

MIKRO-RNS-KÖTŐ HELYEK GENETIKAI VARIABILITÁSA ÉS A DIABETES MELLITUS

Elek Zsuzsanna,⁽¹⁾ Brauswetter Diána,⁽¹⁾ Dr. Kovács-Nagy Réka,⁽¹⁾ Dr. Nagy Géza,⁽²⁾ Dr. Székely Anna,⁽³⁾
Dr. Somogyi Anikó,⁽²⁾ Dr. Rónai Zsolt,⁽¹⁾ Dr. Sasvári-Székely Mária⁽¹⁾

(1) Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet, Budapest

(2) Semmelweis Egyetem, II. Belgyógyászati Klinika, Budapest

(3) Eötvös Loránd Tudományegyetem, Pszichológiai Intézet, Budapest

ÖSSZEFOGLALÓ: A 2-es típusú diabetes mellitus napjaink egyik leggyakoribb multifaktoriális betegsége, melynek számos genetikai rizikófaktorát már azonosították, a lista azonban még közel sem teljes. A mikroRNS-ek (miRNS) az mRNS-ek 3' nem-kódoló régiójába (3'UTR) bekötődő oligonukleotidok, amelyek komplex folyamatok révén szabályozzák a keletkező fehérje mennyiségét. Munkánk során egy funkcionális szempontból új polimorfizmuscsoport, a miRNS-ek kötőhelyét érintő SNP-k vizsgálatát tűztük ki célul. Ezekről a genetikai variációkról még viszonylag kevés adat áll rendelkezésre, de feltételezhető, hogy a fehérjeszintézis szabályozása révén szintén hozzájárulhatnak a komplex kórképek genetikai hátterének meghatározásához. A vizsgálatba bevont polimorfizmusok kiválasztásához internetes adatbázisokat használtak (T2D-Db, Patrocles, PolymiRTS, NCBI). Az SNP vizsgálat a Szegedi Biológiai Központ Chip Laboratóriumában történt, „Open Array” rendszerrel. A kapott adatokat AutoCaller 1.1 szoftverrel elemezték a Hardy–Weinberg-szabály figyelembevételével. A statisztikai értékelés SPSS programmal történt. 29 SNP genotípusát határozták meg összesen 891 DNS-mintán (diabetes + kontroll) SNP chip segítségével, a polimorfizmusokat előzetes in silico vizsgálataik során választották ki. A statisztikai elemzés során 4 SNP esetében találtak asszociációt egy adott allélvariáns és a 2-es típusú cukorbetegség előfordulása között. Érdekes, hogy ezek között a diabetes mellitusszal már korábban is összefüggésbe hozott gének is szerepelnek – Hif1a (hipoxia indukálta faktor 1a, rs11549465: p=0,015), WFS1 (wolframin, rs9457: p=0,005), FABP2 (fatty acid binding protein 2, intestinal, rs2964: p=0,011), MYO5B (myosin 5B, rs9959610: p=0,046). Az eredmények a diabetes mellitus hátterében álló genetikai polimorfizmusok új biológiai hatásmechanizmusára világíthatnak rá. A FABP2 gén exonjának mutációját összefüggésbe hozták az obesitással, metabolikus X-szindrómával, amelynek része az inzulinrezisztencia. Ennek megfelelően feltételezhető, hogy a miRNS bekötődését és így módon a képződő fehérje mennyiségének megváltozását eredményező polimorf variánsok szintén hozzájárulhatnak a kórkép genetikai hátteréhez. A molekuláris funkció egyértelmű azonosításához azonban további vizsgálatok szükségesek.

Kulcsszavak: mikroRNS, polimorfizmus, SNP, diabetes mellitus

Elek Zs, Brauswetter D, Kovács-Nagy R, Nagy G, Székely A, Somogyi A, Rónai Zs, Sasvári-Székely M:
GENETIC VARIABILITY AT THE MICRO-RNA BINDING SITES AND DIABETES MELLITUS

SUMMARY: Type 2 diabetes mellitus is one of the most frequent complex metabolic diseases. Several genetic factors of the illness have already been identified, the list is however far not complete yet. MiRNAs are short oligonucleotides interacting with the 3' UTR (untranslated region) of mRNAs, which results in the regulation of protein synthesis by complex procedures. The study focuses on a novel group of functional polymorphisms that modify the binding sites of miRNAs. Little is known about this group of polymorphisms, it can be however supposed that they can contribute to the development of complex diseases by the regulation of translation. Web-based databases (T2D-Db, Patrocles, PolymiRTS, NCBI) were used to select the SNPs involved in our study. SNP genotyping was carried out in the chip laboratory of the Biological Research Center (Szeged) using the “Open Array” multiplex SNP analysis platform. Data were analysed by the AutoCaller 1.0 software taking the Hardy–Weinberg equilibrium into consideration. Statistical analysis was carried out by the SPSS software package. 29 SNPs of 891 DNA samples (diabetic and control) were determined using SNP chip analysis, SNPs were selected by in silico search. Significant association was shown between 4 single nucleotide polymorphisms and the disease. Interestingly several of these genes were previously shown to be in connection with diabetes mellitus either by other association studies or by putative biological function. Genetic mutations in exons can modify the structure of the coded protein, on the other hand SNPs in the 3' UTR segments might also have functional relevance by influencing the amount of the synthesized protein. SNPs involved in our study belong to this latter group by modifying miRNA binding, further in vitro studies are however needed to clarify the exact biological function.

Key words: microRNA, polymorphism, SNP, diabetes mellitus

Magy Belorv Arch. 2010; 63. –106.

A diabetes mellitus az egész szervezetet érintő anyagcserezavar, melynek hátterében az alapvető kóroki folyamat az inzulin csökkent termelése (1-es típus) vagy a perifériás sejtek inzulinnal szembeni rezisztenciája (2-es típus). Mindkét kórforma komplex etiológiájú, azaz kialakulásukban – valamelyest eltérő mértékben – mind a környezeti, mind a genetikai tényezők fontos szerepet játszanak. Ezen örökletes faktorok a gének kódoló vagy szabályozó régióiban elhelyezkedő genetikai polimorfizmusok, melyek gyakran a humán genom egyetlen nukleotidjának („betűjének”) megváltozását jelentő SNP-k (egypontos nukleotid polimorfizmus – single nucleotide polymorphism) csoportjába tartoznak. Fontos hangsúlyozni, hogy a tünetek kialakulásához számos ilyen polimorf variáns járul hozzá (a környezeti hatásokkal együtt), így egy-egy SNP sem nem szükséges, sem nem elégséges feltétele a kórkép megjelenésének, és szinte minden esetben egészséges emberekben is kimutatható. Éppen emiatt jelent különös kihívást a diabetes mellitus és más komplex kórképek genetikai hátterének azonosítása, mivel egy-egy SNP hatása rendszerint meglehetősen csekély, gyakran nehezen kimutatható.

A cukorbetegség genetikai hátterét különböző módszerekkel számos kutatócsoport vizsgálta. Asszociációanalízis keretében összefüggést mutattak ki a 2-es típusú diabetes mellitus és – többek között – a KCNJ15, IGF2BP2, KCNJ11, NOTCH2, TCF7L2, TSPAN8 és WFS1 gének SNP-i között,¹⁶ ezek genetikai variációk pontos biológiai funkciója azonban még egyes esetekben nem tisztázott.^{17,19} A genotipizáló eljárások fejlődése következtében napjainkban egész genomra kiterjedő analízisek is megvalósíthatók, ami a 2-es típusú cukorbetegséggel asszociációban álló polimorfizmusok listáját tovább bővíti.¹¹

A genetikai kutatások napjainkban egyre többet foglalkoznak a humán genom egy meglehetősen nagy, és mind ez idáig meglepően kevésbé ismert részével. Közismert, hogy génjeink felelősek a fehérjék kódolásáért, a teljes genomnak azonban csupán alig több mint 1%-a kódol fehérjét, s kevesebbet tudunk a fennmaradó 98,7% szerepéről. Világossá kezd válni azonban, hogy a korábban hulladéknak („junk-DNS”) vélt genomrégiók funkcionális szempontból mégsem jelentéktelenek. Ezek a szakaszok kódolják többek között a kisméretű, 21–22 nukleotidból álló RNS-eket, melyeket mikroRNS-eknek (miRNS) nevezünk.^{9,15} A miRNS-ek fontos szerepet játszanak a fehérjék szintézisének szabályozásában poszttranszkripcionális szinten: több ponton befolyásolják a transzlációt, azaz a messenger RNS-ek (mRNS-ek) átíródását oly módon, hogy az mRNS 3'UTR (nem transzlálódó) régiójához kötődnek. Bioinformatikai elemzések szerint az emlős miRNS-ek száma meghaladhatja az ezret is, és a miRNS-ek a fehérjekódoló gének nem kevesebb, mint 30%-ának szabályozásában vesznek részt.^{1,2} Figyelembe véve emellett, hogy a miRNS-ek bejuthatnak a sejtmagba,⁸ vagy éppen szekretálódhatnak a

sejtből,²⁰ e molekuláknak számos további funkciója is valószínűnek tűnik. Bázispárosodás révén szabályozhatják az mRNS-ek képződését a sejtmagban, chaperonokként módosíthatják az mRNS-ek működését: befolyásolhatják például az mRNS-fehérje kölcsönhatásokat. A képet tovább bonyolítja, hogy egy mikro-RNS nem csak egy génhez tud kötődni: a különböző célének esetében azok működését sok esetben eltérő mértékben gátolja, vagy éppen fokozza. A mikroRNS-mintázat bizonyos betegségekre sokkal jellemzőbb lehet, mint az mRNS-ek expressziójának változása,¹³ így akár a későbbiekben a diagnosztika eszközevé is válhatnak.

A képet tovább tarkítja, hogy ezek a folyamatok – a genom polimorf jellegéből adódóan – nem teljesen azonos módon működnek minden emberben. Egy SNP megváltoztathatja: elronthatja vagy éppen egy új helyen létrehozhatja egy miRNS kötőhelyét, ezeket a genetikai variációkat miRSNP-nek nevezzük.¹² A miRNS-ek rendkívül komplex biológiai szerepét szem előtt tartva feltételezhető, hogy a miRSNP-k szintén hozzájárulnak a komplex etiológiájú kórképek genetikai hátterének meghatározásához. Különösen igaz lehet ez a cukorbetegség tekintetében, ahol egyre több közlemény számol be különböző miRNS-ek patofiziológiai szerepéről a betegség kialakulása során.^{5,6,21} Munkánk során genetikai asszociációanalízis keretében kívántunk azonosítani olyan új kandidáns géneket ill. polimorfizmusokat, amelyek *in silico* vizsgálatok alapján miRNS-ek működését változtathatják meg, s ily módon hozzájárulhatnak a diabetes mellitus örökletes hátterének meghatározásához.

Módszerek

Vizsgálati személyek, mintavétel. Az asszociációvizsgálat során 378 2-es típusú diabetes mellitusban szenvedő, valamint 304 egészséges személy DNS-mintáját használtuk föl. A cukorbetegségeket a Semmelweis Egyetem II. Belgyógyászati Klinikájának gondozása alatt álltak. A kísérleteket az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásaitikai Bizottság (ETT-TUKÉB) jóváhagyta, a mintavétel illetve a kísérletek megkezdése előtt minden résztvevő tájékoztatót kapott (mely összefoglalta a tanulmány célját és menetét), valamint írásos beleegyező nyilatkozatot töltött ki. A mintavétel nem-invazív módon történt, a vizsgált személyek a szájnyalkehártyát vattapálcával 15–20 másodpercig dörzsölték, ami elegendő DNS-mintát biztosított a genetikai polimorfizmusok elemzéséhez. A DNS tisztítása korábban leírt eljárás alkalmazásával történt.³

MiRNS-k in silico azonosítása. A diabetes mellitus már ismert kandidáns géneit, ill. az ezekben lévő miRNS-kötő régiókat, valamint ezek polimorfizmusait a T2D-Db (<http://t2ddb.ibab.ac.in/candidategenes.shtml>), az NCBI Pubmed és SNP adatbázisai (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), a PolymIRTs (<http://compbio.utmem.edu/miRSNP/>), valamint a Patrocles (<http://www.patrocles.org/Patrocles.htm>) adatbázisok alkalmazásával azonosítottuk.

MiRNS-k genotípusának meghatározása. A genotípus meghatározása az OpenArray (Applied Biosystems) multiplex, szekvenációs specifikus, fluoreszcens próbák alkalmazásán alapuló eljárás

segítségével történt. A technika alapelve a hagyományos, real-time PCR-es SNP-genotipizáláson alapul. Ennek lényege, hogy egyetlen reakcióelegyben alkalmazzuk az egyik, illetve a másik allélt felismerő próbát, amelyek eltérő színű fluoreszcens festékkel jelöltek. Ha a próba be tud kötődni a reakció során a minta-DNS-hez, akkor az általa kibocsátott jel intenzitása emelkedik, ennek megfelelően a reakció végén detektálható fluoreszcenciamentázat alapján a minták genotípusa leolvasható. Az OpenArray rendszer ezen elvet multiplex formában alkalmazza: egy mikroszkópos tárgylemez méretű üveglapon vannak rögzítve az analízishez szükséges PCR-primerek és fluoreszcens próbák, így egyetlen ilyen „chip” segítségével 48 DNS-minta 63 polimorfizmusának genotípusa határozható meg egy lépésben. A genotipizáló reakció az Avidin Kft. (Szeged) által üzemeltetett berendezéssel történt. A DNS-mintákat 384-es tálcából egy automatizált rendszer az üveglapra felvitte, a PCR-amplifikálás lapos blokkal üzemelő hagyományos PCR-berendezésben történt. Ezt követte a végpontdetektálás, melynek során a különböző fluoreszcens jeleket a berendezés detektálta, és az így készített képekből OpenArray™ SNP Genotyping Analysis Software a nyers adatokat elkészítette, melyeket ezt követően az AutoCaller 1.0 software alkalmazásával dolgoztunk fel. A kiértékelés során figyelembe vettük az NCBI adatbázisban esetenként rendelkezésre álló genotípus-gyakorisági adatokat, ill. a Hardy–Weinberg-egyensúlyt.

Statisztikai analízis

Az eset–kontroll vizsgálat során az egészségesek és a betegek csoportjában az allél-, illetve genotípus-gyakorisági értékeket χ^2 -próbalal hasonlítottuk össze az SPSS 17.0 programcsomag alkalmazásával.

Eredmények

MiR-SNP-k in silico azonosítása. A vizsgálatba bevontni kívánt SNP-k kiválasztásának első lépéseként adatbázisok adatainak felhasználásával feltérképeztük a cukorbetegség kandidáns génjeit érintő miRNS-kötő régiókat. A T2D-Db adatbázis adatai alapján 159 gén hozható összefüggésbe a kórképpel. Ezen gének közül 125 tartalmazott a 3'UTR régióban polimorfizmust az NCBI SNP adatbázisa alapján, ami összesen 520 SNP-t jelentett. A vizsgálandó polimorfizmusok kiválasztása során a PolymiRTS és a Patrocles adatbázisokat is alkalmaztuk, melyek a feltételezett miRNS-kötő helyekben előforduló DNS-variációkat tartalmazzák. A polimorfizmusokat ennek alapján négy kategóriába soroltuk:

1. az új allél elront egy konzervált felismerési szekvenciát;
2. az új allél létrehoz egy új mikroRNS-kötő helyet;
3. az új allél egy nem konzervált régióban lévő felismerési szekvenciát ront el, és
4. nem határozható meg pontosan, hogy melyik az ősi, ill. az új allél.

Az 1. osztály SNP-i rendellenes géncsendesítést okozhatnak, a 2. pedig a normál csendesítés kontrolljának elvesztéséhez vezethet, azaz ezen variációk

esetében feltételezhető leginkább, hogy a polimorfizmusnak funkcionális hatása van. Az e két kategóriába tartozó SNP-k csoportját az alábbi szempontok szerint szűkítettük tovább: olyan polimorfizmusokat választottunk, amelyekkel kapcsolatban álló miRNS szöveti expresszója a cukorbetegség szempontjából relevánsnak mondható, azaz az adott miRNS a zsírszövetben, izomszövetben, májban, ill. a pancreas β -szigetsejtjeiben kifejeződik. Vizsgálatunk során kihagytuk továbbá azokat a régiókat, melyek csupán feltételezett kötőhelyek, azaz a hozzájuk kapcsolódó miRNS-eket még nem azonosították. További technikai megfontolásokat is figyelembe véve alakítottuk ki végül azt a 29 SNP-ből álló panelt, melyet bevontunk az asszociációvizsgálatba.

Genotípus-meghatározás az Open Array rendszerrel. Az OpenArray multiplex SNP genotipizáló rendszerrel kapcsolatban mind ez idáig kevés tapasztalat állt rendelkezésre gyakorlati szempontból, ezért munkánk első lépése a módszer megbízhatóságának validálása volt. Három polimorfizmus (a P2RX7 gén rs2230912 A/G, valamint a HIF1 α gén rs11549465 C/T és rs2057482 C/T SNP) genotípusát független eljárás alkalmazásával is meghatároztuk: a két módszer közötti egyezés mindhárom esetben meghaladta a 98%-ot (1. táblázat), ami az OpenArray eljárás megbízhatóságát egyértelműen bizonyította.

A rendszer hatékonysága megközelítette a 80%-ot, ami a mi rendszerünkben megfelelőnek bizonyult az eset–kontroll vizsgálat megbízható elvégzéséhez. A sikertelen genotípus-meghatározások alapvetően két okra voltak visszavezethetők.

1. A szekvenciaspecifikus próba alkalmazásán alapuló genotipizálás bizonyos SNP-k esetében nem alkalmazható megfelelően, mivel a polimorf nukleotidot környező DNS-szekvencia nem teszi lehetővé olyan próbák tervezését, amelyek hatékonyan és specifikusan működnek. Ezen esetekben az eljárás nem csak az Open Array multiplex rendszerében, hanem a hagyományos individuális technika alkalmazása esetén is viszonylag kis hatékonysággal működik.
2. Más esetekben a multiplex rendszerekre jellemző technikai nehézségek vezettek sikertelen genotípus-meghatározáshoz, amely azonban

1. táblázat. Az Open Array genotipizáló rendszer validálása. A táblázat 3 SNP esetében mutatja az Open Array rendszerrel, ill. egy független módszerrel meghatározott eredmény egyezését.
N: mintaszám

SNP	Egyezés	N
P2RX7 rs2230912 A/G	98,1%	560
HIF1 α rs11549465 C/T	99,1%	348
HIF1 α rs2057482 C/T	98,3%	507

nem haladta meg a hasonló komplex eljárásokra jellemző technikai hibák szintjét.

Az SNP-k genotípusának meghatározása az Auto-Caller 1.0 software segítségével történt. A fluoreszcens szignálok számszerűsített adatai mellett a megbízható genotipizáláshoz az NCBI adatbázisában rendelkezésre álló allél- és genotípus-gyakorisági adatokat vet-tük figyelembe. Emellett szem előtt tartottuk, hogy az egészséges népességben – megbízható genotípus-meghatározás esetén – a genotípus-gyakorisági értékek nem térnek el szignifikánsan a Hardy–Weinberg-egyensúly alapján számított várható értékektől.

Asszociációvizsgálat: új diabetes mellitus kandidáns gének azonosítása. Eset–kontroll vizsgálat keretében hasonlítottuk össze az egészséges, illetve a cukorbetegségben szenvedő személyek genotípus-eloszlását az egyes polimorfizmusok esetében. Az asszociációvizsgálat 4 SNP esetében mutatott ki szignifikáns különbséget a két vizsgálati csoport között, aminek alapján a HIF1 α gén rs11549465, a FABP2 gén rs2964, a WFS1 gén rs9457 és a MYO5B gén rs9959610 SNP-kről feltételezhető, hogy hozzájárulnak a diabetes mellitus genetikai meghatározásához. Az asszociációvizsgálat eredményeit a 2. táblázat foglalja össze. A HIF1 α gén rs11549465 polimorfizmusa közvetlenül nem érint miRNS-kötő helyet, ugyanakkor feltételezhető, hogy genetikai kapcsoltságban áll a gén ilyen funkciójú SNP-jével. Szembetűnő, hogy az asszociációt mutató polimorfizmusok olyan gének 3'UTR régiójában helyezkednek el, amelyek egyéb polimorfizmusai vagy biológiai funkciója összefüggésbe hozható a cukorbetegséggel. A FABP2 gén exonban lévő mutációját például összefüggésbe hozták obesitással,⁴ metabolikus X-szindrómával, melynek része az inzulinrezisztencia is, és ily módon a diabetes mellitusszal közvetlen kapcsolatban áll. A WFS1 gén az endoplazmás retikulum stressz kivédésben fontos, ennek kóroki szerepét – a cukorbetegséggel gyakran társuló – hangulatzavarok esetében mutatták ki, ugyanakkor az endoplazmás

retikulum stressz jelentősége a 2-es típusú cukorbetegség során a hasnyálmirigy β -sejtjeiben is ismert.¹⁰

Megbeszélés

A miRNS-ek felfedezésével új dimenzió nyílt meg az eukarióták génexpressziója szabályozásának megértésében. Kiderült, hogy nem véletlenül meglehetősen hosszú számos mRNS 3'UTR régiója: ez a szakasz fontos szerepet játszik a gén funkciójában, több különböző támadásponton keresztül a fehérjeszintézis szabályozásában.¹⁸ A már feltérképezett miRNS–mRNS kölcsönhatások alapján megfigyelhető néhány jellegzetesség:⁷ egy adott útvonalban részt vevő, funkcionálisan rokon gének szabályozása miRNS-ek révén összehangoltan történik. Egy adott gén 3'UTR régiójában több miRNS-kötő hely is jelen lehet, így a célgén működését a körülményekhez lehet illeszteni. Több miRNS rendelkezik közös vagy átfedő kötőhellyel, illetve az aktív, érett miRNS egy kevésbé hatékony módosulattal is kölcsönhatásban állhat. A miRNS-ek szerepét a differenciáció során is bizonyították expressziós chip (microarray) technika segítségével,¹⁴ érdekes, hogy a differenciálódás azonos fokán a különböző sejtvonalakban hasonló miRNS-mintázat figyelhető meg. Fontos szem előtt tartani azt is, hogy a legtöbb miRNS célpontja azonban kísérletesen máig nem bizonyított, csak bioinformatikai adatok segítségével, a szekvenciaazonosság alapján jósolt.

Munkánk következő lépése ennek megfelelően az asszociációt mutató SNP-k, illetve a velük kapcsolatban álló miRNS-ek funkcionális analízise. *In vitro* sejttes rendszerben riporter (pl. luciferáz) konstrukciók segítségével hasonlítjuk össze az egyes SNP-k esetében a különböző allélvariánsok fehérjeszintézisre kifejtett szabályozó hatását. Mindezen eredmények további adatokkal szolgálhatnak a 2-es típusú diabetes mellitus komplex genetikájának megértéséhez, és felhívhatják a figyelmet egy eddig még kevésbé ismert

2. táblázat. Eset–kontroll asszociáció vizsgálat. A táblázat azon 4 SNP eredményeit mutatja, melyek esetében szignifikáns különbség volt kimutatható az egészséges ill. beteg csoport genotípus eloszlása között. A genotípus gyakoriság értékek %-ban vannak megadva. N: mintaszám

p=0,016	HIF1 α rs11549465				p=0,011	FABP2 rs2964			
	N	TT	CT	CC		N	TT	CT	CC
Diabetes	216	0,0	19,9	80,1	Diabetes	247	48,6	44,1	7,3
Kontroll	190	3,7	21,1	75,3	Kontroll	224	43,8	40,2	16,1
p=0,005	WFS1 rs9457				p=0,043	MYO5B gén rs9959610			
	N	GG	CG	CC		N	AA	AC	CC
Diabetes	341	16,1	42,5	41,3	Diabetes	184	0,5	21,2	78,3
Kontroll	260	20,4	51,2	28,5	Kontroll	173	0,0	12,1	87,9

polimorfizmuscsoport, a miRNS-ek kötőhelyét érintő SNP-k szerepére.

Köszönetnyilvánítás

A közleményben bemutatott munka megvalósításához hozzájárultak az ETT 254/09., az ETT-258/09., az ETT 117/09. számú támogatások és a Magyar Diabetes Társaság.

Irodalom

1. Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, Barzilai A, Einat P, Einav U, Meiri E, Sharon E, Spector Y, Bentwich Z: Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet* 2005; **37**(7): 766-770.
2. Berezikov E, van Tetering G, Verheul M, van de Belt J, van Laake L, Vos J, Verloop R, van de Wetering M, Guryev V, Takada S, van Zonneveld AJ, Mano H, Plasterk R, Cuppen E: Many novel mammalian microRNA candidates identified by extensive cloning and RAKE analysis. *Genome Res* 2006; **16**(10): 1289-1298.
3. Boór K, Rónai Z, Nemoda Z, Gaszner P, Sasvári-Székely M, Guttman A, Kalász H: Noninvasive genotyping of dopamine receptor D4 (DRD4) using nanograms of DNA from substance-dependent patients. *Curr Med Chem* 2002; **9**(8): 793-797.
4. de Luis DA, Sagrado MG, Aller R, Izaola O, Conde R, Romero E: Ala54Thr polymorphism of fatty acid binding protein 2, role on insulin resistance and cardiovascular risk factors in presurgical morbid obesity patients. *Obes Surg* 2009; **19**(12): 1691-1696.
5. Feng B, Chen S, George B, Feng Q, Chakrabarti S: miR133a regulates cardiomyocyte hypertrophy in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2010; **26**(1): 40-49.
6. Hezova R, Slaby O, Faltejskova P, Mikulkova Z, Buresova I, Raja KR, Hodek J, Ovesna J, Michalek J: microRNA-342, microRNA-191 and microRNA-510 are differentially expressed in T regulatory cells of type 1 diabetic patients. *Cell Immunol* 2010; **260**(2): 70-74.
7. Hua Z Lv Q, Ye W, Wong CK, Cai G, Gu D, Ji Y, Zhao C, Wang J, Yang BB, Zhang Y: MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia. *PLoS One*, 2006; 1.
8. Hwang HW, Wentzel EA, Mendell JT: A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. *Science* 2007; **315**: 97-100.
9. Jackson RJ, Standart N: How do microRNAs regulate gene expression? *Sci STKE* 2007, re1 (2007).
10. Kakiuchi C, Ishigaki S, Oslowski CM, Fonseca SG, Kato T, Urano F: Valproate, a mood stabilizer, induces WFS1 expression and modulates its interaction with ER stress protein GRP94. *PLoS One* 2009; **4**(1): e4134.
11. McCarthy MI, Zeggini E: Genome-wide association studies in type 2 diabetes. *Curr Diab Rep* 2009; **9**(2): 164-171.
12. Mishra PJ, Mishra PJ, Banerjee D, Bertino JR: MiRSNPs or MiR-polymorphisms, new players in microRNA mediated regulation of the cell: Introducing microRNA pharmacogenomics. *Cell Cycle* 2008; **7**(7): 853-858.
13. Molnár V, Tamási V, Bakos B, Wiener Z, Falus A: Changes in miRNA expression in solid tumors: an miRNA profiling in melanomas. *Semin Cancer Biol* 2008; **18**(2): 111-122.
14. Monticelli S, Ansel KM, Xiao C, Socci ND, Krichevsky AM, Thai TH, Rajewsky N, Marks DS, Sander C, Rajewsky K, Rao A, Kosik KS: MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system. *Genome Biol* 2005; **6**(8): R71.
15. Nilsen, TW: Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends Genet* 2007; **23**: 243-249.
16. Okamoto K, Iwasaki N, Nishimura C, Doi K, Noiri E, Nakamura S, Takizawa M, Ogata M, Fujimaki R, Grarup N, Pisinger C, Borch-Johnsen K, Lauritzen T, Sandbaek A, Hansen T, Yasuda K, Osawa H, Nanjo K, Kadowaki T, Kasuga M, Pedersen O, Fujita T, Kamatani N, Iwamoto Y, Tokunaga K: Identification of KCNJ15 as a susceptibility gene in Asian patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Hum Genet* 2010; **86**(1): 54-64.
17. Parikh H, Lyssenko V, Groop LC: Prioritizing genes for follow-up from genome wide association studies using information on gene expression in tissues relevant for type 2 diabetes mellitus. *BMC Med Genomics* 2009; **2**: 72.
18. Rana TM: Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**: 23-36.
19. Sandhu MS, Weedon MN, Fawcett KA, Wasson J, Debenham SL, Daly A, Lango H, Frayling TM, Neumann RJ, Sherva R, Blech I, Pharoah PD, Palmer CN, Kimber C, Tavendale R, Morris AD, McCarthy MI, Walker M, Hitman G, Glaser B, Permutt MA, Hattersley AT, Wareham NJ, Barroso I: Common variants in WFS1 confer risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 2007; **39**(8): 951-953.
20. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO: Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biol* 2007; **9**: 654-659.
21. Zhao E, Keller MP, Rabaglia ME, Oler AT, Stapleton DS, Schueler KL, Neto EC, Moon JY, Wang P, Wang IM, Lum PY, Ivanovska I, Cleary M, Greenawalt D, Tsang J, Choi YJ, Kleinhanz R, Shang J, Zhou YP, Howard AD, Zhang BB, Kendzierski C, Thornberry NA, Yandell BS, Schadt EE, Attie AD: Obesity and genetics regulate microRNAs in islets, liver, and adipose of diabetic mice. *Mamm Genome* 2009; **20**(8): 476-485.

Levelezési cím: Dr. Sasvári-Székely Mária
Semmelweis Egyetem, Elméleti Orvostudományi
Központ, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és
Patobiokémiai Intézet
1094 Budapest, Tűzoltó utca 37-47.
E-mail: maria.sasvari@eok.sote.hu