

SNAP-25 gén izoformáinak és genetikai variánsainak vizsgálata

Doktori tézisek

Dr. Németh Nóra

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



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

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

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

Budapest
2016

Bevezetés

A komplex jellegek, mint például a különböző daganatos megbetegedések, a cukorbetegség vagy a különféle pszichiátriai kórképek esetén ismert, hogy kialakulásukban mind az öröklött, mind a környezeti tényezők fontos szerepet játszanak, jóllehet ezek egymáshoz viszonyított szerepe az egyes betegségek esetén eltérő. A tünetek megjelenése ezen etiológiai faktorok bonyolult kölcsönhatásának következménye, amelyben egy-egy komponens szerepe sok esetben csekély és nehezen kimutatható. Éppen ez teszi komplikálttá a komplex kórképek genetikai hátterének feltérképezését, ami azonban mégis nagy fontosságú, hiszen a betegségek genetikai és molekuláris hátterének megismerése az oki kezelés valamint a megelőzés szempontjából kulcskérdés.

A bemutatott kutatómunka a *SNAP-25* gén izoformáit és genetikai variánsait vizsgálta. A gén által kódolt fehérjetermék a SNARE komplex alkotásában vesz részt, így – más fehérjékkel együtt – szerepet játszik az intracelluláris vezikulák exocitózisában. A *SNAP-25* génről két eltérő transzkripciós variáns és ennek megfelelően két különböző fehérjetermék keletkezik. A két mRNS-izoforma 5. exonja nem azonos, ami 9 aminosav különbségben nyilvánul meg a fehérjék szintjén. A különböző izoformák mennyiségének illetve egymáshoz viszonyított arányának megváltozása nem csak az egyedfejlődés sajátos velejárója, de megfigyelhető egyes kórképek során is, így ezek gyors és pontos meghatározása mind elméleti, mind gyakorlati szempontból nagy jelentőségű.

A *SNAP-25* gén egy pontos nukleotid variációi (SNP) számos pszichiátriai asszociációvizsgálat kandidáns lókusza. Az SNP-k közül különös érdeklődésre tarthatnak számot azok a polimorfizmusok, amelyek a gének nem kódoló, szabályozó régióiban (promoter és UTR) helyezkednek el, s így hatással lehetnek a

képződő fehérje mennyiségére. Régóta ismert, hogy a promoter SNP-k transzkripciós faktorok bekötődésének megváltozása révén hatással lehetnek a transzkripció aktivitására. Az utóbbi időben ugyanakkor egyre több figyelem fordul a miRNS-ek révén megvalósuló szabályozó folyamatokra. Ma már több, mint 2500 érett miR ismert, és ezek jelentőségét az is mutatja, hogy jelenlegi becslések alapján a humán transzkriptom több, mint a fele áll mikro-RNS-ek szabályozása alatt. A rendszer komplexitását pedig jól jellemzi az a tény, hogy a legtöbb mRNS 3' UTR-hez több különböző miRNS is bekötődhet, illetve egy miRNS több különböző fehérje kifejeződésére is hatással van. A rendszert tovább színesíti az a megfigyelés, hogy bár RNS–RNS kölcsönhatásról van szó, mégis a miRNS-ek ill. az mRNS-ek egyszerű szekvencia analízisével (komplementaritásának vizsgálatával) az interakciók nem jósolhatók meg pontosan. Ennek a komplex szabályozó folyamatnak további modulálói a – munkánk súlypontját is képező – miRSNP-k: olyan polimorfizmusok, amelyek az mRNS-ek 3' UTR-ében miRNS kötőhelyen helyezkednek el, s így azok kötődési hatékonyságát befolyásolhatják. Egy ilyen SNP elemzése számos szempontból megvalósítható. A komplex jellegek háttérének elemzése során gyakran alkalmazott eljárás a genetikai asszociáció-vizsgálat, amelynek során azt elemzik, hogy egy adott genetikai konstelláció (allél, genotípus, haplotípus) gyakrabban társul-e valamilyen fenotípusos jegyhez. Ennek statisztikai bizonyítása ugyanakkor természetesen még nem jelent egyértelmű bizonyítékot arra, hogy a genotípus és a fenotípus között oki kapcsolat is fennáll. Az *in vitro* funkcionális elemzések (pl. riporter konstrukciók alkalmazásával sejtes rendszerben) segíthetnek feltárni az adott polimorfizmus szerepét a biológiai szabályozás során, s így az asszociáció-elemzés eredményeit alátámaszthatják. Munkánk során a *SNAP-25* gén néhány SNP-jét ilyen elvek alapján kívántuk vizsgálni.

Célkitűzések

Munkánk során a *SNAP-25* gén izoformáit és genetikai variánsait vizsgáltuk. A bemutatásra kerülő munka konkrét célkitűzései a következők voltak:

1. A humán *SNAP-25* gén két expressziós izoformájának specifikus mérése különböző humán szövetekben. Az izoformák mennyiségi meghatározásához két, egymástól független amplifikációs módszert kívántunk kidolgozni a megbízhatóság növelése érdekében. A módszerek beállításához és validálásához saját készítésű expressziós vektorokat terveztünk felhasználni.
2. Pszichogenetikai asszociációvizsgálat keretében kívántuk elemezni, hogy kimutatható-e asszociáció a *SNAP-25* gén 3' és 5' szabályozó régióiban található egy pontos nukleotid polimorfizmusok (SNP-k) és az impulzivitás személyiségjegy között egészséges személyekben.
3. Molekuláris biológiai technikákkal kívántuk vizsgálni, hogy a *SNAP-25* gén 3' szabályozó régiójában egymáshoz igen közel (4 bp távolságban) található két SNP (rs3746544, rs1051312) a mikro-RNS bekötődés befolyásolása révén hatással van-e a képződő fehérje mennyiségére.

Módszerek

1. A *SNAP-25* gén transzkripcióis izoformáinak vizsgálata

Különböző humán szövetekből származó RNS kivonatokból cDNS-t szintetizáltunk, a *SNAP-25* fehérjét kódoló szakaszt PCR-rel amplifikáltuk. Az inzertet standard protokollt követve pcDNA3.1(-) expressziós vektorba klónozva, hoztuk létre a *SNAP-25* gén *a* és *b* izoformáját kifejező expressziós konstrukciókat. Az elkészített konstrukciók bázissorrendjét direkt szekvenálással ellenőriztük.

A *SNAP-25* gén izoformáinak specifikus detektálására egy PCR-RFLP-n és egy valós idejű PCR-en alapuló módszert dolgoztunk ki, majd ezeket DNS-konstrukcióink segítségével validáltuk. A PCR-RFLP módszer során a mennyiségi meghatározás a gélelektroforézist követő denzitometriás mérésen alapult. A hatékonyabb és pontosabb elemzés érdekében ezt a mérést hagyományos horizontális elektroforézis mellett kapilláriselektroforézissel is elvégeztük.

2. A *SNAP-25* gén polimorfizmusainak pszichogenetikai asszociációvizsgálata

901 egészséges fiatal felnőtt vett részt a pszichogenetikai asszociáció vizsgálatban, melyet az ELTE Pszichogenetikai munkacsoportjával együttműködésben végeztünk el. A résztvevőket a vizsgálat módjáról és céljáról tájékoztattuk, ezt követően beleegyező nyilatkozatot írtak alá, és a genetikai vizsgálatához szájnyálkahártya mintát adtak. A kutatás protokollját az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (ETT-TUKEB) jóváhagyta. Az impulzivitás mérése az önbevalláson alapuló Barratt Impulzivitás Kérdőív kitöltésével történt.

A genetikai vizsgálatokhoz irodalmi és *in silico* adatok alapján a *SNAP-25* négy – az 5' (rs6077690 A/T, rs6039769 A/C) illetve a 3' (rs1051312 C/T, rs3746544 G/T) szabályozó régiókban elhelyezkedő – SNP-jét választottuk ki. A szájnyálkahártya mintákból

DNS-t izoláltunk, a genotípus meghatározása PCR-RFLP és valós idejű PCR technikák segítségével történt. A 3' UTR-ben elhelyezkedő két SNP esetében – azok közeli elhelyezkedése miatt – real-time PCR alapú eljárással a két polimorfizmus haplotípusát is meghatároztuk. A lókuszok közötti kapcsoltságát a HaploView 4.2 program alkalmazásával határoztuk meg.

A genotípus ill. a haplotípus eredmények illetve az impulzivitás közötti összefüggést ANOVA statisztikai módszerrel elemeztük.

3. A SNAP-25 variánsok szabályozó szerepének *in vitro* funkcionális elemzése

Az asszociációvizsgálatunk eredményei alapján a 3' UTR két polimorfizmusát (rs1051312, rs3746544) vontuk be a molekuláris biológiai funkcionális vizsgálatokba. A SNAP-25 teljes 3' UTR szakaszát pMIR Report vektorokba klónoztuk, a 2 egymáshoz igen közel elhelyezkedő polimorfizmus 4 elméletileg lehetséges haplotípusát irányított mutagenézissel hoztuk létre. A riporter konstrukciókat a miR-641 mikroRNS-essel kotranszfektálva HEK293T sejtvonalakba juttattuk, kontrollként β -galaktozidáz kódoló konstrukciót alkalmaztunk. A sejteket 24 órán át inkubáltuk, majd begyűjtésük után feltártuk, és a sejtkivonatokból luminometriás illetve fotometriás módszerrel mértük a luciferáz és béta-galaktozidáz enzimek aktivitását. A relatív luciferáz szinteket a két enzimaktivitás érték hányadosának kiszámolásával állapítottuk meg.

Rövidítések

GAPDH: gliceraldehid-3foszfát dehidrogenáz, miR: mikroRNS, miRSNP: mikroRNS-ek kötődését befolyásoló SNP, PCR: polimeráz láncreakció, RFLP: restrikciós fragmentum hosszúság polimorfizmus, SNAP-25: synaptosomal-associated protein-25, SNP: egyponos nukleotid variáció: UTR: nem transzlálódó régió

Eredmények

1. A SNAP-25 transzkripció izoformáinak vizsgálata

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a SNAP-25 két izoformája egymástól mindössze az ötödik exonjában különbözik, ami a keletkező fehérjék szintjén 9 aminosav különbséget jelent. Munkánk első részében **két, egymástól független módszert dolgoztunk ki a SNAP-25 ezen két mRNS izoformájának mennyiségi meghatározására**. A két módszer belső kontrolljaként elsőként a SNAP-25 *a* és *b* variánsának cDNS-ét pcDNA3.1(-) expressziós plazmidba klónoztuk, ezen konstrukciókat alkalmaztuk a kidolgozott módszerek optimalizálásához.

Az első eljárás **PCR-en**, az *a* izoforma **szelektív hasításán és elektroforetikus mennyiségi meghatározáson** alapult. Első lépésként az 5. exon megfelelő régióját PCR-rel felsokszoroztuk, különös gondot kellett fordítani a ciklusszám pontos beállítására, mivel a SNAP-25 izoformák mennyisége az idegrendszeri eredetű valamint az egyéb szövetekben több nagyságrenddel is eltér. A *Dde* I restrikciós endonukleáz szelektíven hasította az *a* izoformától képződő ampikonokat, így az emésztést követő elektroforézis során lehetővé vált a két transzkripció variáns mennyiségének meghatározása.

A **SNAP-25 két mRNS izoformájának szelektív meghatározására valós idejű PCR technikán** alapuló eljárást is beállítottunk. Ehhez ebben az esetben a két izoformára specifikus primereket terveztünk. Belső kontrollként TaqMan GAPDH kitet alkalmaztunk, és az izoformák egymáshoz viszonyított mennyiségét ΔC_T -módszerrel számítottuk ki. Öttagú felezési hígítási sorral bizonyítottunk, hogy a kidolgozott rendszerrel a transzkripció variánsok mennyiségi meghatározása megbízhatóan elvégezhető.

A módszereink optimalizálását követően **a két izoforma mennyiségét** és egymáshoz viszonyított arányait **10 különböző** (4 idegrendszeri eredetű és 6 idegrendszeren kívüli) humán **szövetben mértük meg**. A valós idejű PCR-rel meghatározott értékek és a

PCR-RFLP utáni denzitometria szemikvantitatív eredményei megfelelő egyezést mutattak. Minden **neurális** eredetű **szövetben a b izoforma mennyisége volt magasabb**, a legmagasabb értéket mindkét izoforma esetében a frontális lebenyben mértük. Érdekes módon **a SNAP-25 két transzkripciós variánsának aránya az idegrendszeren kívüli szövetekben egységesen fordított** volt a neuronális szövetekéhez képest, az **abszolút mennyiségük** pedig általánosan két nagyságrenddel **alacsonyabbnak** mutatkozott.

2. A SNAP-25 szabályozó polimorfizmusainak vizsgálata

Munkánk során a transzkripciós variánsok elemzése mellett a gén néhány kiválasztott SNP-jének elemzésére is sor került. Genetikai asszociációvizsgálat során elemeztük, hogy kimutatható-e **összefüggés a SNAP-25 polimorfizmusok és az impulzivitás** endofenotípus **között**.

Első lépésben *in silico* vizsgáltuk a *SNAP-25* gén 5' és 3' szabályozó régióiban található polimorfizmusokat. Mindkét szakaszon két SNP-t (5' régió: rs6077690, rs6039769; 3' UTR: rs1051312, rs3746544) választottunk ki, amelyek esetében *in silico* módszerekkel funkcionális hatást lehetett feltételezni.

Vizsgálatainkba 901 egészséges személyt vontunk be, ezen viszonylag nagy populáció elemzése alapján megfigyeltük, hogy **mind a négy variáns genotípus eloszlása megfelelt a Hardy-Weinberg egyensúly** alapján számított várható értéknek, a ritka allél frekvenciák (MAF) 0,255 és 0,417 között mozogtak.

Az 5' szabályozó régióban lévő polimorfizmusok egymástól fizikailag távol helyezkedtek el, így ezek haplotípus frekvenciáit „hagyományos módon”, számítással határoztuk meg. A **3' UTR-ben** lévő két polimorfizmus ugyanakkor mindössze 4 bázispár távolságban helyezkedik el egymástól, ezért az alkalmazott vizsgálati módszer a két SNP genotípus elemzése mellett azok **direkt, molekuláris haplotípus meghatározását** is lehetővé tette.

Munkacsoportunk korábbi eredményét alátámasztva ezen kutatás keretében is megállapítottuk, hogy a 3' UTR régióban az rs1051312 és rs3746544 SNP-k **G–C haplotípusa** egyáltalán **nem fordul elő** az általunk vizsgált populációban. Érdekes módon hasonló eredményt kaptunk az 5' szabályozó régió haplotípusainak meghatározásakor is. Bár az 5' UTR régió SNP-inek (rs6077690, rs6039769) mind a 4 haplotípusa előfordult, mégis a T–A változat gyakorisága (0,006) jóval alacsonyabb volt az allélfrekvenciák alapján számított várható értékénél (0,161). Ezt a speciális viszonyt a kapcsoltság számszerű meghatározása során a magas Lewontin-féle D' értékhez társuló alacsony R^2 érték is mutatta.

A 3' és az 5' szabályozó régiók két-két polimorfizmusa között kapcsoltság nem volt kimutatható.

Az így meghatározott genotípus és haplotípus adatokat asszociáció elemzés során használtuk fel annak vizsgálata céljából, hogy **kimutatható-e asszociáció a SNAP-25 SNP-k és az impulzivitás fenotípus között**, azaz az egyes genotípus ill. haplotípus csoportokba tartozó személyek átlagos impulzivitás pontszáma szignifikánsan eltérő-e.

Az **5' szabályozó régió** polimorfizmusai esetében **nem találtunk összefüggést** az impulzivitás és a genetikai variánsok között. A **3' szabályozó régió** rs1051312 **SNP nominális asszociációt** mutatott az impulzivitást mérő Barratt-összpontszámmal ($p = 0,042$), ami azonban nem érte el a Bonferroni korrekció alkalmazásával meghatározott statisztikai szignifikancia szintet. Az 5' és a 3' UTR régió két-két polimorfizmusának haplotípus-alapú varianciaanalízise során az 5' régió polimorfizmusával továbbra sem találtunk szignifikáns összefüggést. A **3' UTR**-ben lévő rs1051312 és rs3746544 SNP-k **haplotípusa** esetében ugyanakkor a T–T változattal rendelkező személyek **szignifikánsan** alacsonyabb Barratt-összpontszámmal rendelkeztek. Ez a hatás szignifikáns volt abban az esetben is, ha a 3 haplotípust egyenként hasonlítottuk össze ($p = 0,009$) és akkor is, ha a T–T haplotípust hordozókat vetettük össze az azzal nem rendelkezőkkel ($p = 0,003$).

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

Az asszociációvizsgálat eredményei alapján a 3' UTR régió két SNP-jét *in vitro* funkcionális elemzéssel kívántuk tovább vizsgálni. Az *in silico* szekvencia elemzések arra engedtek következtetni, hogy mindkét vizsgált 3' UTR polimorfizmus (rs1051312, rs3746544) hatással lehet a miR-641 és a *SNAP-25* mRNS-e közötti kölcsönhatásra, mert a vizsgált SNP-k a miRNS által felismert mRNS-en a *seed* régió célszekvenciájában találhatóak.

Első lépésben arra voltunk kíváncsiak, hogy a modellsejtjeink milyen mennyiségben expresszálják a *SNAP-25* mRNS-t és a miR-641-et. Az irodalmi adatokat reprodukálni tudtuk, miszerint **a HEK293 sejtekben kimutatható a *SNAP-25* gén kifejeződése.** A miR-641-et ugyancsak sikeresen detektáltuk a HEK293 sejtekben, azonban a belső kontrollként mért miR-196b mennyiségéhez képest csak elenyésző mértékben.

A továbbiakban a *SNAP-25* gén teljes 3' szabályozó régióját **pMIR-Riport luciferáz** vektorba klónoztuk, és a négy, elméletileg lehetséges haplotípusú konstrukciót irányított mutagenezissel létrehoztuk. Hígítási sor alkalmazásával határoztuk meg az egyes konstrukciók optimális mennyiségét a funkcionális mérések során. Ezt követően az rs1051312 és az rs3746544 SNP-k feltételezett szabályozó szerepét úgy vizsgáltuk, hogy összehasonlítottuk a **4 különböző haplotípust** hordozó riporter konstrukciókkal mérhető **relatív luciferáz értékeket.** A **legalacsonyabb aktivitást a T–T** haplotípus esetében figyeltük meg, mely haplotípus jelenlétekor a **miR-641** mikro-RNS *seed* régiója és a **3' UTR**-ben (A *SNAP-25* gén 3' UTR régióját tartalmazó riporter konstrukcióban) található kötő szekvencia **tökéletesen komplementer** egymással.

A G–T és T–C haplotípusok esetén a relatív luciferáz aktivitás 1,8-szoros, illetve 2,1-szeres volt. Amellett, hogy a kötőhely egyetlen nukleotidjának megváltozása szignifikánsan emelte a riporter aktivitását, nem volt szignifikáns a különbség a G–T és a T–C haplotípusokkal kapott értékek között, ami arra utalhat, hogy ebben az esetben közömbös, hogy a *seed* szekvencia melyik nukleotidja nem komplementer a 3' UTR-ben lévő kötőhellyel.

A G–C haplotípus esetén 2 helyen is „elromlik” a miRNS kötőhelye, ennek megfelelően 4,6-szoros relatív luciferáz aktivitás emelkedést figyeltünk meg.

Következtetések

A társadalmat egyre nagyobb hányadban érintő úgynevezett népbetegségek (pl.: magas vérnyomásbetegség, időskori cukorbetegség, számos pszichiátriai megbetegedés) annak ellenére, hogy gyakran családi halmozódást mutatnak, korántsem magyarázhatóak egyetlen gén megváltozott működésével. Ezen komplex jellegek és megbetegedések számos, önállóan csak kisebb hatással bíró genetikai variáns és a legkülönbözőbb környezeti hatások összességének következményeként alakulnak ki.

Az általunk vizsgált *SNAP-25* gén jól példázza azt a nem ritka esetet, hogy egy gén illetve az általa kódolt fehérje variabilitása nem csak az adott régióban található polimorfizmusokkal, hanem a különböző transzkripciós izoformákkal is magyarázható. Az egyes variánsok ill. azok szintjének megváltozása különböző kóreléltani folyamatok biomarkere lehet. A transzkripciós izoformák illetve egy gén kifejeződésének a részletes meghatározása rámutathat arra is, hogy egy fehérje akár több funkcióval is rendelkezik a jelenleg ismerteknél, például nem zárható ki, hogy a *SNAP-25* a központi idegrendszeren kívül a hasnyálmirigy szekretoros funkciójában is meghatározó szerepet játszik.

A fehérjék optimális mennyisége szintén döntő szerepű: egyre több adat bizonyítja a mikro-RNS-ek által történő szabályozás fontosságát, mitöbb, napjainkban már az is ismert, hogy a miRNS-ek egy-egy betegség diagnosztikájában vagy akár kezelésében is szerepelhetnek. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a miRNS-ek által megvalósuló szabályozás illetve ennek SNP-k révén történő modulálása a *SNAP-25* fehérje esetében is hozzájárul a transláció finomhangolásához.

Mindezek tükrében elmondható, hogy a monogénes kórképekkel szemben a genotípus és a fenotípus közötti egyértelmű kapcsolat a komplex jellegek esetében nem vagy csak jóval nehezebben határozható meg. A háttérben álló egy-egy komponens felderítése ugyanakkor mégis hasznos információkat jelenthet nem csak elméleti, de klinikai szempontból is a megelőzés, a diagnosztika és a hatékony, oki kezelés terén is.

Saját publikációk jegyzéke

A dolgozat témakörében megjelent közlemények

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

A dolgozat témájához szorosan nem kapcsolódó közlemények

1. Nagy G, Kovacs-Nagy R, Kereszturi E, Somogyi A, Szekely A, Nemeth N, Hosszufalusi N, Panczel P, Ronai Z, Sasvari-Szekely M. (2009) Association of hypoxia inducible factor-1 alpha gene polymorphism with both type 1 and type 2 diabetes in a Caucasian (Hungarian) sample. *BMC Med. Gen.*, 10:79
2. Spiró Z, Arslan MA, Somogyvári M, Nguyen MT, Smolders A, Dancsó B, Németh N, Elek Z, Braeckman BP, Csermely P, Sőti C. (2012) RNA interference links oxidative stress to the inhibition of heat stress adaptation. *Antioxid. Redox Signal.*, 17:890-901
3. Kerékgyártó M, Németh N, Kerekes T, Rónai Z, Guttman A. (2013) Ultrafast haplotyping of putative microRNA-binding sites in the WFS1 gene by multiplex polymerase chain reaction and capillary gel electrophoresis. *J Chromatogr A*, 1286:229-34
4. Eszter Kotyuk, Gergely Keszler, Nora Nemeth, Zsolt Ronai, Maria Sasvari-Szekely, Anna Szekely. (2013) Glial cell line-

derived neurotrophic factor (GDNF) as a novel candidate gene of anxiety. *PLOS One*, 8:e80613

5. Kótyuk Eszter, Németh Nóra, Halmai Zsuzsa, Faludi Gábor, Sasvári-Székely Mária, Székely Anna. (2013) A hangulati dimenziók és a glia-eredetű növekedési faktort kódoló gén polimorfizmusainak összefüggése depresszióval diagnosztizált mintán. *Neuropsychopharmacol Hung*, 15:63-72
6. Elek Z, Németh N, Nagy G, Németh H, Somogyi A, Hosszúfalusi N, Sasvári-Székely M, Rónai Z. (2016) Micro-RNA Binding Site Polymorphisms in the WFS1 Gene Are Risk factors of diabetes mellitus. *PLoS One*, 10:e0139519

Köszönetnyilvánítás

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

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

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

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

Köszönöm Professzor Guttman Andrásnak és Dr. Kerékgyártó Mártának a Debreceni Egyetem, valamint Dr. Székely Annának és Dr. Kótyuk Eszternek az ELTE Pszichológiai Intézetének munkatársainak a remek kollaborációt, továbbá a vizsgálatban résztvevő személyek közreműködését.

Végül nagyon köszönöm családomnak és barátaimnak a kitartó támogatását, biztatását.