

dc_1984_22

*MTA Orvosi Tudományok Osztálya
Doktori Értekezés Tézisei*



**GENETIKAI POLIMORFIZMUSOK VIZSGÁLATA: A
GÉNVARIÁCIÓK MOLEKULÁRIS HATÁSÁTÓL A
KOMPLEX JELLEGEK ÖRÖKLETES HÁTTERÉIG**

Dr. Rónai Zsolt

Semmelweis Egyetem
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet
Molekuláris Biológiai Tanszék

2022.

dc_1984_22

1 IRODALMI HÁTTÉR

A Humán Genom Projekt kevesebb, mint másfél évtized alatt alapjaiban változtatta meg a genetikai és genomikai kutatásokat. Az emberi genomot alkotó kb. 3 milliárd bázispárnyi DNS-szekvencia 2003-ra ismertté és mindenki számára elérhetővé vált. Ez a tudás az informatika, valamint a molekuláris biológia eszköztárának hihetetlen ütemű fejlődésével együtt számtalan új lehetőséget kínál az elméleti orvostudomány, valamint a klinikum terén egyaránt.

A molekuláris biológiai módszerek a gyógyító munka mindennapos eszközeivé váltak. Napjaink egyik legaktuálisabb népegészségügyi kihívása, a koronavírus járvány kapcsán a „PCR-teszt” hétköznapi fogalom lett. A PCR- és real-time PCR-alapú technikák, valamint az új generációs szekvenálási eljárások azonban a diagnosztika hasznos eszközei több más területen is. Alkalmazásukkal a fertőzések mellett a monogénes betegségek, aneuploidiák és más kromoszóma rendellenességek hatékony kimutatása is lehetséges akár már jóval a születés előtt (prenatális diagnosztika, terhességi szűrővizsgálatok, preimplantációs diagnosztika). A molekuláris biológiai eljárások emellett a terápiában is használatosak: a hiányzó gén adenovírus eredetű vektorral történő bejuttatása a cisztikus fibrózis kezelése során egy a ma már általánosan alkalmazott technikák között, és ismertek terápiás protokollok, melyek miRNS-ek működésének befolyásolása révén fejtik ki hatásukat.

Egy másik jelentős terület a komplex jellegek örökletes faktorainak kutatása. Ebbe a csoportba tartozik csaknem minden gyakori betegség a diabetes mellitus-tól a pszichiátriai és szív-, érrendszeri kórképeken át a daganatokig: nyilvánvaló, hogy az ezek hátterében meghúzódó molekuláris folyamatok feltárása mind elméleti, mind klinikai szempontból alapvető. Az örökletes tényezők, a molekuláris patomechanizmus megismerése hozzájárulhat a primer és szekunder prevencióhoz, emellett a biológiai alapon nyugvó, relevánsabb diagnosztikus kategóriák definiálását, új gyógyszer-támadáspontok feltárását, valamint a célzott

és egyénre szabott terápiás protokollok megalkotását is lehetővé teszi. A kihívást itt elsősorban az jelenti, hogy a komplex jellegek kialakulásáért a környezeti tényezők és számos egyenként kis hatású genetikai variáció hálózatos jellegű kölcsönhatása felel, emiatt egy-egy polimorfizmus egyedi szerepét rendszerint nehéz kimutatni. Mégis az új generációs szekvenálási eljárások elterjedésének köszönhetően ma már több betegség (pl. gyulladós bélbetegségek, koszorúér megbetegedés, 2-es típusú diabetes mellitus) esetén kiszámítható egy poligénes rizikó pontszám, mellyel az adott kórkép kialakulásának esélye – akár több mint 6 millió polimorfizmus genotípusának figyelembevételével – megbízhatóan meghatározható.

A komplex kórképek genetikai hátterét meghatározó polimorfizmusok mind kiterjedésüket, mind biológiai funkciójukat tekintve rendkívül különbözőek lehetnek. Az egy pontos nukleotid polimorfizmusok (SNP) egyetlen egy, az ismétlődési variációk – mikroszatelliták, VNTR-ek (variable number of tandem repeats), CNV-k (copy number variation) – 10 – 10^5 bázispár hosszú DNS-szakasz megváltozását jelentik, és lokalizációjuktól függően a képződő fehérje szerkezetére vagy a génkifejeződés szabályozására is hatással lehetnek. A hatékony és megbízható genotipizáló eljárások megismerésük alapját jelentik: ezen a területen a molekuláris biológia eszköztára a PCR-alapú célzott technikáktól az új generációs szekvenálási módszerekig meglepően rövid idő alatt igen sokat fejlődött. A nagy áteresztőképességű, akár genom szintű szekvencia analízis az asszociáció elemzések során is új lehetőségeket kínál. A kórképekkel összefüggést mutató polimorfizmusok biológiai funkciójának megismerése pedig rávilágít az adott gén és a betegség élettani kapcsolatára, ami a molekuláris patomechanizmus megértésén keresztül a célzott kezelés alapjait teremtheti meg. Kutatócsoportunk munkájának négy fő kandidáns génje a *DRD4* (D4-es dopamin receptor), a *SNAP-25* (szinaptoszóma-asszociált fehérje-25), a *WFS1* (wolf-

ramin) és a *C4* (C4-es komplement fehérje) volt, kutatásaink ezen gének polimorfizmusainak három pilléren – genotípus- és haplotípus elemzés, asszociáció analízis, funkcionális vizsgálat – nyugvó elemzésére irányultak.

A pszichogenetikai asszociáció vizsgálatok úttörő munkája a *DRD4* gén 3. exonjában lévő 48 bp-os VNTR (ismétlődési polimorfizmus – variable number of tandem repeats) és az „újdonságkeresés” személyiségjegy közötti kapcsolat leírása volt.

A dopamin a katekolaminok közé tartozó ingerület-átvivő, szerepet játszik a mozgásszabályozásban, a neuroendokrin működésben, és befolyásolja az érzelmek, indulatok kifejeződését. A dopaminrendszer és a *DRD4* ennek megfelelően számos klinikai vonatkozással rendelkezik. A szkizofrénia hátterében központi idegrendszeri dopamin túlsúly áll, a betegek agyában a *DRD4* mennyisége jelentősen emelkedett, s a kezelés során használt atípusos antipszichotikum, a clozapin is ehhez a receptorhoz kötődik legmagasabb affinitással.

A gén 3. exonjában elhelyezkedő 48 bp-os ismétlődési polimorfizmust napjainkig nagy érdeklődés övezi. Ez a génrégió a harmadik citoplazmatikus hurok kódolásában játszik szerepet, melynek funkciója a receptor és a G-fehérje közötti kapcsolat kialakítása. Az ismétlődési szám 2 és 10 között változhat, ami a polipeptidláncban egy 16 aminosav hosszúságú szakasz ismétlődését eredményezi. Meglepő, hogy mindegyik forma működőképes, ugyanakkor a gyakori „hosszú” változat, a 7× allél által kódolt fehérje hatékonysága kb. fele akkora, mint a leggyakoribb 4× vagy a 2× változatú receptoré. Az újdonságkeresés mellett a VNTR-t számos további jelleggel – különböző személyiségjegyek, dohányzás – hozták összefüggésbe, valamint asszociációt mutatnak ki a polimorfizmus és egyes pszichiátriai rendellenességek, mint a szorongás, a figyelemhiányos hiperaktivitás és a szerfüggőség, illetve abúzus között is.

A *SNAP-25* gén által kódolt fehérje a SNARE (SNAP receptor) komplex kialakításában vesz részt, ennek révén szerepet játszik az intracelluláris vezikulumok exocitózisában. A génről két különböző transzkripciós variáns íródhat át, a különbség fehérjeszinten is megmutatkozik. A két izoforma mennyiségének, illetve egymáshoz viszonyított arányának megváltozása az egyedfejlődés sajátos velejárója, de megfigyelhető egyes kórképek során is. A *SNAP-25* 3' UTR-ében (nem transzlálódó régió) elhelyezkedő 2 SNP-t (rs3746544 és rs1051312) több vizsgálat a figyelemhiányos hiperaktivitás (ADHD) rizikófaktoraként azonosította, és megfigyelték, hogy az ADHD-hoz kapcsolódó major depresszió jelenléte esetén az asszociáció még kifejezettebb. Bipoláris hangulatzavarban szenvedő személyek agyából származó post mortem mintákban a *SNAP-25* mennyiségének csökkenését figyelték meg. Bár hasonló eltérés szkizofréniában szenvedő betegek esetén nem volt megfigyelhető, a gén polimorfizmusai és a betegség előfordulása között gyenge összefüggés kimutatható.

A *WFS1* gén a wolframint kódolja: a fehérje az endoplazmás retikulum membránjában elhelyezkedő glikoprotein. A gén csaknem minden szövetben kifejeződik, legmagasabb expressziót a szívben, a központi idegrendszerben, és a hasnyálmirigy β -sejtjeiben figyeltek meg. A gén funkcióvesztő mutációi a Wolfram-szindróma kialakulásához vezetnek. A ritka neurodegeneratív kórkép diabetes insipidus-szal, diabetes mellitus-szal, optikus atrófiával és siketséggel társul, és gyakran jár együtt különböző mentális zavarokkal. A *WFS1* génkiütött egerekben csökkent β -sejtszám, valamint glükóz hatására alacsony inzulin szekréció figyelhető meg. Mindezek alapján feltételezhető volt, hogy a *WFS1* génben előforduló polimorfizmusok pszichiátriai rendellenességek, valamint a cukorbetegség örökletes komponensei lehetnek. Az rs4689388 SNP és a 2-es típusú diabetes mellitus összefüggését egy genom szintű asszociáció vizsgálat (GWAS) mutatta ki 2009-ben, metaanalízisek az rs1046320 és az rs10010131 SNP-k szerepére világítottak

rá. A DNS-szekvencia, valamint az SNP-k elemzésére szolgáló eljárások gyors fejlődésével az egyes polimorfizmusok biológiai hatásának idő- és munkaigényes elemzése legtöbbször nem tud lépést tartani. Így volt ez az említett SNP-k esetén is, melyek molekuláris biológiai hatásmechanizmusának felderítése váratott magára.

A 4-es komplement komponens génje (*C4A* és *C4B*) sajátos variabilitást mutat. A gén az MHC II régióban egy nukleáris protein kináz (*RP*), a 21-hidroxiáz (*CYP21*) és a tenaszcin-X (*TNX*) génjével az RCCX-modult hozza létre. A négy génből álló egységet sajátos ismétlődési variáció – CNV (copy number variation) – jellemzi létrehozva az egy, kettő vagy három kópiát tartalmazó komplexet. Érdekes, hogy a *C4* gének (szemben a három másik alkotóval) minden modulban aktívak, így genomunkban akár 6 működő *C4* gén is jelen lehet. A képet tovább tarkítja, hogy a *C4* géneknek két különböző típusa, a *C4A* és a *C4B* ismert, az ezekről átíródó fehérjék funkciója kis mértékben eltérő. Így nem csak az abszolút génszám, hanem a két izoforma aránya is variabilitást mutat. A *C4A* mennyiségének csökkenése a fertőzésekre való fokozott hajlam mellett szisztémás lupus erythematosus (SLE), valamint érkárosodás talaján fiatal korban kialakuló miokardiális infarktus rizikófaktora lehet, *C4B*-hiány következtében erythema nodosum és IgA-nefropátia kialakulásáról számoltak be. Emellett felvetődött a *C4*-aktiválódás és a koronavírusfertőzés talaján kialakuló diffúz mikrovaskuláris trombózis közötti kapcsolat lehetősége is.

Az ezen génekben kiválasztott polimorfizmusokat több komplex jelleg – az agresszió és az impulzivitás endofenotípus, valamint a cukorbetegség – lehetséges genetikai komponenseként elemeztük. A polimorfizmusok génen belüli lokalizációja, ennek megfelelően biológiai működése is különböző volt, ezek közül kiemelhetők a miRNS-ek kötőhelyében található SNP-k, melyek hatással lehetnek a génkifejeződés regulációjára. A miRNS-ek révén megvalósuló szabályozás számos érdekes kérdést felvet. Annak ellenére, hogy megvalósulása RNS–RNS

kölcsönhatáson alapul, a nukleinsavak szekvenciájának ismerete alapján az interakció hatékonysága mégsem jósolható meg egyértelműen. A miRTarBase adatbázis több mint kétmillió miRNS–mRNS kölcsönhatást sorakoztat fel, melyek közül kevesebb, mint 50 000-et sikerült eddig Western-blot, qPCR vagy riporter konstrukció segítségével validálni. Ezek a számok egyfelől aláhúzzák a molekuláris biológiai elemzések fontosságát, másfelől rávilágítanak arra, hogy a miRNS-ek révén megvalósuló szabályozás komplex hálózatként fogható fel: egyetlen miRNS számos gén expresszióját befolyásolhatja, és egyetlen gén kifejeződésére több miRNS is hatással lehet, emellett ismert ma már példa arra is, hogy a nem kódoló RNS-ek egymással is interakcióba lépnek.

2 CÉLKITŰZÉS

A bemutatott tudományos munka fő célkitűzése – a központi idegrendszeri működésben is szerepet játszó – gének szabályozó régióiban elhelyezkedő, kiválasztott polimorfizmusainak funkcionális és asszociáció elemzése volt.

Ehhez első lépésként olyan genotipizáló eljárásokat kívántunk beállítani és optimalizálni, melyekkel a kiválasztott célgének egyes polimorfizmusai megbízhatóan és hatékonyan elemezhetők. Közeli variációk esetén külön figyelmet kívántunk fordítani a haplotípus, azaz az allélok relatív kromoszomális lokalizációjának meghatározására, mivel ez a biológiai hatás szempontjából döntő jelentőségű lehet. Bár az SNP-k és az ismétlődési variációk vizsgálata valamelyest eltérő megközelítést igényel, közös bennük, hogy az elemzés szűk keresztmetszetét gyakran az elektroforetikus analízis jelenti. Munkánk során ezért célul tűztük ki olyan technikák – ultravékony és kapilláris gélelektroforézis, mikrofluidikai eszköz – alkalmazását, melyekkel a DNS-fragmentumok elválasztása automatizálható, hatékonysága és érzékenysége fokozható.

A beállított genotipizáló és haplotipizáló eljárásokat klinikai együttműködések keretében kívántuk alkalmazni: arra a kérdésre kerestük a választ, hogy egyes komplex jellegek – az agresszió, valamint az impulzivitás endofenotípus és a cukorbetegség – asszociációban állnak-e a kiválasztott kandidáns génekkel (*DRD4*, *WFS1*, *SNAP-25*), illetve azok bizonyos polimorfizmusaival.

A tervezett munka harmadik, talán legfőbb pillére az egyes jellegekkel asszociációt mutató genetikai variációk funkcionális vizsgálata volt. Izgalmas kérdésnek ígérkezett, hogy a kiválasztott célgének – főként a *WFS1* és a *SNAP-25* – promoterében, illetve 3' UTR-ében lévő polimorfizmusok eltérő mechanizmussal szerepet játszhatnak-e a génkifejeződés szabályozásában.

3 MÓDSZEREK

3.1 Polimorfizmusok genotipizálása, asszociáció vizsgálatok

Az asszociáció vizsgálatok során az impulzivitás és az agresszió mérése az önbevalláson alapuló Barratt Impulzivitás Skála ($N = 901$), illetve a Buss-Perry Agresszió Kérdőív ($N = 801$) kitöltésével történt. A diabetes mellitus-ban szenvedő személyek ($N = 900$) a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika járó- és fekvőbeteg-ellátása keretében kezelt betegek köréből kerültek ki. A vizsgálatokat az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (ETT-TUKEB) hagyta jóvá, a mintavétel és a genetikai elemzések megkezdése előtt minden résztvevő részletes írásbeli tájékoztatót kapott a kutatás céljáról és menetéről, valamint írásos beleegyező nyilatkozatot töltött ki. Az egyedi kóddal ellátott mintákat anonim módon kezeltük.

A DNS-mintavétel nem-invazív módon történt: a résztvevők az ínny vagy a bucca felszínéről vattapálcával szájnyalak-hártya-sejteket gyűjtöttek. A DNS-tisztítás a sejtek lízisével, valamint a fehérjék SDS-sel történő denaturálásával kezdődött. Proteináz K emésztést és a fehérjék

NaCl-os kisózását követően a DNS kicsapása izopropanollal és etanollal történt, majd a DNS csapadékot TE pufferben oldottuk fel.

A VNTR-ek, valamint SNP-k PCR–RFLP-vel, illetve allél-specifikus PCR-rel történő genotipizálása során a Qiagen HotStarTaq[®] DNS-polimeráz kitet alkalmaztuk. A méréseket 6–10 µl végtérfogatban végeztük el, a keletkező termékeket – várható méretüktől függően – különböző koncentrációjú hagyományos vagy metaphor agaróz gélelektroforézissel választottuk el egymástól. Az SNP-k és a CNV-k real-time PCR-rel történő elemzése során saját tervezésű, illetve kereskedelmi forgalomban beszerezhető primereket és TaqMan próbákat alkalmaztunk. A laboratóriumunkban működő QuantStudio 12K Flex berendezés segítségével méréseinket miniatürizált formában is el tudtuk végezni. Az OpenArray lemezek a primereket és a próbákat előre meghatározott elrendezésben tartalmazzák, a reakciók 33 nl térfogatban zajlanak.

A nagyobb áteresztőképességű és jobb felbontású fragmentum analízis céljából a hagyományos, horizontális alámerülő agaróz gélelektroforézis mellett különböző, hatékony elválasztástechnikai eljárásokat is alkalmaztunk. Az ultravékony gélelektroforézis során a DNS-fragmentumokat egy üvegkazettában lévő 190 µm vastagságú agaróz–lineáris poliakrilamid gélben választottuk el, a detektálás – a kapilláris elektroforézishez, illetve a mikrofluidikai eszközökhöz hasonlóan – lézer indukált fluoreszcencia segítségével az elválasztás alatt („időben”) történt. A kapilláris gélelektroforézis során a Beckman Coulter MDQ egy kapillárisos, illetve GeXP nyolc kapillárisos berendezésekkel dolgoztunk. Kísérleteink során 50–180 µm belső átmérőjű kapillárisokat alkalmaztunk, az elválasztás során a kapilláris effektív hossza (l) 20 és 50 cm között változott. A mintákat elektrokinetikusán injektáltuk, az elválasztás 2–6 kV feszültséggel történt. A mikrofluidikai eszköz elválasztási paramétereinek elemzése során 100 µm-es „dupla-T” injektoros, üvegből készült elektroforetikus chipet alkalmaztunk. Az elválasztó csatorna teljes hossza 80 mm volt, az effektív hossz 10 és 75 mm között

volt változtatható. Az elválasztások előtt a csatornákat 2% polivinilpirrolidon (PVP, $M_w = 1\,300\,000$ g/mol, $1\times$ TBE) oldattal mostuk át, ami a csatornák falán bevonatot képezve az elektroosmotikus áramlást hatékonyan csökkentette. Az elválasztásokat 2%-os polivinilpirrolidon használatával végeztük el.

Az asszociáció elemzések során az egyes csoportok allél-, genotípus-, illetve haplotípusfrekvencia értékeit χ^2 -próbával hasonlítottuk össze. Azon kísérletek során, amikor a fenotípust folytonos változóval jellemeztük, az egyes genotípus- vagy haplotípus-csoportba tartozó személyek valamely tulajdonságot jellemző átlagértékei közötti különbséget egyszempontos variancia analízissel (ANOVA) vizsgáltuk. Mivel sok esetben számos polimorfizmust elemeztünk egyidejűleg, a többszörös tesztelés miatt a Bonferroni-korrekcióval módosított statisztikai szignifikancia (p) értéket vettük figyelembe az eredmények kiértékelése során.

3.2 Polimorfizmusok funkcionális elemzése

A kandidáns gének promoter, illetve 3' UTR szabályozó szakaszának funkcionális vizsgálatához pGL3-Basic illetve pMIR-Report luciferáz riporter vektort használtunk. A *WFS1* promoter elemzéséhez különböző hosszúságú konstrukciókat hoztunk létre. A mikro-RNS-ek szabályozó hatását pMIR-Report rendszerrel elemeztük, a luciferáz vektorba a *WFS1* illetve a *SNAP-25* gén teljes 3' UTR-ét klónoztuk. A megfelelő allél-variánsokat, valamint az ún. „seed mutáns” szekvenciát tartalmazó konstrukciókat irányított mutagenézissel hoztuk létre, és Sanger-szekvenálással ellenőriztük.

Az *in vitro* funkcionális elemzések során HEK293T sejtvonalat alkalmaztunk. A *WFS1* promoterének tanulmányozásakor az egyes pGL3Basic konstrukciókat β -galaktozidáz vektorral kotranszfektáltuk. A 3' UTR–mikro-RNS kölcsönhatás elemzése során a megfelelő pMIR-Report és a β -galaktozidázt kódoló konstrukció mellett az adott prekursor mikro-RNS-t is kotranszfektáltuk. A kísérletek során minden esetben három párhuzamos mérést végeztünk el.

A sejteket 24 órás inkubálást követően fagyasztás–olvasztás módszerrel tártuk fel. Az enzim-aktivitás méréséhez a Varioskan Flash műszert használtuk, ami alkalmas mind luminometriai (luciferáz), mind fotometriai (β -galaktozidáz) mérések kivitelezésére. A relatív luciferáz szinteket a két enzimaktivitás érték hányadosának (luciferáz / β -galaktozidáz) kiszámolásával állapítottuk meg.

4 EREDMÉNYEK

4.1 Polimorfizmusok genotipizálása

Az egyetlen bázispár megváltozását jelentő SNP-k, valamint a különböző kiterjedésű ismétlődési variációk – VNTR-ek és CNV-k – elemzése az érintett DNS-szakasz eltérő hossza miatt különböző stratégiákat igényel.

A VNTR-ek genotipizálása legtöbb esetben a régió PCR-amplifikációjával, majd a keletkezett termékek gélelektroforézisével megvalósítható [1]. Ilyen eljárás segítségével a humán *DRD4* [2], valamint a kutya *TH* (tirozin-hidroxiláz), *DBH* (dopamin- β -hidroxiláz) és *DAT* (dopamin transzporter) génjeiben [3] új, korábban nem ismert ismétlődési variációkat azonosítottunk.

A *WFS1* gén 17 kiválasztott SNP-jét TaqMan próbák alkalmazásával genotipizáltuk. Munkánk során az eljárás „hagyományos” technikája [4] mellett a miniatürizált, OpenArray[®] rendszert is alkalmaztuk [5], mellyel egyetlen lemezen egyidejűleg 3072 párhuzamos mérés valósítható meg. A gén 5' régiójában lévő rs148797429 6 bp-os inzerció / deléción elemzésére olvadáspontmérésen, valamint a PCR-t követő kapilláris gélelektroforézisen alapuló vizsgálmódszert dolgoztunk ki [6]. A gén promoterében, illetve 3' UTR-ében lévő 5 SNP elemzésére multiplex primer extenziót állítottunk be [6]. Az SNP-k közötti LD mértékét 801 személy genotipizálást követően a Lewontin-féle D' , valamint az R^2 értékek meghatározásával elemeztük. Figyelemre méltó, hogy a

korábban a 2-es típusú cukorbetegség rizikófaktoraként felmerülő polimorfizmusok (rs1046320, rs10010131 és rs734312) és a miRNS-kötődést feltételezetten befolyásoló rs9457 SNP között magas LD (kapcsoltsági egyensúly hiánya) értékeket kaptunk, ugyanakkor a másik vélhetően miRNS-kötőhelyen lévő SNP (rs1046322) független a gén csaknem valamennyi általunk vizsgált polimorfizmusától [5].

A *C4A* és *C4B* génszám meghatározására különböző színű fluoreszcens festékekkel jelölt TaqMan próbákat alkalmaztunk: a kvantitatív elemzés így egyetlen multiplex real-time PCR segítségével megvalósíthatónak bizonyult [7]. Ez az eljárás lehetővé tette a *C4* génszám meghatározást nagylétszámú populációkon, ami a korábbi módszerekkel – azok jelentős idő- és munkaigénye miatt – nem volt lehetséges. A kidolgozott real-time PCR alapú módszert a genom egy másik régiójára, a 3. kromoszómán elhelyezkedő glikogén-szintáz kináz 3B (*GSK3B*) génre és környezetére kiterjedő CNV-re is adaptáltuk. Összesen 6 primer-próba rendszert alkalmaztunk, amivel az amplifikálódó szakasz kiterjedését kívántuk vizsgálni: ezekkel a *GSK3B* génen kívül a szomszédos *NR1I2* és *C3orf15* gének egy-egy régióját is elemeztük. Megállapítottuk, hogy – szemben a *C4* géneket tartalmazó RCCX-modullal – az ismétlődő régió kiterjedése önmagában is meglehetősen variábilis. A szakirodalomban korábban nem ismert, új formákat azonosítottunk, és megfigyeltük, hogy a CNV nem mindig foglalta magában a teljes *GSK3B* gént, több esetben részleges, csak a *GSK3B* 3' UTR-ére kiterjedő génszám-variációt tapasztaltunk [8].

A hagyományos PCR-en alapuló módszerek közös jellemzője, hogy az elemzés szűk keresztmetszetét gyakran a PCR-termékek elektroforétikus analízise jelenti. Munkánk során ezért hangsúlyt fektettünk olyan technikák – ultravékony és kapilláris gélelektroforézis, mikrofluidikai eszköz – alkalmazására, melyekkel a DNS-fragmentumok elválasztása automatizálható, az elektroforézis hatékonysága és érzékenysége fokozható. A *DRD4* gén rs1800955 „-521 C/T” SNP-jének PCR-

RFLP-vel történő elemzése során a 182, 206 és 217 bp nagyságú termékek ultravékony gélelektroforézissel hatékonyan elválaszthatók voltak [9], a kapilláris elektroforézist pedig – többek között – a *WFS1* gén SNP-inek primer extenzióval történő vizsgálata során használtuk [6]. Részletesen jellemeztük egy mikrofluidikai eszköz elválasztási tulajdonságait. Polivinilpirrolidon ($M_w = 1\,300\,000$ g/mol) gélmátrix és $l = 3$ cm effektív elválasztási hossz alkalmazása mellett a 100 bp-os DNS-létra fragmentumainak (100 bp, 200 bp..., 1000 bp) elválasztása kevesebb, mint 90 másodperc alatt kivitelezhető volt [10].

Az egy génen belül egymáshoz közel elhelyezkedő SNP-k vizsgálata során a genotipizáló eljárásokat úgy fejlesztettük tovább, hogy a polimorfizmusok által alkotott haplotípus egy lépésben meghatározható legyen. Ily módon az allélok relatív, kromoszomális elhelyezkedése is megállapítható, ami biológiai szempontból nem közömbös: a szabályozás során lényeges, hogy az adott folyamatot (pl. miRNS vagy transzkripciós faktorok bekötődése) befolyásoló allélok hatása lokalizációjuk révén milyen kölcsönhatásban lehet egymással. A *DRD4* promoterében lévő SNP-k (rs747302 „-616 C/G” és rs796487306 „-615 A/G”) haplotípusát PCR–RFLP technikával vizsgáltuk [11]. A *SNAP-25* 3’ nem transzlálódó régiójában lévő rs1051312 és rs3746544 SNP-k haplotípus meghatározására szekvencia specifikus TaqMan próbákat alkalmaztunk. Annak ellenére, hogy ritka allél gyakorisága mindkét polimorfizmus esetén viszonylag magas (rs3746544 G: 39,1%, rs1051312 C: 25,5%) volt, az általuk alkotott G–C haplotípus egyetlen esetben sem volt azonosító az általunk vizsgált $N = 901$ főből álló populációban [12].

4.2 Asszociáció vizsgálatok

Az ezredforduló óta a genetikai kutatások egyik fő célkitűzése a komplex jellegek és kórképek hátterében álló örökletes faktorok azonosítása. Ez az ismeret a molekuláris patomechanizmus feltárása révén a biológiai szempontból relevánsabb betegségkategóriák meghatározásának, a prevenciónak és a célzott kezelési protokollok kidolgozásának alapját

jelentheti. Az asszociáció vizsgálatok sikere a hatékony és megbízható genotipizáláson, emellett a fenotípus pontos definiálásán alapul, melynek során előnyös az endofenotípusok alkalmazása. Munkánk során két endofenotípus, az agresszió és az impulzivitás, valamint a cukorbetegség háttérében álló genetikai rizikófaktorokat kerestünk.

Az agresszió – a rombolónak szánt viselkedés számos, különböző formája – összefüggésben áll több neuropszichiátriai kórképpel a verbális bántalmazástól az alkohol- és kábítószerfüggőségen, illetve neurodegeneratív kórképeken keresztül az öngyilkosságig. Az asszociáció elemzés során a DRD4 és a monoaminerg neurotranszmitter rendszerekkel összefüggésben álló további fehérjék génjeiben lévő összesen 55 SNP-t elemeztünk. A polimorfizmusok kiválasztása során szem előtt tartottuk, hogy – az eredményes elemzés érdekében – olyan variációkat vizsgáljunk, melyek MAF (ritka allél gyakoriság) értéke eléri az 5%-ot. Előnyben részesítettük továbbá azokat a SNP-eket, melyek esetében valamilyen molekuláris biológiai funkció feltételezhető volt. Bonferroni-korrekción követően a szerotonin receptor 2A génjének (*HTR2A*) 2. intronjában elhelyezkedő rs7322347 SNP mutatott az agresszióval szignifikáns asszociációt [13]. További kísérleteink alapján emellett a *WFS1* gén rs1046322 polimorfizmusa is hozzájárulhat az endofenotípus genetikai meghatározásához [5].

Az impulzivitás a tettek átgondolatlanságával, a cselekedetek, valamint a viselkedés csökkent önkontrolljával jellemezhető. Megnyilvánulása széles skálán mozog, és bár az impulzivitás – bizonyos mértékben – az egészséges személyek természetes jellemzője is, klinikai szempontból kiemelendő, hogy a fokozott impulzivitás összefüggésben áll bizonyos pszichiátriai rendellenességekkel: az ADHD és a bipoláris hangulatzavar endofenotípusának tekinthető. Háttérében a monoaminerg neurotranszmitter rendszer számos komponensét kutatták, ezen ingerületátvivők működéséhez ugyanakkor az egyik legjelentősebb köz-

ponti idegrendszeri fehérje, a SNAP-25 alapvetően szükséges. Az asszociáció vizsgálatban 901 fiatal, egészséges, pszichiátriai kórtörténettel nem rendelkező személy vett részt. Eredményeink alapján a gén 3' UTR-ében elhelyezkedő rs3746544 és rs1051312 SNP-k asszociációt mutattak az impulzivitással. A T–T haplotípussal rendelkezők impulzivitás pontszáma szignifikánsan alacsonyabb volt, mint azoké, akik ezt az allél-kombinációt nem, csak a G–T, valamint a T–C haplotípust hordozták. Bár a két csoport Barratt-kérdőívvel mérhető átlagos impulzivitás értéke közötti különbség viszonylag kicsi volt, lényeges hangsúlyozni, hogy vizsgálatunkban kizárólag egészséges személyek vettek részt, akik körében az impulzivitás szélsőséges értékei nem fordulnak elő [14].

Bár a pszichiátriai rendellenességek és a cukorbetegség között első pillantásra nem sok hasonlóság mutatkozik, mégis közös bennük, hogy mindegyikben szerepet játszhat valamilyen „szignál-molekula” – a neurotranszmitterek, illetve az inzulin – megváltozott exocitózisa. Ezt támasztja alá az a tény is, hogy a *WFS1* gén funkciókiesése talaján kialakuló Wolfram-szindróma a neurodegeneráció mellett nem autoimmun eredetű, inzulinfüggő diabetes mellitus-szal és a β -sejtek progresszív pusztulásával is társul. Ennek alapján vetődött fel annak lehetősége, hogy a *WFS1* gén működésének kisebb mértékű változását eredményező polimorfizmusok szerepet játszhatnak a cukorbetegség gyakori, poligénes formáinak (T1DM és T2DM) kialakulásában.

A 2-es típusú diabetes mellitus-szal (T2DM) a gén 4 polimorfizmusa, a 4. intronban lévő rs10010131, a 6. intronban elhelyezkedő rs13147655, valamint a 3' UTR-ben található rs1046320 és rs9457 SNP mutatott szignifikáns asszociációt. Bár ezek a polimorfizmusok a gén eltérő részében, egy 11 884 bp hosszúságú szakaszon helyezkednek el, megemlítendő, hogy közöttük magas LD-érték mérhető, és feltételezésünk szerint a tényleges, molekuláris biológiai hatás elsősorban a 3' UTR-hez köthető. Érdekes ugyanakkor, hogy a kórkép 1-es típusával

(T1DM) asszociációt mutató, szintén a 3' UTR-ben lévő rs1046322 polimorfizmus és a gén többi SNP-je között alacsony LD figyelhető meg. A 3' UTR-ben lévő SNP-k haplotípus alapú asszociáció elemzése megerősítette az allél, illetve genotípus alapú vizsgálatok eredményét. Megfigyeléseink alapján a *WFS1* polimorfizmusai, illetve a wolframin fehérje mennyiségének megváltozása szerepet játszhat a T1DM és a T2DM genetikai hátterének meghatározásában, ami összhangban áll az „akcelerátor hipotézissel”, mely szerint a két kórforma – számos lényegi különbözősége ellenére – részben átfedő örökletes tényezők közreműködésével fejlődhet ki [4].

4.3 Polimorfizmusok molekuláris funkciójának elemzése

Egy komplex jelleg és egy polimorfizmus között megfigyelhető asszociáció esetén felvetődik a kérdés, hogy az adott genetikai variációhoz valóban rendelhető-e olyan molekuláris biológiai hatás, ami a vizsgált jelleggel kapcsolatba hozható, vagy a polimorfizmus genetikai markernek tekintendő. Ennek eldöntése céljából munkánk során a pozitív asszociációt mutató polimorfizmusok molekuláris biológiai funkcióját *in vitro* riporter rendszerekben vizsgáltuk.

A *SNAP-25* 3' UTR-ében, egymás közelségében lévő két SNP (rs1051312 és az rs3746544) a miR-641 „seed” régiójának kötőhelyében található. Ez különösen aláhúzza a haplotípus elemzés fontosságát, hiszen a mikro-RNS kötődése ebben az esetben ez alapján értelmezhető. A *SNAP-25* gén teljes 3' UTR-ét pMIR-Report luciferáz vektorba klónoztuk, ahol a klónozó hely – az eredeti biológiai lokalizációnak megfelelően – a luciferázt kódoló gén mögött található. A négy, elméletileg lehetséges haplotípusú konstrukciót irányított mutagenézissel hoztuk létre. A rendszer optimalizálását követően a polimorfizmusok lehetséges szabályozó szerepét úgy elemeztük, hogy összehasonlítottuk a négy különböző haplotípust hordozó riporter konstrukciókkal mérhető relatív luciferáz aktivitásokat. Legalacsonyabb értéket T–T haplotípus esetében mértünk. Ezen haplotípus jelenléte esetén a miR-641

„seed” régiója a gén 3’ UTR-ével tökéletesen komplementer. A G–T és T–C haplotípusok esetén a relatív luciferáz aktivitás (a T–T-hez képest) 1,8-szeres, illetve 2,1-szeres volt. A kötőhely egyetlen nukleotidjának megváltozása eszerint szignifikánsan emelte a génkifejeződés mértékét, a G–T és a T–C haplotípusokkal kapott értékek között ugyanakkor nem volt szignifikáns a különbség, ami arra engedhet következtetni, hogy ebben az esetben közömbös, hogy a „seed” szekvencia hányadik nukleotidja nem komplementer a 3’ UTR-ben található kötőhellyel. A G–C haplotípus esetén a mikro-RNS kötőhelye 2 pozícióban is „elromlik”: ezzel összhangban a T–T variánshoz képest 4,6-szeres relatív luciferáz aktivitást tapasztaltunk. Megemlíthető, hogy ez a haplotípus a kaukázusi populációban (több mint 900 személy elemzése alapján) nem fordul elő [14].

A *WFS1* gén promoterében, valamint 3’ UTR-ében elhelyezkedő polimorfizmusokat hasonló elméleti és módszertani megfontolások szerint elemeztük. A promoter vizsgálatához két különböző hosszúságú konstrukciót készítettünk. A rövidebb változat csupán a minimál promotert, illetve a transzkripciós starthelyhez közelebb eső rs4273545 G/T SNP-t tartalmazta. Ebben a rendszerben nem figyeltünk meg eltérést a génkifejeződés aktivitásában attól függően, hogy melyik allél van jelen a polimorf lókuszon. A hosszabb konstrukció az SNP előtt elhelyezkedő rs148797429 inszerció / delécio polimorfizmust is magában foglalta. Noha a 6 bp-nyi szakasz jelenléte vagy hiánya allélspecifikus módon a transzkripciót nem befolyásolta, eredményeink mégis arra utaltak, hogy maga a régió szükséges a génkifejeződés hatékony szabályozásához. Az rs4273545 SNP G illetve T variánsa ugyanis ebben a rendszerben eltérő transzkripciós aktivitást mutatott. T allél esetén a relatív luciferáz aktivitás kb. 2,5-szer magasabb volt a G variánshoz viszonyítva függetlenül attól, hogy tőle 5’ irányban hosszú vagy rövid rs148797429 allél volt-e jelen a DNS-konstrukcióban [6].

A *WFSI* 3' UTR-ében lévő rs9457, valamint az rs1046322 SNP-k mikro-RNS kötődését befolyásoló hatását szintén *in vitro* sejtes rendszerben vizsgáltuk. A PolymiRTS adatbázis alapján az rs9457 SNP a miR-185, az rs1046322 polimorfizmus pedig a miR-668 kötőhelyében található. A *WFSI* gén teljes 3' UTR-ét pMIR-Report vektorba klónoztuk. Irányított mutagenézis segítségével készítettük el a másik allélváltozatokat és a „seed” mutánsokat hordozó konstrukciókat. A megfigyelt relatív luciferáz aktivitások mindkét lókuszt esetében szignifikáns allélfüggő eltérést mutattak. Figyelemre méltó, hogy az rs9457 SNP magas LD-t mutat több olyan lókusszal, melyek irodalmi (GWAS) adatok alapján asszociációknak a cukorbetegséggel, ugyanakkor biológiai hatásukat korábban nem sikerült kimutatni [4, 5].

5 AZ ÚJ EREDMÉNYEK ÉS MEGÁLLAPÍTÁSOK ÖSSZEFOGLALÁSA

5.1 Polimorfizmusok genotipizálása

- Hatékony genotipizáló eljárásokat dolgoztunk ki és alkalmaztunk a humán *DRD4* [1, 2] és *WFSI* [4–6] génekben lévő kiválasztott hosszúságpolimorfizmusok és SNP-k elemzésére, valamint a kutya dopaminerg rendszeréhez tartozó gének (*DRD4*, *DBH*, *TH*) egyes hosszúságvariációinak vizsgálatára. Ezen utóbbi génekben új, korábban nem ismert polimorfizmusokat azonosítottunk [3].
- Real-time PCR alapú eljárásokat állítottunk be a *C4A*, illetve *C4B* [7], valamint a *GSK3B* [8] géneket érintő CNV-k elemzésére.
- Olyan elektroforetikus rendszereket – ultravékony [9] és kapilláris gélelektroforézis [1], valamint mikrofluidikai eszköz [10] – optimalizáltunk és alkalmaztunk, melyekkel a genotipizálás szűk keresztmetszetét jelentő fragmentum analízis hatékonysága és felbontóképessége növelhető.

- A genotipizáló rendszereket oly módon fejlesztettük tovább, hogy alkalmassá váljanak közeli polimorfizmusok haplotípusának direkt, molekuláris meghatározására [11, 12].

5.2 Asszociáció vizsgálatok

- A beállított technikák segítségével asszociációt mutattunk ki a *WFS1* rs1046322 [5], valamint a *HTR2A* rs7322347 [13] SNP-k és az agresszió között.
- Asszociációt írtunk le a *SNAP-25* 3' UTR-ében lévő rs3746544 és rs1051312 SNP-k, valamint az impulzivitás között [14], és megfigyeltük, hogy kutyákban ugyanez az endofenotípus a *DRD4* 3. exonjában lévő VNTR-rel hozható összefüggésbe [3].
- A *WFS1* gén 3' UTR-ében lévő rs1046320, rs1046322 és rs9457 SNP-eket az 1-es, illetve a 2-es típusú cukorbetegség genetikai rizikófaktoraként azonosítottuk [4].

5.3 Polimorfizmusok molekuláris funkciójának elemzése

- Megfigyeltük, hogy *in vitro* luciferáz rendszerben a *WFS1* promóterében és 3' UTR-ében lévő SNP-k szerepet játszanak a génkifejeződés szabályozásában:
 - megfelelő hosszúságú promóter jelenléte esetén az rs4273545 SNP [6], illetve
 - megváltozott mikro-RNS kötődés révén az rs9457 [4] és az rs1046322 polimorfizmusok a génexpressziót allél-függő módon befolyásolják [5].
- A *SNAP-25* gén 3' UTR-ében elhelyezkedő rs3746544 és rs1051312 SNP-k a miR-641 bekötődésének befolyásolása révén *in vitro* luciferáz rendszerben hatással voltak a génexpresszióra: legmagasabb luciferáz aktivitást a populációban elő nem forduló G–C haplotípus esetén figyeltünk meg [14].

6 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani

- Sasvári Máriának, aki már orvostanhallgató koromban megmutatta, hogy egy gélkép milyen szép lehet, és aki utolérhetetlen módon irányította munkámat, illetve kutatócsoportunk munkáját,
- Guttman Andrásnak, aki munkámat PhD-hallgató korom óta feltartóztathatatlan lendülettel támogatja, s aki módszertani ismereteimet több területen megalapozta,
- Kovács-Nagy Rékának, Molnár Zsuzsannának és Németh Nórának, akik a bemutatott kísérleti munka jelentős részét elvégezték, de ami ennél is fontosabb, hogy velük azóta is mindmáig együtt végezhetem munkámat, és minden téren számíthatok rájuk,
- Keszler Gergelynek, aki szinte hihetetlen elméleti tudásával támogatja csoportunkat,
- Bánlaki Zsófiának, aki kimagasló elméleti és gyakorlati ismereteivel járul hozzá kutatásainkhoz,
- Németh Helgának, aki mindig gondoskodik arról, hogy a laborban minden rendelkezésre álljon,
- Szántai Eszternek és Héjjas Krisztinának, akik jelentős részt vállaltak több genotipizáló eljárás beállításában,
- munkacsoportunk, valamint a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet Molekuláris Biológiai Tanszék korábbi és jelenlegi tagjainak,
- Müllner Nándornak, akitől nemcsak a kutatás és az oktatás, hanem az élet egyéb területeire vonatkozóan is mindig útmutatást kapok,
- Tanszékünk korábbi és jelenlegi vezetőinek, akik munkámat mindig támogatták,
- Sahin-Tóth Miklósnak, aki bostoni tanulmányutam során vezette munkámat,
- A vizsgálatokban résztvevő személyeknek,
- A kutatásokban résztvevő munkatársaknak,
- Édesapámnak; feleségemnek, Évának és kisfiaiimnak, Máténak és Samunak, akik mindig bíznak és hisznek bennem.

7 SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

7.1 A doktori értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Szantai E, Szilagyai A, Guttman A, Sasvari-Szekely M, Ronai Z: **Genotyping and haplotyping of the dopamine D4 receptor gene by capillary electrophoresis.** *J Chromatogr A* 2004, **1053**(1-2):241-245.
2. Szantai E, Szmola R, Sasvari-Szekely M, Guttman A, Ronai Z: **The polymorphic nature of the human dopamine D4 receptor gene: a comparative analysis of known variants and a novel 27 bp deletion in the promoter region.** *BMC Genet* 2005, **6**(39)
3. Hejjas K, Vas J, Kubinyi E, Sasvari-Szekely M, Miklosi A, Ronai Z. **Novel repeat polymorphisms of the dopaminergic neurotransmitter genes among dogs and wolves.** *Mamm Genome* 2007, **18**(12):871-879.
4. Elek Z, Nemeth N, Nagy G, Nemeth H, Somogyi A, Hosszufalusi N, Sasvari-Szekely M, Ronai Z: **Micro-RNA Binding Site Polymorphisms in the WFS1 Gene Are Risk Factors of Diabetes Mellitus.** *PLoS One* 2015, **10**(10)
5. Kovacs-Nagy R, Elek Z, Szekely A, Nanasi T, Sasvari-Szekely M, Ronai Z: **Association of aggression with a novel microRNA binding site polymorphism in the wolframin gene.** *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2013, **162B**(4):404-412.
6. Elek Z, Denes R, Prokop S, Somogyi A, Yowanto H, Luo J, Souquet M, Guttman A, Ronai Z: **Multicapillary gel electrophoresis based analysis of genetic variants in the WFS1 gene.** *Electrophoresis* 2016, **37**(17-18):2313-2321.
7. Szilagyai A, Blasko B, Szilassy D, Fust G, Sasvari-Szekely M, Ronai Z: **Real-time PCR quantification of human complement C4A and C4B genes.** *BMC Genet* 2006, **7**(1)
8. Ronai Z, Kovacs-Nagy R, Szantai E, Elek Z, Sasvari-Szekely M, Faludi G, Benkovits J, Rethelyi JM, Szekely A: **Glycogen synthase kinase 3 beta gene structural variants as possible risk factors of bipolar depression.** *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2014, **165B**(3):217-222.
9. Ronai Z, Sasvari-Szekely M, Guttman A: **Miniaturized SNP detection: quasi-solid-phase RFLP analysis.** *Biotechniques* 2003, **34**(6):1172-1173.
10. Ronai Z, Barta C, Sasvari-Szekely M, Guttman A: **DNA analysis on electrophoretic microchips: effect of operational variables.** *Electrophoresis* 2001, **22**(2):294-299.

11. Szantai E, Kiraly O, Nemoda Z, Kereszturi E, Csapo Z, Sasvari-Szekely M, Gervai J, Ronai Z: **Linkage analysis and molecular haplotyping of the dopamine D4 receptor gene promoter region.** *Psychiatr Genet* 2005, **15**(4):259-270.
12. Kovacs-Nagy R, Sarkozy P, Hu J, Guttman A, Sasvari-Szekely M, Ronai Z: **Haplotyping of putative microRNA-binding sites in the SNAP-25 gene.** *Electrophoresis* 2011, **32**(15):2013-2020.
13. Banlaki Z, Elek Z, Nanasi T, Szekely A, Nemoda Z, Sasvari-Szekely M, Ronai Z: **Polymorphism in the serotonin receptor 2a (HTR2A) gene as possible predisposal factor for aggressive traits.** *PLoS One* 2015, **10**(2)
14. Nemeth N, Kovacs-Nagy R, Szekely A, Sasvari-Szekely M, Ronai Z: **Association of impulsivity and polymorphic microRNA-641 target sites in the SNAP-25 gene.** *PLoS One* 2013, **8**(12)

7.2 A doktori értekezéshez kapcsolódó közlemények

15. Ronai Z, Lippai Z, Elek Z, Somogyi A: **[Investigation of the genetic background of complex diseases].** *Orv Hetil* 2018, **159**(31):1254-1261.
16. Toth-Petroczy A, Szilagyi A, Ronai Z, Sasvari-Szekely M, Guttman A: **Validation of a tentative microsatellite marker for the dopamine D4 receptor gene by capillary gel electrophoresis.** *J Chromatogr A* 2006, **1130**(2):201-205.
17. Ronai Z, Guttman A, Nemoda Z, Gervai J, Sasvari-Szekely M: **Direct haplotype detection of adjacent polymorphic sites in the regulatory region of the dopamine D4 receptor (DRD4) gene.** *Electrophoresis* 2002, **23**(10):1512-1516.
18. Ronai Z, Barta C, Guttman A, Lakatos K, Gervai J, Staub M, Sasvari-Szekely M: **Genotyping the -521C/T functional polymorphism in the promoter region of dopamine D4 receptor (DRD4) gene.** *Electrophoresis* 2001, **22**(6):1102-1105.
19. Ronai Z, Szantai E, Szmola R, Nemoda Z, Szekely A, Gervai J, Guttman A, Sasvari-Szekely M: **A novel A/G SNP in the -615th position of the dopamine D4 receptor promoter region as a source of misgenotyping of the -616 C/G SNP.** *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2004, **126B**(1):74-78.
20. Szilagyi A, Blasko B, Ronai Z, Fust G, Sasvari-Szekely M, Guttman A: **Rapid quantification of human complement component C4A and C4B**

- genes by capillary gel electrophoresis.** *Electrophoresis* 2006, **27**(8):1437-1443.
21. Ronai Z, Guttman A, Nemoda Z, Staub M, Kalasz H, Sasvari-Szekely M: **Rapid and sensitive genotyping of dopamine D4 receptor tandem repeats by automated ultrathin-layer gel electrophoresis.** *Electrophoresis* 2000, **21**(10):2058-2061.
 22. Kerekgyarto M, Nemeth N, Kerekes T, Ronai Z, Guttman A: **Ultrafast haplotyping of putative microRNA-binding sites in the WFS1 gene by multiplex polymerase chain reaction and capillary gel electrophoresis.** *J Chromatogr A* 2013, **1286**:229-234.
 23. Hejjas K, Vas J, Topal J, Szantai E, Ronai Z, Szekely A, Kubinyi E, Horvath Z, Sasvari-Szekely M, Miklosi A: **Association of polymorphisms in the dopamine D4 receptor gene and the activity-impulsivity endophenotype in dogs.** *Anim Genet* 2007, **38**(6):629-633.
 24. Ronai Z, Guttman A, Keszler G, Sasvari-Szekely M: **Capillary electrophoresis study on DNA-protein complex formation in the polymorphic 5' upstream region of the dopamine D4 receptor (DRD4) gene.** *Curr Med Chem* 2004, **11**(8):1023-1029.
 25. Ronai Z, Wang Y, Khandurina J, Budworth P, Sasvari-Szekely M, Wang X, Guttman A: **Transcription factor binding study by capillary zone electrophoretic mobility shift assay.** *Electrophoresis* 2003, **24**(1-2):96-100.
 26. Nemeth N, Kerekgyarto M, Sasvari-Szekely M, Ronai Z, Guttman A: **Rapid identification of human SNAP-25 transcript variants by a miniaturized capillary electrophoresis system.** *Electrophoresis* 2014, **35**(2-3):379-384.