

---

## PROJEKT ZÁRÓ BESZÁMOLÓ – K83766

### **Háttér**

A cukorbetegség (diabetes mellitus) emberek millióit érintő kórkép, melynek anyagcserét befolyásoló következményei igen jól ismertek, központi idegrendszeri vonatkozásai viszont kevésbé feltártak. Az agy ugyanis nem tartozik a klasszikus értelemben vett inzulin-függő szervek közé, ugyanakkor egyre több megfigyelés támasztja alá, hogy az idegi folyamatok mégsem teljesen függetlenek az inzulintól. Ismert, hogy az inzulin átjut a vér-agy gáton, sőt, egyes agyi régiók inzulint ill. inzulin-receptort termelnek. Kutatások arra is rámutattak, hogy a 2-es típusú cukorbetegség körében lényegesen magasabb az Alzheimer-demencia kifejlődésének kockázata, illetve az intranazálisan bejuttatott inzulin a memória zavarban szenvedők kognitív funkcióit javítja.

### **Központi idegrendszeri génexpresszió vizsgálata diabetes-es állatmodellben**

A 2-es típusú diabetes mellitus-ra jellemző központi idegrendszeri génexpresszió változások elemzését patkány modell alkalmazásával végeztük el. Az egészséges kontroll csoportot Wistar patkányok ( $N = 9$ ) képezték, a 2-es típusú cukorbetegség modelljeként Goto-Kakizaki állatokat ( $N = 9$ ) használtunk. A központi idegrendszer megfelelő régióiból (prefrontalis kéreg, striatum, hippocampus) RNS-t izoláltunk, a teljes genom expresszió vizsgálatot Agilent teljes genom microarray lemezek alkalmazásával végeztük el. Az adatok elemzése a GeneSpring GX software felhasználásával történt, a normalizálás során az alacsony jelet adó eredményeket kizártuk az elemzésből. A statisztikai analízis során azokat a géneket választottuk ki, melyek szignifikáns és legalább kétszeres eltérést mutattak az egészséges illetve a Goto-Kakizaki patkányok esetében, a kiértékelésnél a többszörös tesztelés miatt a Benjamini-Hochberg (FDR) korrekciót alkalmaztuk. Az eredményeket Gene Ontology adatbázissal is összevetettük, melynek segítségével lehetővé válik az esetlegesen érintett biokémiai útvonalak azonosítása; a kiválasztott gének expresszió változását kvantitatív real-time PCR-rel erősítettük meg. Mindezek alapján – többek között – a Gene Ontology adatbázis „inzulin és növekedési hormon szekréció”, „oxidatív stressz, DNS-károsodás, sejtciklus”, „lipid anyagcsere” biológiai folyamatainak elemei: – szintén csak példaként kiemelve – a galanin prepropeptid, a „myelin-associated oligodendrocyte basic protein”, a GRM2 glutamát receptor valamint a 2-es típusú galanin receptor génjei mutattak szignifikánsan eltérő expressziót a két állatcsoportban [1].

Ezek az eredmények több, további kísérlet megtervezésében fontos támpontot, kiindulási szempontot jelentettek.

### **SNP szelekció**

A bemutatott teljes genom expresszió analízisen túlmenően számos további szempontot vetünk figyelembe a vizsgálni kívánt genetikai polimorfizmusok kiválasztása során.

Irodalmi adatok mellett elsősorban az SNP-k feltételezett biológiai funkcióját, ennek megfelelően többek között lokalizációját, ritka allél-frekvenciáját vettük figyelembe *in silico* eszközök segítségével. Az NCBI dbSNP, az 1000 Genom Project valamint az Ensembl adatbázis adatiból indultunk ki, a feltételezett biológiai funkciót a PolymiRTS, a miRWalk, a miRBase, a TransFac valamint a HaploView ill. a HapMap adatbázisok és webes eszközök segítségével elemeztük. Így választottuk ki azokat – az alábbiakban részletesen is bemutatásra

kerülő – polimorfizmusokat, melyek a gének szabályozó (3' UTR: nem transzlálódó régió vagy promotor) régióiban helyezkednek el, ritka allél gyakoriság értékük (MAF) meghaladja az 5%-ot és feltételezhető biológiai hatásuk.

### ***SNP-analízis: lipáz gének polimorf variánsainak elemzése***

A fenti eredmények, az elhízás, metabolikus szindróma, 2-es típusú cukorbetegség szoros összefüggése [2] valamint egyes lipázok központi idegrendszeri szerepének [3] ismeretében a lipáz enzimek (pancreas lipáz, kolipáz, májlipáz, lipoprotein lipáz, gyomor lipáz, hormonszenzitív lipáz) génjeiben 32 SNP-t választottunk ki, és elemeztünk eset–kontroll-vizsgálat keretében. A polimorfizmusok kiválasztásánál azok lokalizációját (szabályozó régió: UTR vagy promotor) és ritka allél frekvenciáját (MAF > 0,05) vettük figyelembe. Az SNP-k genotipizálása a nagy hatékonyságú OpenArray rendszer alkalmazásával történt. A módszer szekvencia specifikus, fluoreszcens festékekkel jelölt egyszálú DNS-ek, a TaqMan próbák alkalmazásán alapul. Az eljárás lényege röviden, hogy egy reakcióelegyben egy SNP két alléljának megfelelően két különböző színű fluoreszcens festékekkel megjelölt TaqMan próbát alkalmazunk. Ezek genotípustól függően kötődnek a PCR során a minta-DNS-hez, a fluoreszcens jel a DNS-polimeráz 5' exonukleáz aktivitása révén felszabadul a csendesítés alól, így a reakció végén a mérhető fluoreszcens jelek aránya alapján a genotípusok meghatározhatók. melynek során egy mikroszkóp tárgylemezhez hasonló méretű lemezen 33 nl térfogatban („low density array”) egyszerre 3072 genotípust (96 személy 32 genotípusa) határozható meg. 10 lemez alkalmazásával 960 minta elemzését (32 SNP) végeztük el, a rendszer megbízhatóságának ellenőrzése céljából belső negatív és pozitív kontrollokat alkalmaztunk. Ennek során a minták 5%-át duplán genotipizáltuk: a reprodukálhatóság meghaladta a 97%-ot. Az eredmények kiértékelését a TaqMan Genotyper software alkalmazásával kezdtük meg. Kifejlesztettünk emellett egy további alkalmazást („Classifier”), ami az elemzés hatékonyságát jelentősen emelte, mivel lehetővé tette a hiányzó illetve bizonytalan genotípus adatok meghatározását a Hardy-Weinberg egyensúly ill. kapcsoltsági elemzés figyelembevételével. Szignifikáns asszociációt figyeltünk meg a máj lipáz rs6083, az endothelialis lipáz rs3786248, rs4245232 valamint a lipoprotein lipáz rs11570892 és rs4922115 SNP-je illetve a 2-es típusú diabetes mellitus között.

Részletesen elemeztük a kolipáz gén promoterében elhelyezkedő 5 kiválasztott SNP-t. A genotípus és haplotípus analízist PCR-RFLP-vel végeztük el, azaz a PCR során megsokszorozott DNS-molekulákat szekvencia specifikus restriktív endonukleázokkal kezeltük. A képződő termékeket kapilláris gélelektroforézis segítségével azonosítottuk és tettük láthatóvá [4]. Megállapítottuk, hogy bár a vizsgált SNP-k hatása gyenge, és egy-egy variáns esetében nem mutatható ki szignifikáns asszociáció a 2-es típusú diabetes mellitus-szal, a polimorfizmusok együttes vizsgálata haplotípus analízis formájában ugyanakkor rávilágított a gén és a betegség lehetséges kapcsolatára.

### ***A WFS1 gén 3' UTR polimorfizmusainak elemzése***

A *WFS1* gén a wolframin nevű fehérjét kódolja, mely az endoplazmás retikulum membránjában helyezkedik el, és szerepet játszik a fehérjeszintézis ill. az endoplazmás retikulum stressz folyamatának egyensúlyában. A gén mind diabetes mellitus-szal, mind kognitív funkciókkal kapcsolatos szerepét nem csak az valószínűsíti, hogy a központi idegrendszerben és a hasnyálmirigyben is magas *WFS1*-expresszió mutatható ki, hanem az is, hogy a fehérje teljes funkciókiesését okozó mutációi felelnek a Wolfram- (DIDMOAD-) szindróma kialakulásáért,

melyre diabetes mellitus és neuropszichiátriai tünetek (optikus atrófia, depresszió, pszichózis, agresszió) egyaránt jellemzőek.

17 SNP-t (rs10002743, rs6824720, rs752854, rs4689393, rs10010131, rs13147655, rs4467645, rs13128674, rs6446482, rs4689395, rs28716718, rs1801208, rs734312, rs1046316, rs1046320, rs1046322, rs9457) elemeztünk a génben, melyek introni régiókban, a 8. exonban valamint a 3' nem transzlálódó régióban (UTR) helyezkednek el. Részletesen vizsgáltuk a gén 3' UTR régiójában lévő két SNP-t (rs1046322 és rs9457), mivel *in silico* vizsgálatunk alapján ez a két polimorfizmus egy-egy mikro-RNS (miR) kötőhelyét érinti (miR-SNP): az rs1046322 SNP A allélja a miR668, az rs9457 polimorfizmus G allélja pedig a miR185 bekötődésének hatékonyságát csökkenti. Pszichogenetikai asszociáció-vizsgálat keretében elemeztük a Buss–Perry-kérdőívvel mérhető agresszió és az rs1046322 SNP összefüggését, és megállapítottuk, hogy a G alléllal rendelkezők szignifikánsan alacsonyabb pontszámot értek el a kérdőív mind a négy skáláján, mint az AA homozigóta személyek (ANOVA  $p = 0,0098$ ) [5]. A gén teljes 3' UTR szakaszát luciferáz riportter gén mögé klónoztuk, és irányított mutagenézissel létrehoztuk a ritka allélt tartalmazó konstrukciót. A luciferáz riportter rendszerrel végzett funkcionális vizsgálat megerősítette az *in silico* szekvencia-elemzés eredményét: A allél jelenléte esetén a sejt kultúrában megemelkedett fehérje mennyiség figyelhető meg. Elvégeztük a 3' UTR polimorfizmusok ill. a gén további 15 SNP-jének kapcsoltsági analízisét a HaploView software segítségével és megállapítottuk, hogy az rs1046322 SNP és a többi polimorfizmus között nem mutatható ki egyetlen esetben sem erős kapcsoltság (legmagasabb  $R^2$  érték: az rs1801208 SNP-vel 0,21). Ez a megfigyelés is alátámasztja azt a feltételezést, hogy ezen SNP nem csupán genetikai marker, hanem tényleges biológiai hatással rendelkező variáns.

A *WFS1* gén ezen miR-SNP-it a 2-es típusú cukorbetegség lehetséges genetikai rizikófaktoraként is elemeztük (további – részben az irodalomból [6] ismert polimorfizmusokkal együtt) asszociáció vizsgálat keretében. Az rs1046322 SNP A allélja rizikó-, az rs9457 lókuszt G variánsa pedig védő faktornak mutatkozott, az allél-frekvenciában megfigyelhető eltérés statisztikailag – Bonferroni-korrektúrával követően is – szignifikánsnak bizonyult. A cukorbeteg személyek kognitív, mentális funkcióit is elemeztük a megváltozott anyagcsere központi idegrendszeri hatásainak vizsgálata céljából. Egy pontos variancia analízis (ANOVA) alkalmazásával vizsgáltuk egyes *WFS1* polimorfizmusok és az MMSE („Mini Mentál Teszt”) gyorskognitív teszttel mérhető teljesítmény összefüggését. Az analízis eredménye szerint a gén rs9457 3' UTR polimorfizmusa szignifikáns asszociációt mutatott a mérhető kognitív funkcióval. Ezen kísérletsorozat szintén rávilágított a megváltozott központi idegrendszeri folyamatok, a cukorbetegség valamint a *WFS1* gén szoros összefonódására.

Az asszociáció analízisek pozitív eredményei tükrében az rs9457 SNP funkcionális elemzését is célul tűztük ki. Ezen kísérletsorozat során a korábban említett – az rs1046322 polimorfizmus hasonló analíziséhez is alkalmazott – *WFS1* 3' UTR riportter konstrukciót alkalmaztuk. Irányított mutagenézissel hoztuk létre a teljesen azonos szekvenciájú, csupán a vizsgált lókusztban eltérő konstrukciót, és megállapítottuk, hogy a G allél jelenléte esetén a relatív luciferáz aktivitás közel kétszeresére emelkedik. Érdekes, hogy ez az aktivitás a „seed” régió összes nukleotidjának megváltoztatása esetén sem nő szignifikánsan tovább. Ez összefüggésben állhat azzal, hogy ezen miRNS–mRNS interakció során alapesetben is a seed régió (miRNS 5' végi 2–8. nukleotidok) csupán 6 nukleotidja komplementer a gén 3' UTR szakaszában lévő kötőhellyel.

Mivel a *WFS1* gén 3' UTR szakaszában két olyan SNP-t (rs1046322 és rs9457) azonosítottunk, melyek mind a cukorbetegséggel, mind központi idegrendszeri funkciókkal kapcsolatosak, fontosnak tartottuk a két polimorfizmus haplotípusának analízisét is. Különösen bioló-

gial funkcióval rendelkező lókuszok esetén ugyanis alapvető annak ismerete, hogy a két adott hatással rendelkező allélváltozat azonos kromoszómán és így azonos mRNS-en „cisz” helyzetben helyezkedik-e el, vagy épp ellenkezőleg: az egyik az egyik, a másik pedig a másik kromoszómán található-e („transz” állás). Bár ez a kérdés – különösen populáció szinten esetkontroll típusú vizsgálatok esetén, ahol csupán egy csoport haplotípus gyakoriságát kell meghatározni, és nincs szükség az egyes személyek konkrét haplotípusára – számítógépes alkalmazásokkal, bioinformatikai módszerekkel is megválaszolható, ezeknél lényegesen megbízhatóbb az ún. direkt, molekuláris haplotípus meghatározáson alapuló technikák használata. Ezek hátránya, hogy csak egymástól nem túl távol lévő polimorfizmusok haplotípusának vizsgálatára alkalmasak, illetve optimalizálásuk gondos körültekintést igényel, ugyanakkor egyetlen reakció segítségével lehetővé teszik a vizsgált két lókusz genotípusainak valamint haplotípusának meghatározását. Az rs1046322 és rs9457 SNP-k elemzésére általunk beállított eljárás azon alapul, hogy allél-specifikus (azaz 3' végükkel éppen az SNP-k pozíciójában végződő) primereket terveztünk mindkét polimorfizmusra. Ezek valamint ún. külső, kontroll, nem a polimorfizmusokhoz hibridizáló primerek együttes alkalmazása esetén a keletkező PCR-termékek megadják a két polimorf helyen jelenlévő allélokat, illetve amennyiben az egy elegyben jelen lévő két allél-specifikus primerrel is képződik termék, ez azt jelenti, hogy a két adott allél egy kromoszómán van jelen, azaz haplotípust alkot. Mivel a PCR alapú genotípus- és haplotípuselemző eljárások szűk keresztmetszete sok esetben a termékek elektroforézissel történő láthatóvá tétele, a módszer hatékonyságának növelése céljából hagyományos gélelektroforézis mellett automatizált, nagy érzékenységgű kapilláris-elektroforézisen alapuló technikát is használtunk [7].

### ***A WFS1 gén promoter polimorfizmusainak elemzése***

A *WFS1* gén 3' UTR régiójában lévő SNP-kkel kapcsolatos pozitív asszociáció és funkcionális eredmények alapján a gén promoter szakaszának polimorfizmusaira is kiterjesztettük elemzéseinket. A korábban említett alapelveket figyelembe véve 3 lókuszt, az rs4689388 és az rs4273545 SNP-eket valamint az rs148797429 ismétlődési variációt (GGGGCG inszerció / deléción) vizsgáltuk. Ezen utóbbi polimorfizmus elemzése technikai szempontból is kihívást jelentett, mivel a PCR-t követően a 6 bp különbség kimutatása még kapilláris elektroforézis alkalmazásával sem problémamentes. Bevezettünk ezért egy másik technikát, ami real-time PCR berendezés segítségével a képződő ampikonok olvadáspontjának meghatározásán alapul. Ennek lényege, hogy a SYBR Green DNS-interkalátor festék csak a kettős láncú DNS-t jelöli, így ha egy mintát a fluoreszcens molekula jelenlétében lassan felmelegítünk, és a képződő jelet folyamatosan detektáljuk, akkor az olvadáspontnak megfelelő hőmérsékleten a jel intenzitása hirtelen lecsökken. Ezen eljárások párhuzamos alkalmazásával lehetővé vált a polimorfizmus hatékony, megbízható genotípus meghatározása.

A polimorfizmusok nagyobb fizikai távolsága miatt a haplotípus analízist ezúttal matematikai módszerekkel végeztük el. Két – egymástól valamelyest eltérő – megközelítést párhuzamosan alkalmaztunk: a HaploView 4.2 program segítségével egy populáción belül kiszámítható az adott haplotípusok előfordulási gyakorisága, a Phase 2.1 algoritmus segítségével viszont az egyes személyek haplotípusa jósolható meg. A két módszerrel kapott eredmények azonosak voltak, és megállapítottuk, hogy az rs4689388A–rs148797429ins–rs4273545T haplotípus a 2-es típusú cukorbetegség genetikai rizikó faktorának tekinthető (OR = 3,18,  $\chi^2$ -próba  $p = 1,84 \cdot 10^{-5}$ ). A három polimorfizmus együttes elemzése alapján a legerősebb védő faktornak a G–ins–G haplotípus bizonyult ( $\chi^2$ -próba  $p = 1,50 \cdot 10^{-6}$ ). Szembetűnő lehet, hogy mind a rizikó, mind a védő haplotípusban a hosszúság-polimorfizmus hosszú (ins)

allélváltozata van jelen. Ez az eredmény is felhívja a figyelmet a haplotípus analízis fontosságára: a komplex jellegek esetében mindig szem előtt kell tartani, hogy a genetikai (és környezeti) hatások egymással is kölcsönhatásban állnak: elképzelhető, hogy az SNP-k főképp ezen variáns jelenléte esetén fejtik ki hatásukat.

*In vitro* sejtes rendszerben elemeztük az rs148797429 és az rs4273545 polimorfizmusok génkifejeződésre kifejtett hatását. A promoter ezen két variánst tartalmazó szakaszát pGL3-Basic vektorba klónoztuk, és így mértük az – irányított mutagenézissel létrehozott – variánsok relatív ( $\beta$ -galaktozidázra normalizált) luciferáz aktivitását. A kísérletek HEK293T és SK-NF-I neuroblastoma sejt vonal alkalmazásával is elvégeztük. Eredményeink alapján az rs4273545 SNP – az alkalmazott *in vitro* rendszerben – befolyásolja a génexpresszió aktivitását.

### **A SNAP-25 gén 3' UTR polimorfizmusainak elemzése**

A SNAP-25 gén szerepe – többek között – azért merül föl ebben a kutatómunka során, mert a fehérjeterméke szerepet játszik az exocitózis folyamatában, ami mind a központi idegrendszeri folyamatokban (neurotranszmisszió), mind a hasnyálmirigy  $\beta$ -sejtjeiben (inzulin szekréció) alapvető jelentőségű. A vizsgált polimorfizmusok (rs3746544 GT és rs1051312 CT) genotípus és haplotípus elemzése egy korábban kidolgozott eljárással történt, melynek lényege, hogy olyan szekvencia-specifikus fluoreszcens próbákat alkalmazunk, melyek bekötődését mindkét SNP meghatározza. Erre azért van lehetőség, mert a két polimorfizmus egymáshoz meglehetősen közel, mindössze 4 bázispár távolságban helyezkedik el. A real-time PCR alapú eljárás ily módon direkt haplotípus meghatározást tesz lehetővé. Ez a megközelítés abból a szempontból is előnyös, hogy közvetlen információt ad a polimorf lokuszok kapcsoltságára vonatkozóan is. A mostani kísérletek megerősítették azt a korábbi megfigyelésünket, miszerint a polimorfizmusok között sajátos kapcsoltsági viszony ( $D' = 1$ ,  $R^2 = 0,21$ ) áll fenn: noha mindkét genotípus ritka alléljának gyakorisága viszonylag magas (rs3746544G = 0,35, rs1021312C = 0,26), ennek ellenére a két forma által képzett haplotípus egyáltalán nem fordul elő az általunk vizsgált magyar populációban. Az asszociáció vizsgálat arra engedett következtetni, hogy a T–T haplotípussal rendelkezők szignifikánsan magasabb pontszámot értek el az önkitöltős Barratt-féle impulzivitás skálán azokhoz a személyekhez képest, akik ezen haplotípussal nem rendelkeztek. Tekintettel arra, hogy a promoter régióban lévő polimorfizmusok esetében hasonló – a képződő fehérje mennyiségét befolyásoló – biológiai hatás tételezhető fel, elemzéseinkbe két itt elhelyezkedő SNP-t (rs6039769AC és rs6077690AT) is bevontunk. Ezek esetében azonban nem kaptunk szignifikáns összefüggést a vizsgált jelleg és a genotípus kategóriák között. A 3' UTR régió polimorfizmusait a pozitív asszociáció eredmény tükrében molekuláris módszerekkel vizsgáltuk tovább. A vizsgálat alapjául az az *in silico* megfigyelés is szolgált, hogy a miRNS-641 kötőhelyét mindkét polimorfizmus érinti. Luciferáz riportert konstrukciót készítettünk, melyben az eredeti biológiai lokalizációnak megfelelően a SNAP-25 gén teljes 3' UTR szakaszát a luciferázt kódoló gén mögé klónoztuk (pMIR-REPORT rendszert alkalmazva). Irányított mutagenézissel előállítottuk a további 3 lehetséges haplotípus variánst, és megállapítottuk, hogy a relatív luciferáz aktivitás a – szekvencia analízis alapján – tökéletes kötőhelyet létrehozó T–T haplotípus esetén a legalacsonyabb, a kötőhelyben egy-egy eltérést okozó G–T és T–C változat esetén köztes, míg a két eltérést okozó G–C haplotípus esetén a legmagasabb. Ezen különbségek statisztikailag szignifikánsnak bizonyultak [8].

A SNAP-25 nem csak a génben található polimorf helyek révén variábilis, hanem alternatív splicing mechanizmussal két eltérő mRNS és fehérje termék jöhet létre. A 2 mRNS az 5. exonban különbözik egymástól, ami a fehérje szintjén 9 aminosav eltérését jelenti. Mivel is-

mert, hogy a különböző variánsok (ebben az esetben és általában is) eltérő funkcióval rendelkezhetnek, hasznosak lehetnek azok az eljárások, amelyek alkalmasak az egyes variánsok azonosítására. A két SNAP-25 izoforma mérésére két különböző technikát állítottunk be. Az egyik szekvencia-specifikus primerek és SybrGreen fluoreszcens interkalátor festék alkalmazásán alapul, a keletkező termékeket real-time PCR-rel detektáltuk. A másik eljárás során PCR-t követően restrikciós endonukleázos emésztést alkalmaztunk, és a keletkező termékeket hagyományos valamit kapilláris elektroforézissel tettük láthatóvá. A mennyiségi mérés denzitometriás kiértékelésen alapult. Megállapítottuk, hogy a központi idegrendszerben és a hasnyálmirigyben a SNAP-25 gén expressziója 2–3 nagyságrenddel magasabb, mint más szövetekben (szív, vese, máj, vázizom, lép). Ez a megfigyelés a pályázat szempontjából különösen jelentős, mivel olyan kandidáns gént feltételez, aminek mind a cukorbetegség, mind a központi idegrendszeri vonatkozások szempontjából jelentősége lehet. Említésre méltó az is, hogy míg a központi idegrendszerben a „b” izoforma dominál, addig a perifériás szervekben (hasnyálmirigyben is) az „a” változat magasabb expressziója mutatható ki [9].

A kutatómunka eredményeit hazai ill. nemzetközi konferenciákon előadások és poszterek formájában valamint nemzetközi folyóiratokban tudományos közleményekben publikáltuk. A folyóiratcikkek (melyekben a pályázat azonosítója feltüntetésre került) összesített impakt faktora – jelenleg – meghaladja a 25-öt, emellett további három közlemény áll szerkesztés alatt.

## Referenciák

1. Abdul-Rahman O, Sasvari-Szekely M, Ver A, Rosta K, Szasz BK, Kereszturi E, Keszler G. Altered gene expression profiles in the hippocampus and prefrontal cortex of type 2 diabetic rats. *BMC Genomics*. 2012 Feb 27;13:81.
2. Lindner I, Helwig U, Rubin D, Li Y, Fisher E, Boeing H, Möhlig M, Spranger J, Pfeiffer A, Hampe J, Schreiber S, Döring F, Schrezenmeir J. Putative association between a new polymorphism in exon 3 (Arg109Cys) of the pancreatic colipase gene and type 2 diabetes mellitus in two independent Caucasian study populations. *Mol Nutr Food Res*. 2005 Oct;49(10):972-6.
3. Blain JF, Aumont N, Théroux L, Dea D, Poirier J. A polymorphism in lipoprotein lipase affects the severity of Alzheimer's disease pathophysiology. *Eur J Neurosci*. 2006 Sep;24(5):1245-51.
4. Jaczó Z, Pál E, Dénes R, Somogyi A, Sasvári-Székely M, Guttman A, Rónai Z. Rapid Analysis of Colipase Gene Variants by Multicapillary Electrophoresis. *Electrophoresis*. 2014 Dec.
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 Jun;162B(4):404-12.
6. 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. Detailed investigation of the role of common and low-frequency WFS1 variants in type 2 diabetes risk. *Diabetes*. 2010 Mar;59(3):741-6.
7. Kerékgyártó M, Németh N, Kerekes T, Rónai 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 Apr 19;1286:229-34.
8. Németh N, Kovács-Nagy R, Székely A, Sasvári-Székely M, Rónai Z. Association of impulsivity and polymorphic microRNA-641 target sites in the SNAP-25 gene. *PLoS One*. 2013 Dec 31;8(12):e84207.
9. Németh N, Kerékgyártó M, Sasvári-Székely M, Rónai Z, Guttman A. Rapid identification of human SNAP-25 transcript variants by a miniaturized capillary electrophoresis system. *Electrophoresis*. 2014 Feb;35(2-3):379-84.