogy a cDNS írás során a mintához mesterséges adapter szekvenciát szintetizáltunk, ami az egyik primer tapadási helyéül szolgált a reakció során.

### **Statisztikai módszerek**

A mintavétel valamint az alkalmazott genotipizáló eljárások megbízhatóságát a Hardy–Weinberg egyensúly tesztelésével ellenőriztük. Az eset–kontroll analíziseket  $\chi^2$ -próbával értékeltük ki, mivel több polimorfizmust elemeztünk egyidejűleg, a többszörös tesztelésre Bonferroni-korrekciónak végeztünk. Az enzim aktivitási adatokat minden esetben a  $\beta$ -galaktozidáz értékekkel normalizáltuk, az eredményeket egyszempontos ANOVA módszerrel elemeztük.

## **EREDMÉNYEK**

### **A vizsgált polimorfizmusok kiválasztása**

A polimorfizmusok kiválasztásánál – egyéb szempontok figyelembe vétele mellett – igyekeztünk azokra az SNP-kre fókuszálni, amelyeknek valódi molekuláris biológiai hatása lehet, így ténylegesen befolyásolhatják a keletkező wolframin fehérje mennyiségét. Ennek megfelelően olyan variánsokat kerestünk, melyek számítógépes predikció alapján valamely transzkripciós faktor eltérő hatékonyságú bekötődését eredményezik (promoter régió), illetve egy mikro-RNS kötődési helyén található (miR-SNP-k a 3' UTR-ben).

### **Genotipizálási módszerek**

A mindössze 6 bp hosszú szekvenciát érintő rs148797429 inszerció / delécio polimorfizmus megbízható genotipizálására három különböző módszert állítottunk be. Mindhárom módszer első lépéseként a környező génszakaszt PCR-rel amplifikáltuk. A keletkező fragmentumokat (1) hagyományos horizontális elektroforézis segítségével, (2) olvadáspont analízissel illetve (3) denaturáló multikapilláris gélelektroforézis segítségével elemeztük.

A szabályozó régiókban lévő 5 SNP egyidejű genotipizálására egy primer extenzió illetve multikapilláris gélelektroforézisen alapuló módszert állítottunk be. A módszer első lépésben egy hagyományos PCR segítségével amplifikáltuk a polimorfizmusok régióit. 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 festékekkel vannak megjelölve, így a kapott termék színe alapján a genotípus le-



olvasható. Az öt SNP egyidejű detektálását eltérő hosszúságú extenziós primerek alkalmazása tette lehetővé: így az egyes SNP-khez tartozó jelölt termék mérete eltérő volt, amik az elválasztás során egymástól jól elkülönültek.

### **Kapcsoltság- és haplotípuselemzés**

Az SNP-k kapcsoltságának megállapítása több okból is jelentős. 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, akkor az SNP-k közötti LD meghatározása alapvető fontosságú.

A kiválasztott *WFS1* polimorfizmusok kapcsoltságát a  $D'$  (sztenderdizált kapcsoltsági együttható) illetve az  $R^2$  (korrelációs koefficiens) értékek kiszámításával határoztuk meg. Esetünkben a három, promoter régióban lévő polimorfizmus alkotott egy haploblokkot. Ezt az erős kapcsoltságot mutatta 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%).

### **Asszociáció vizsgálatok**

A cukorbetegség és a *WFS1* gén polimorfizmusok közötti asszociációt eset–kontroll vizsgálat keretében elemeztük, amely során összehasonlítottuk a kiválasztott polimorfizmusok alléljainak gyakoriságát a beteg és az egészséges csoportban. Az egyes típusú diabétesz vizsgálatokor az rs1046322 SNP kiemelkedően ma-

gas szignifikancia és esélyhányados értéket mutatott, ami a polimorfizmus meghatározó szerepére utal. Noha nem egyedülálló, mégis talán érdekes, hogy ezen SNP kivételével a többi asszociáló polimorfizmus esetén a gyakori allél jelenti a rizikófaktort. Megjegyzendő, hogy ezen polimorfizmusoknál – a Bonferroni korrekciót követően is – statisztikailag szignifikáns összefüggést találtunk, ami azonban alacsony esélyhányadossal társult. Ez a cukorbetegség bonyolult molekuláris hátterével magyarázható, és jól mutatja azt, hogy egy-egy genetikai faktor csupán csekély mértékben járul hozzá a betegség kialakulásához.

A 3' UTR-ben lévő SNP-k (rs1046320, rs1046322 és rs9457) esetén haplotípus elemzést is végeztünk. Ezek az adatok is az rs1046322 SNP jelentőségét bizonyították egyes típusú diabéteszben. Ugyanakkor az eset–kontroll elemzés eredményei alapján az rs9457 polimorfizmus C allélja a kettes típusú diabétesz egyik lehetséges genetikai rizikófaktoraként valószínűsíthető.

### **Szabályozó régiók polimorfizmusainak funkcionális vizsgálata**

Az rs148797429 és az rs4273545 polimorfizmusok a *WFS1* gén promoter régiójában helyezkednek el, ezek expresszióra gyakorolt hatását *in vitro* sejtes rendszerben vizsgáltuk. Egy rövidebb és egy hosszabb konstrukciót is létrehoztunk a polimorfizmusok biológiai hatásának elemzéséhez. A „minimál promotert” magában foglaló rövidebb konstrukció csupán az rs4273545 SNP-t tartalmazta. Ebben a rendszerben nem mutatkozott szignifikáns különbség a „G” illetve a „T” allélt tartalmazó promoter szakasz expresszióra kifejtett hatása között. A hosszabb konstrukcióban mind az rs148797429 inszerció / deléción, mind pedig az rs4273545 polimorfizmus megtalálható. Bár az rs148797429 polimorfizmus önmagában nem befolyásolta a transzkripció aktivitását, ugyanakkor mégis úgy tűnik, hogy ezen génszakasz hozzá-

járul a promoter aktivitásának szabályozásához. Az rs4273545 SNP G illetve T allélja ugyanis ebben a rendszerben eltérő transzkripciós aktivitáshoz vezet. T variáns jelenléte esetén a relatív luciferáz aktivitás kb. 2,5-szer akkora volt, mint a G allél jelenléte esetén, tekintet nélkül arra, hogy mellette az rs148797429 polimorfizmus hosszabb vagy a rövidebb allélja állt.

Az rs9457 mikro-RNS kötődését befolyásoló szerepét szintén *in vitro* sejtes rendszerben vizsgáltuk. A PolymiRTS adatbázis szerint ez az SNP a miR-185 seed régiójában helyezkedik el. A fehérje expresszióra kifejtett hatás elemzéséhez a *WFS1* gén teljes 3' UTR régióját pMIR-Report vektorba klónoztuk. Irányított mutagenézis segítségével hoztuk létre a másik allélváltozatot tartalmazó konstrukciót, valamint a seed mutánst. 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 legalacsonyabb relatív luciferáz aktivitást az rs9457 SNP C alléljának esetében mértünk, ami csupán 35%-a volt a kontroll értéknek. Az ettől csupán egy bázisban eltérő G allél 1,7-szeres enzimaktivitás növekedést mutatott, ami gyakorlatilag megegyezett a seed mutáns aktivitásával. 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 – az adatok alapján – jelentősen gyengíti a miR-185 bekötődésének hatékonyságát. Feltételezhetően ehhez a nagy mértékű hatáshoz hozzájárul az is, hogy az SNP a kötőhely középső régiójában helyezkedik el.

## KÖVETKEZTETÉSEK

A technika 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 az addig elért eredmények lehangoló képet mutattak: az évente kb. százezer bázispár hosszúságú szekvencia meghatározásának tükrében a teljes genom bázissorrendjének feltárása beláthatatlan feladatnak tűnt. Bár – éppen emiatt – elvi újítások is bevezetésre kerültek, a munka sikeréhez mégis jelentősen hozzájárult a 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: az elméleti és gyakorlati klinikai tudományok számos területén a kutató munkától a diagnosztikán át a kezelésig a mind modernebb technikai eszközök eddig elképzelhetetlen új lehetőségeket kínálnak.

Ezen a módszerek segítségével egyre több esetben megvalósítható a betegségek hátterében álló 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 ezen kóros molekuláris mechanizmusok javítása a terápia feladata. A cukorbetegséggel kapcsolatban egy az endoplazmás retikulumban elhelyezkedő, a  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázisban szerepet játszó fehérje, a wolframin szerepe valószínűsíthető, és 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 jelleg hátterében álló folyamatrendszer csupán egy-egy apró elemét jelenti. Mégis az ehhez hasonló kutatási eredmények apránként kiadják a teljes képet, a molekuláris szintű patomechanizmus ismerete a diagnosztika mellett prevenció valamint a célzott, egyénre szabott kezelés alapjául szolgálhat.

## **SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE**

### **A dolgozat témakörében megjelent közlemények**

1. 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)
2. 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)

### **A dolgozat témájához szorosan nem kapcsolódó közlemények**

1. 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)
2. 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)
3. 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)

4. 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)
5. 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)
6. 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)
7. 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)
8. 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)

## 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.