



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Vegyésmérnöki és Biomérnöki Kar

Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék



HUN-REN Természettudományi Kutatóközpont

Genom Metabolizmus Kutatócsoport

Tóth Máté

TDK dolgozat

A sejtciklus során stabil mRNA expresszióval rendelkező referenciagének azonosítása

Témavezető:

Dr. Vértessy G. Beáta

Egyetemi tanár

BME

Konzulensek:

Nagy Nikolett

Tudományos segédmunkatárs

HUN-REN TTK

Tóth Otília

PhD hallgató

BME

Budapest

2024. 10. 29.

Tartalomjegyzék

1	Rövidítésjegyzék.....	3
2	Bevezetés	4
3	Célkitűzés.....	5
4	Irodalmi háttér.....	6
4.1	A qPCR reakció jellemzése.....	6
4.2	Az interkalálódó fluoreszcens festékek jellemzése.....	8
4.3	Fluoreszcens próbák.....	9
4.3.1	<i>Hidrolízis próbák</i>	9
4.3.2	<i>Hibridizációs próbák</i>	10
4.3.3	<i>Molecular Beacon próbák</i>	10
4.4	Génexpresszió vizsgálata	11
4.4.1	<i>Reverz transzkripció</i>	11
4.4.2	<i>Abszolút és relatív kvantifikáció</i>	12
4.4.3	<i>Belső standardek</i>	13
4.5	A referenciagének jellemzése	14
4.6	Referenciagének azonosítása	15
4.6.1	<i>BestKeeper</i>	16
4.6.2	<i>NormFinder</i>	16
4.6.3	<i>Összehasonlító ΔC_t módszer</i>	16
4.7	A sejtciklus jellemzése.....	17
4.8	Sejtek szinkronizálása	18
5	Kísérletek és módszerek	19
5.1	Sejtfenntartás.....	19
5.2	Sejtek szinkronizálása	19
5.3	Minta legyűjtés.....	19
5.4	FACS minták kezelése	20
5.5	RT-qPCR mérés	21
5.5.1	<i>RNS izolálás</i>	21

5.5.2	<i>Az izolált RNS koncentrációjának, tisztaságának és épségének ellenőrzése</i>	22
5.5.3	<i>Reverz transzkripció.....</i>	23
5.5.4	<i>qPCR reakció.....</i>	23
6	Eredmények és értékelésük.....	25
6.1	Sejtek legyűjtése	25
6.2	Szinkronizálás ellenőrzése	27
6.3	RT-qPCR mérés	29
6.3.1	<i>RNS izolálás</i>	29
6.3.2	<i>Reverz transzkripció.....</i>	30
6.3.3	<i>qPCR analízis.....</i>	31
6.4	Stabil referenciagének keresése	37
6.4.1	<i>Összehasonlító ΔC_t módszer</i>	38
6.4.2	<i>BestKeeper</i>	39
6.4.3	<i>NormFinder.....</i>	40
6.4.4	<i>Összesített rangsor.....</i>	40
7	Összefoglalás	43
8	Köszönetnyilvánítás	44
9	Felhasznált irodalom	45

1 Rövidítésjegyzék

ACTB – aktin fehérje β izoformáját kódoló gén

CDK – ciklin-dependens kináz

cDNS – komplementer DNS

CNOT4 – CCR4-NOT transzkripció komplex négyes alegységek kódoló gén

C_t – threshold cycle

dNTP – dezoxiribo-nukleotid-trifoszfát

EdU – 5-etinil-2'-dezoxiuridin

FACS – fluorescence-activated cell sorting

FBS – foetális borjú szérum

FRET – Förster-féle energiatranszfer

GAPDH – glicerinaldehid-foszfát dehidrogenázt kódoló gén

HNRNPL – heterogén nukleáris ribonukleoprotein L-t kódoló gén

IPO8 – importin 8-at kódoló gén

NRT – no reverse transcriptase

NTC – no template control

PBS – foszfáttal pufferált sóoldat

PCBP1 – poli(rC)-kötő fehérje 1-et kódoló gén

PCR – polimeráz láncreakció

PFA – paraformaldehid

PPIA – peptidil-prolil cisz-transz izomeráz A-t kódoló gén

PUM1 – pumilio RNS-kötő család 1-s tagját kódoló gén

PS – penicillin-sztreptomycin antibiotikum keverék

qPCR – kvantitatív polimeráz láncreakció

RFU – relatív fluoreszcens egység

RPL30 – riboszomális fehérje L30-at kódoló gén

RT – reverz transzkripció

RT-qPCR – reverz transzkripcióval kapcsolt kvantitatív polimeráz láncreakció

SNW1 – SNW domént tartalmazó fehérje 1-et kódoló gén

TBP – TATA-kötő fehérjét kódoló gén

UBC – ubikvitin C-t kódoló gén

2 Bevezetés

A tudományos, orvosi és diagnosztikai munka elengedhetetlen részévé vált a kvantitatív polimeráz láncreakció (qPCR) technika. Megjelenése forradalmi változást jelentett a molekuláris biológiai eljárások fejlődésében, mivel rendkívül széles dinamikus tartománnyal rendelkezik, valamint nagymértékű specificitás jellemzi. A rendelkezésre álló korszerű reagensek, műszerek és optimalizált próbák lehetővé teszik akár egyetlen molekula kimutatását, illetve nukleinsav mennyiségének meghatározását komplex mintákban is soha nem látott pontossággal. A qPCR technika széles körben alkalmazható; diagnosztikai célból patogének kimutatására, nukleotid polimorfizmus elemzésére, génexpresszió mérésére, kromoszóma rendellenességek, illetve fehérjék kimutatására. Ahhoz azonban, hogy mennyiségi információt kellő pontossággal nyerjünk, referenciagének alkalmazására van szükség. Az analitikai elvárásoknak leginkább az adott kísérleti körülmények között stabil expresszióval rendelkező referenciagének felelnek meg, melyek mRNS expresszióját a vizsgálni kívánt génnel együtt, ugyanazon mintában határozzuk meg reverz transzkripcióval kapcsolt kvantitatív PCR (RT-qPCR) alkalmazásával.

Kutatócsoportunk korábban rákos, illetve normál humán sejtvonalak között vizsgálta 12 gén (*ACTB*, *CNOT4*, *GAPDH*, *HNRNPL*, *IPO8*, *PCBP1*, *PPIA*, *PUM1*, *RPL30*, *SNW1*, *TBP*, *UBC*) alkalmazhatóságát és rámutatott, hogy az irodalomban eddig referenciagénként nem alkalmazott *SNW1* és *CNOT4* gének bizonyultak a legstabilabbnak. A sejtciklus-függő génexpressziós elemzés különösen fontos, hiszen számos gén a sejtciklus különböző fázisaiban szorosan szabályozott expressziós mintázatot mutat. Az RT-qPCR rendkívül érzékeny technika a sejtciklus-függő transzkripció szabályozás vizsgálatára, azonban ehhez a megfelelő referenciagének alkalmazása elengedhetetlen. Kutatómunkám során a csoport által korábban vizsgált 12 referenciagén expresszióját elemeztem a sejtciklus folyamán U937 és MOLT4 sejtvonalakban. Kísérleti eredményeim segítséget jelentenek sejtciklusfüggő génexpressziós vizsgálatok tervezésében, illetve rámutatnak a referenciagének megválasztásának fontosságára.

3 Célkitűzés

Kutatómunkám során célom volt a kutatócsoport korábbi eredményeire építve, a sejtciklus során stabil mRNS expresszióval rendelkező géneket azonosítani. Ennek érdekében két humán rákos sejtvonalon, az U937 és MOLT4 sejtkultúrákon végeztem kísérleteimet. Munkám során a mintákat a sejtciklus különböző fázisaiban dúsítottam szinkronizálással, majd a sejteket felengedtem és megfelelő időközönként legyűjtöttem. Azonosítottam a sejtek eloszlását a sejtciklus különböző fázisaiban fluoreszcencia-aktivált sejtválogatással (fluorescence-activated cell sorting, FACS).

A génexpresszió meghatározásához a mintákból RNS-t izoláltam, ellenőriztem az RNS minták épségét és integritását, majd reverz transzkripciót követően, RT-qPCR módszerrel vizsgáltam a 12 referenciagén mRNS expresszióját három biológiai párhuzamost alkalmazva mindkét sejtvonal esetében.

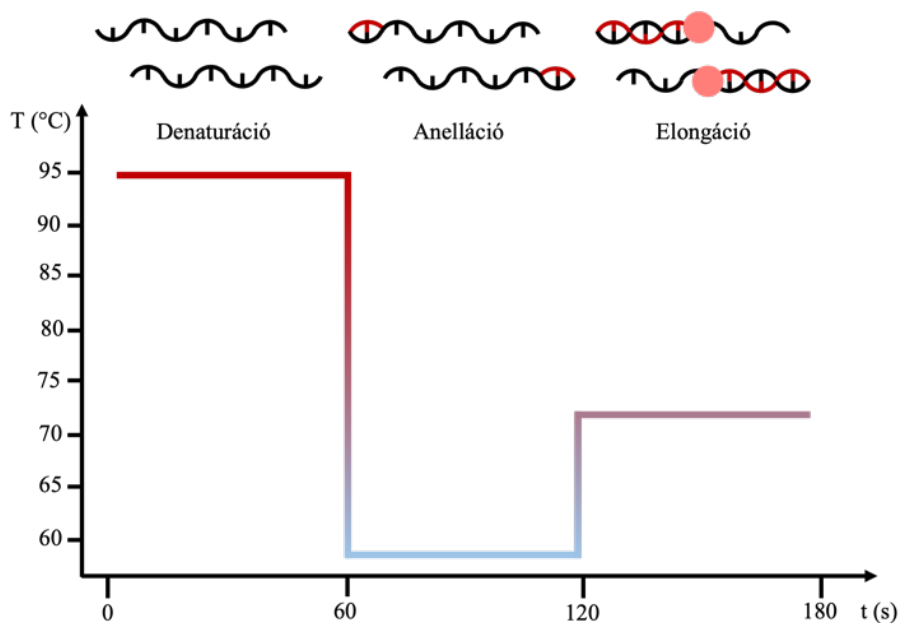
Célom volt a kapott adatokból három különböző, egymástól független kiértékelési módszerrel meghatározni a gének expressziójának stabilitását az U937, a MOLT4, illetve mindkét sejtvonal esetében. Ehhez az összehasonlító ΔC_t , a BestKeeper, illetve a NormFinder módszereket alkalmaztam, valamint meghatároztam a három módszer által generált rangsorok mértani átlagát. Az így kapott összesített rangsor alátámasztja a kutatócsoport korábbi eredményeit. Kutatómunkám során sikeresen azonosítottam az *SNW1* és *CNOT4* géneket, valamint a *TBP* és a *GAPDH* géneket, mint potenciális referenciagének sejtciklusfüggő génexpressziós vizsgálatok során.

4 Irodalmi háttér

4.1 A qPCR reakció jellemzése

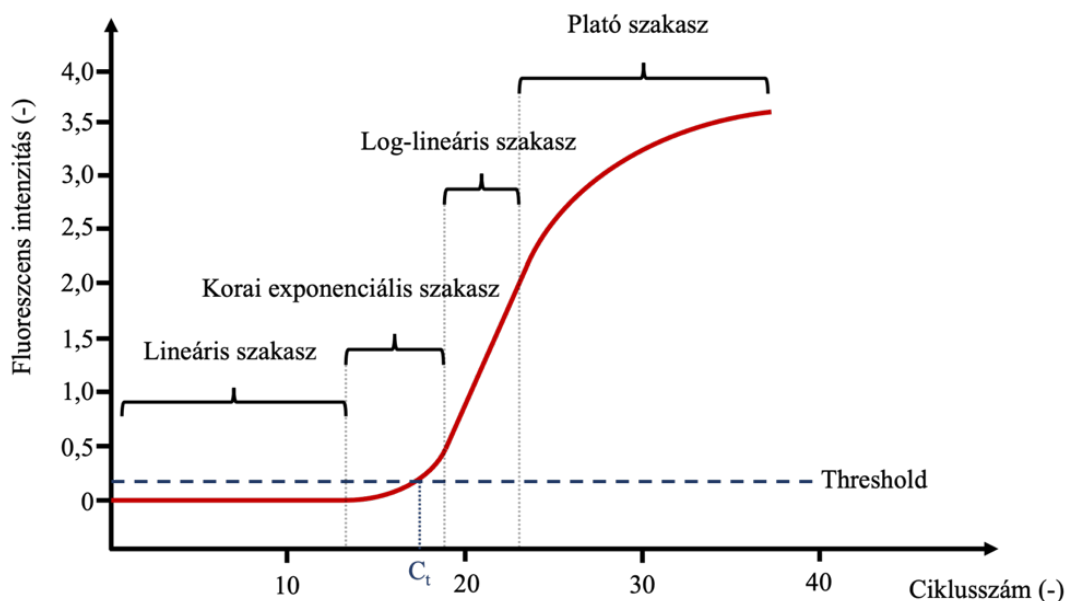
A polimeráz láncreakció (PCR) segítségével lehetséges egy tetszőleges szekvenciájú DNS fragmens felszaporítása egy ciklikus folyamat során, melynek minden lépésében a másolatok (amplikonok) száma közel megkétszereződik [1]. A PCR reakció során DNS függő DNS polimeráz enzim segítségével sokszorosítjuk fel az adott DNS szakaszt. Minden esetben szükséges a PCR reakcióhoz a vizsgálandó egy-, vagy kétszálú DNS fragmens, hőstabil DNS függő DNS polimeráz (általában Taq polimeráz), oligonukleotid primerek (forward és reverz primer), dezoxiribo-nukleotid-trifoszfát molekulák (dNTP-k), valamint a magnézium iont tartalmazó és megfelelő pH-t biztosító puffer [1]. A módszer kvantitatív analitikai vagy diagnosztikai célú felhasználása esetén a polimeráz láncreakciót valós időben kell követnünk, amelyhez olyan fluoreszcens kémiai festékeket és próbákat kell alkalmaznunk, amelyek fluoreszcens jele a keletkező termékek mennyiségével arányos [2]. A qPCR módszer alkalmas RNS szint meghatározására is, melyhez szükséges a mérendő RNS átírása komplementer DNS-sé (cDNS). Ebben az esetben a technikát reverz transzkripcióval kapcsolt qPCR módszernek (RT-qPCR) nevezzük. Az átírás történhet a polimeráz reakcióval egy lépésben, valamint két lépésben is [3]. A láncreakciót egy ciklikus hőmérsékletprofil segítségével vezetjük (1. ábra). A kettősszálú DNS elválasztásához magas hőmérsékletre kell hevíteni a mintát, ezt követően alacsonyabb hőmérsékletre hűtve lehetségessé válik a primerek kitapadása, végül kissé emelve a hőmérsékletet a polimeráz működéséhez optimális értéket kell tartani. Ezt követően ismétlődik a ciklus.

A denaturáció során, általában 95°C-on, a DNS szálak közötti hidrogén kötések felszakadnak az alkalmazott magas hőmérséklet hatására [1]. Ezt követően az anelláció során a hőmérsékletet csökkentjük 55-70 °C közé, ekkor a primerek a kijelölt szekvenciához tapadnak. Általában az anellációs hőmérséklet néhány fokkal a két primer olvadáspontja alatt van. Célszerű a primerek tervezésénél figyelembe venni, hogy olvadáspontjuk közel azonos legyen. Az elongációt a legtöbb esetben a Taq polimeráz optimális hőmérsékletén, 72 °C-on hajtjuk végre. Ha a templát önmagával komplementer szakaszokat tartalmaz, stabil hajtű szerkezetet képez, amely szintén gátolhatja a polimerázt. A primerek tervezése során is nagy hangsúlyt kell fektetni azok 3' végein a komplementaritás elkerülésére, amennyiben fellép, primer dimerek keletkeznek, amelyek nem kívánt PCR terméket eredményeznek [1].



1. ábra A PCR reakció lépései a hozzájuk tartozó hőmérséklet értékekkel

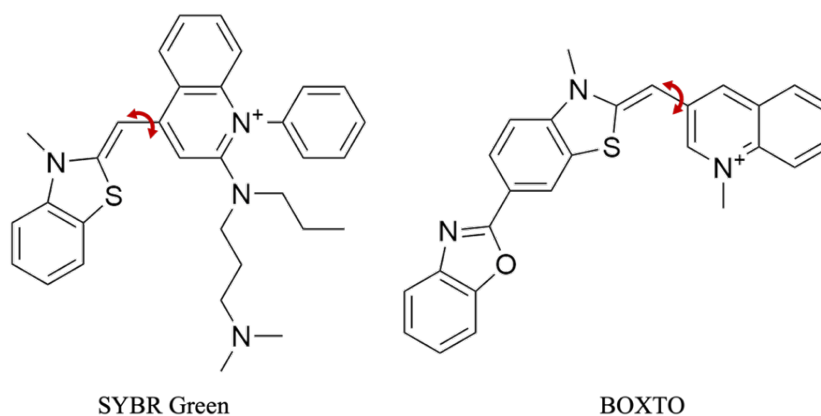
A qPCR reakció során a készülék minden ciklus után detektálja a fluoreszcens emissziót, melyet a ciklusszám függvényében ábrázolva megkapjuk az amplifikációs görbét (2. ábra). A reakció dinamikáját az amplifikációs görbe alapján négy részre oszthatjuk [4]. Az első, lineáris szakasz során a láncreakció éppen csak elkezdődik, ekkor a fluoreszcens jel nem haladja meg a háttérzaj szintjét. A második, korai exponenciális szakasz során a fluoreszcens jelintenzitás nagymértékű növekedése figyelhető meg, ennek során nem csak eléri, hanem meg is haladja a küszöbértéket (threshold). A ciklusszámot, ahol ez bekövetkezik C_t -vel (threshold cycle) jelöli az irodalom [5], [6]. Minél alacsonyabb a C_t érték, annál magasabb az adott target mennyisége a mintában [5]. A harmadik, log-lineáris szakaszban ideális körülmények mellett az amplitonok száma ciklusról ciklusra megkétszereződik, a fluoreszcens jelintenzitással együtt. Végül a negyedik, plató szakaszban a láncreakció dinamikája lelassul, limitáló komponense elfogy, így a fluoreszcens jel már nem alkalmazható kvantitatív analízisre [7].



2. ábra Az amplifikációs görbe és szakasza

4.2 Az interkalálódó fluoreszcens festékek jellemzése

A qPCR mérések során a keletkező amplikonok mennyiségét közvetetten, fluoreszcens festékek és próbák segítségével tudjuk követni. Az interkalálódó fluoreszcens festékek a DNS kettősszállal kölcsönhatásba lépnek. Napjainkban az aszimmetrikus cianinok a leggyakrabban alkalmazott festékek, mint például a SYBR Green és BOXTO (3. ábra). Szerkezetüket tekintve két nitrogént tartalmazó aromás rendszerük van, amelyeket metin-híd köt össze, és az egyik nitrogén pozitív töltést hordoz. Szabad állapotban nincs fluoreszcenciájuk, mivel az aromás csoportok hőmozgássá alakítják az emittálható energiát, azonban a DNS kis árkába kötve a metin-híd körüli forgás korlátozódik, a cianin pedig fluoreszcens fényt bocsát ki [8]. Mivel az interkalálódó fluoreszcens festékek minden kétszálú DNS termékhez kötődnek, aspecifikus PCR termékek esetén fals pozitív eredményhez vezetnek. Emellett az reakcióelegyben található primer dimereket is érzékelik. Ezért a PCR befejezését követően lehetőségünk van olvadásgörbe analízist végezni, hogy lássuk, specifikus termék keletkezett-e a reakció során [9].



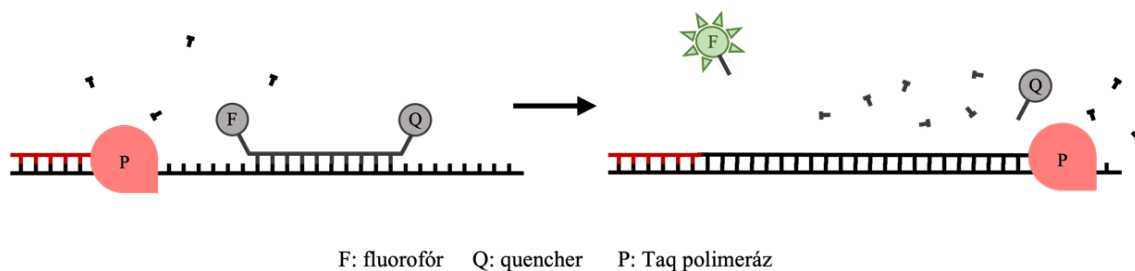
3. ábra A qPCR reakció során alkalmazott néhány interkalálódó fluoreszcens festék szerkezete

4.3 Fluoreszcens próbák

A fluoreszcens próbák elsősorban abban különböznek a fluoreszcens festékektől, hogy nagyfokú szekvencia specificitással rendelkeznek. Emiatt ezek leggyakrabban nukleinsav, peptidnukleinsav [10], vagy zárt nukleinsav származékok [11]. A fluoreszcens próbák olyan fluorofór csoporttal rendelkeznek, amely eredendően erős fluoreszcens jel képzésére képes, valamint tartalmaznak egy elnyelő (quencher) csoportot is, amely a Förster-féle energiatranszfer (Förster resonance energy transfer, FRET) jelenségét kiaknázva drasztikusan csökkenti a fluorofór csoport emisszióját, amíg sztérikusan kellően közel helyezkedik el [12]. Közéjük tartoznak többek között a hidrolízis próbák, vagy kedveltebb nevükön Taqman próbák, a hibridizációs próbák [13], valamint a molekuláris fáklyák (molecular beacon próbák) [14]. A fluoreszcens próbákat széles körben alkalmazzák a diagnosztikában, hiszen specifikusságuknak köszönhetően egy multiplex reakcióban egyidejűleg több target mérését teszik lehetővé.

4.3.1 Hidrolízis próbák

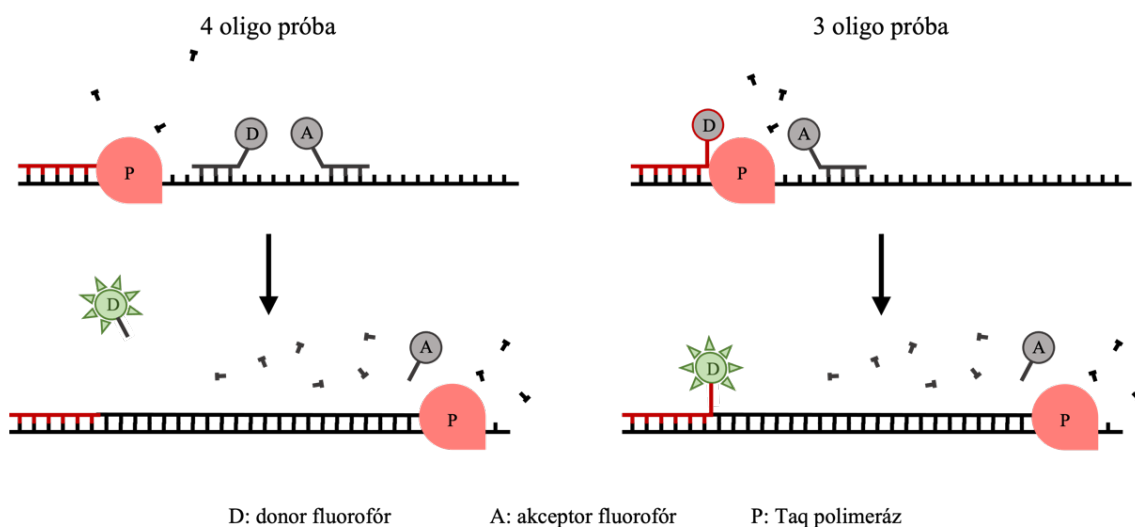
A hidrolízis próbák rendelkeznek egy szekvencia-specifikus oligonukleotid egységgel, amelynek 5' végén egy fluorofór, 3' végén pedig egy quencher csoport található (4. ábra) [15]. A quencher a FRET révén csökkenti a próba fluoreszcens emisszióját. A PCR ciklusban az anelláció során a hidrolízis próbák kitapadnak a DNS szálon. A DNS polimeráz 5' endonukleáz aktivitása révén a próbát lebontja, így a fluorofór és a quencher csoport távol kerül, ezzel megnövelve a fluoreszcens emissziót [15].



4. ábra A hidrolízis próbák felépítése

4.3.2 Hibridizációs próbák

A hibridizációs próbák egyenként donor és akceptor fluorofórral jelölt oligonukleotidok [16]. Létezik négy és három oligonukleotidból álló próba is (5. ábra). Előbbi két PCR primert és két próba szekvenciát tartalmaz, melyek hibridizáció során egymás mellett tapadnak ki [3]. Az utóbbi felépítése nagyon hasonló, azonban ebben az esetben a forward primer 3' végén található az akceptor fluorofór és a tőle 5 bázison belül tapadó próba 5' végén a donor fluorofór [3]. Bár a multiplex hibridizációs próbák ígéretesnek hangzanak, hatékony működésükhöz hosszú optimalizálás szükséges [17].

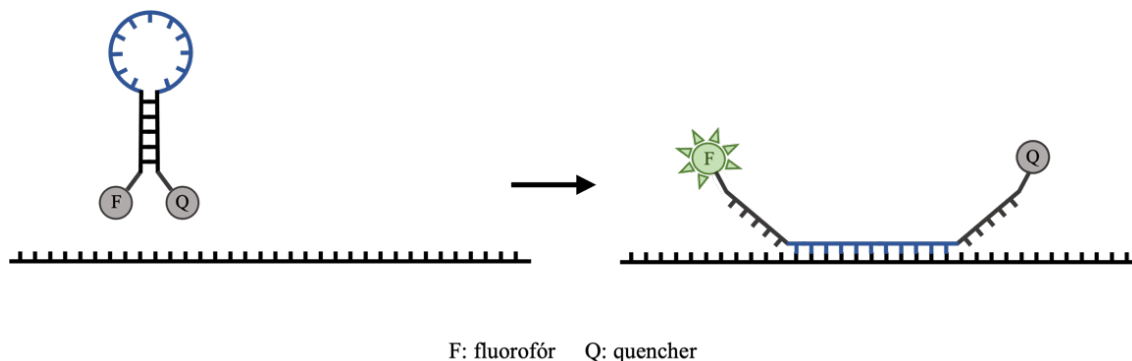


5. ábra A hibridizációs próbák felépítése

4.3.3 Molecular Beacon próbák

A molecular beacon próbák egy hajtű alakú oligonukleotid gerincet tartalmaznak, amelynek 3' és 5' végén helyezkedik el a fluorofór és a quencher csoport (6. ábra). A molekula hurok régiójában helyezkedik el a felismerésért felelős szekvencia. A PCR ciklus során a próba olvadáspontja felett, hajtű alakban, a quencher és a fluorofór elég közel helyezkednek el, így a FRET révén minimális a fluoreszcens emisszió. Az anellációs lépés során a próba specifikusan

kötődik a DNS szálhoz, a quencher és a fluorofór eltávolodnak egymástól és megemelkedik az emisszió [3]. A hajtú próbák nagyobb specificitással rendelkeznek, mint a lineáris próbák, mivel a DNS-sel stabilabb komplexet képeznek, mely fedezi a hajtú forma felbontásának energiaszükségletét is [18].



6. ábra Molecular beacon felépítése és működése

4.4 Génexpresszió vizsgálata

Génexpressziós mérések során az elsődleges információforrást a sejtekben található messenger RNS molekulák (mRNS) jelentik. Karakterisztikus, de jellemzően elenyésző mennyiségben jelen lévő biomolekulák révén vizsgálatukra kiváló mérési módszernek bizonyul a PCR, azonban nehézséget jelent, hogy a polimeráz láncreakcióban az enzim csak DNS molekulák amplifikálására képes. Ezért RNS minták mérése esetén minden esetben szükséges egy reverz transzkripció lépés (RT) beiktatása, amely során az RNS-t cDNS-sé írják át.

4.4.1 Reverz transzkripció

A reverz transzkripció lépés kritikus a szenzitivitás és reprodukálhatóság szempontjából, amit az is alátámaszt, hogy az RT reakció és a PCR reprodukálhatóságának összehasonlításánál az RT reakciók okozták a legnagyobb eltéréseket az mRNS szintek meghatározása során [19]. Ez aggasztó lehet, azonban azonos reakciókörülményeket követve biztosítható a megfelelő ismételhetőség [1, 32]. Az RT reakciót egy reverz transzkriptáz fehérje végzi, ami ugyan primer nélkül is képes DNS kópiák készítésére, de hatékonyságát nagyban növeli oligonukleotid hozzáadása [19]. Háromféle primer alkalmazásával végezhető a reverz transzkripció, ezek az oligo(dT), a random szekvenciájú és a speciális szekvenciájú primerek [1].

Az oligo(dT) primerek célszekvenciája az érett eukarióta mRNS-ek 3' végén megtalálható poliA farok. Génexpressziós mérések során azonban nem minden esetben a legelőnyösebb. Amennyiben sérült az mRNS vagy leszakad az mRNS-ről a poliA farok, nem fog a szekvencia átíródni. A prokarióta RNS-ekre nem is jellemző a poliA szekvencia, illetve eukarióta riboszomális, transzfer RNS-ek (rRNS, tRNS), valamint hisztongének sem tartalmazzák, így ezek átírása sem megtörténik meg az adott módszerrel. Előnyös azonban, hogy a poliA célszekvencia nem képes másodrendű szerkezet felvételére, ezért az oligo(dT) primer hatékonyabb és hőmérséklettől kevésbé függő reverz transzkripciót tesz lehetővé [1].

Random szekvenciájú primerek leggyakrabban hat vagy kilenc nukleotid hosszúak (random hexamer és random nonamer). Mivel teljesen véletlenszerű bázissorrenddel rendelkeznek, bármilyen RNS-sel képesek hibridizálni. Használatukkal az RT reakció során mind az rRNS-ek és tRNS-ek, mind pedig az mRNS-ek átíródnak. Éppen ezért kiváló választás prokarióták mRNS szintjének méréséhez, vagy abban az esetben, ha rRNS-eket szeretnénk alkalmazni referenciaként. A random nonamerek stabilabban kötődnek az RNS-hez, emiatt magasabb hőmérsékletű PCR protokollok esetén előnyösek. Mivel a primerek viszonylag rövidek és szekvenciájuk teljesen véletlenszerű, hosszabb mRNS-ek több helyen is elkezdhetnek átíródni, ami előnyös a részben degradálódott minták esetén.

Speciális szekvenciájú primerek használata leginkább kisszámú RNS célzott mérése során ajánlott. A specifikus szekvencia hibridizációját az RNS másodlagos és harmadlagos szerkezete is nehezíti, illetve a minta nem megfelelő tisztítása esetén a célszekvencia hozzáférhetőségét az egyes RNS-hez kötődő fehérjék is akadályozhatják, éppen ezért magasabb hőmérsékleten szoktak velük dolgozni. A megfelelő szekvencia nehezen prediktálható és általában nem érhető el vele nagyobb hatékonyság, mint az oligo(dT), vagy random szekvenciák alkalmazása esetén. Előnye azonban, hogy az amplikon szekvencia elé tervezve nem csak RT primerként, hanem PCR reverz primerként is használható, így egyszerűsítve az egylépéses módszer tervezését [1].

4.4.2 Abszolút és relatív kvantifikáció

A génexpressziós mérések eredményeinek számszerűsítése történhet abszolút és relatív kvantifikációval, amelyek helyes alkalmazása lehetővé teszi különböző mérések eredményeinek összehasonlítását. Abszolút mennyiségi meghatározás esetén ismert koncentrációjú standard oldatból készített hígítási sor segít lineáris összefüggést teremteni a C_t értékek és a minta teljes RNS vagy cDNS tartalma között [5]. A létrehozott kalibrációs görbe segítségével már lehetséges ismeretlen koncentrációjú oldat nukleinsav tartalmát meghatározni.

A módszer hátránya, hogy a mérendő koncentrációnak a kalibrációs görbe határain belül kell esnie, illetve, hogy a módszer feltételezi az azonos amplifikációs hatékonyságot a vizsgált minták mérése során [20]. Relatív mennyiségi meghatározás esetén a mért génexpressziós szinteket vagy egy külső standardhez, vagy pedig egy belső referenciaértékhez viszonyítva értelmezik, éppen ezért az eredményeket a mért érték és a referenciaérték hányadosaként értékelik [3]. A leírt normalizálás a biológiai minták heterogenitásából származó mérési nehézségeket egyszerűsíti.

4.4.3 Belső standardek

Több lehetőség is kínálkozik a referenciaérték kiválasztásakor. Lehetséges teljes RNS mennyiségre, rRNS-re, külsőleg hozzáadott RNS-re vagy belső referencia génre normalizálni [3]. Belső standardként alkalmazható a riboszómális RNS állomány, amely a sejt teljes RNS mennyiségének a 85-90%-át teszi ki [7]. Ezen belül is kedvelt target a 18S rRNS [21], amely a citoplazmatikus riboszómák 40S alegységének aktív centrumánál található. Funkciójuk esszenciális az eukarióta sejtekben [22]. Szintézisüket az mRNS-ektől független polimeráz (RNS polimeráz I) végzi [23], ezért szintjét kevésbé befolyásolják az mRNS-ekre ható ingerek. Patkánymáj sejtekkel [24], valamint humán rosszindulatú daganatos sejtvonallal [25] végzett kísérletekben a referenciagénénél stabilabb referenciának bizonyult. Használatát korlátozza, hogy biológiai faktorok és gyógyszerek hatással lehetnek az rRNS transzkripcióra [26], ami megnehezíti különböző forrásból származó minták rRNS mennyiségének összehasonlítását [7]. További hátrányt jelent, hogy mRNS-t dúsító primer technikák mellett nem használható belső standardnek, megfelelő primerek alkalmazása esetén azonban a rRNS-ek sokkal nagyobb mennyiségben íródnak át, mint az mRNS-ek, ami szintén nem kedvez a kvantifikáció során [7]. Bár használhatók az expressziós adatok normalizálására, de ebben az esetben a kiértékelés nem tartalmazza az enzimatis reakciók hatékonyságát [21]. Lehetséges továbbá teljes RNS mennyiséghez viszonyítani a mért mRNS szinteket. Ebben az esetben a minta teljes RNS tartalmát spektrofotometriás méréssel állapítják meg. Mivel a teljes RNS mennyiség legnagyobb része rRNS, ezért a korábban említett fenntartások itt is érvényesek maradnak. A módszer alkalmazása esetén kritikus fontosságú a teljes RNS mennyiség precíz mérése, amit a minta szabad nukleotid, DNS és fehérjetartalma is megzavarhat [7]. Általánosan elmondható, hogy a kísérleti körülményekhez kell igazítani, milyen referencia értéket kell használni az adott elrendezésben, azonban jól látható az is, hogy hatalmas szükség van stabil referenciagénnek azonosítására.

4.5 A referenciagének jellemzése

A qPCR technikával nyert adatok kiértékelése a módszer rendkívüli érzékenysége és a biológiai minták heterogenitása miatt kihívást jelent. A problémára megoldást nyújt, ha az eredményeket belső referenciaértékre normáljuk, így a kapott értékek már összehasonlíthatóak. Biológiai rendszer esetén cél endogén referencia keresése, amely a mintaelőkészítés és mérés minden pontján azonos külső hatásoknak van kitéve, illetve független a bemérések hibáitól. Referenciagének esetén a használt standard és mérendő komponens fizikai, kémiai hasonlósága és biokompatibilitása is megvalósul.

Alapvető elvárás a referenciagénekkel szemben, hogy az adott kísérleti elrendezés esetén expressziójuk állandó legyen. Továbbá fontos, hogy transzkripciójukat ne befolyásolják különböző kísérleti körülmények [21]. Könnyen belátható az említett kritériumok szükségessége, ennek ellenére több, a szakirodalomban gyakran használt gén esetén nem teljesülnek a feltételek [27], [28]. Univerzálisan referenciagének keresését nehezíti, hogy nem használnak egységes protokollt a mérések során, valamint, hogy a legstabilabb gén kiválasztásakor nem használhatunk semmilyen referenciagént, hanem a nyert expressziós adatok összehasonlítását végző algoritmusra kell támaszkodnunk [21]. A következőkben néhány gyakran alkalmazott referenciagént mutatok be.

A *GAPDH* egyike a leggyakrabban alkalmazott referenciagéneknek, amely kiemelt szerepet játszik a metabolikus folyamatokban. Az általa kódolt fehérje funkciója univerzális, minden élőlény rendelkezik *GAPDH* fehérje (glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz) aktivitással [29]. Emellett humán szöveteken végzett génexpressziós mérések 15-szörös kópiaszám különbséget is kimutattak már a *GAPDH* esetében [28], amely elterjedt alkalmazását kérdésessé teszi.

Az *ACTB* feladata a β -aktin kifejezése. Az aktin a sejtben legnagyobb mennyiségben előforduló fehérje, a citoskeleton fenntartásáért és a sejtmozgásért felelős. A β és γ izoforma minden sejtben megtalálható. Több, a sejt fennmaradásához szükséges fehérjével (mint *GAPDH*, tubulin, ubikvitin) együtt konstitutív módon expresszálódik [30].

Az *RPL30* a 60S riboszomális alegységet kódolja, amely egy citoplazmás fehérje. A riboszomális fehérjék (RP) feladata a riboszóma felépítése, ezért alapvető szerepük van a transzláció folyamatában [31]. A riboszomális fehérjék számos folyamatban részt vesznek, expressziós mintázatuk egyes szövetekben egyedi, és némelyik kifejeződése rákos folyamatokban megváltozik [32]. Ennek ellenére már több esetben is azonosították az *RPL30* gént, mint megfelelő stabilitással rendelkező referenciagén humán szövetekben [33].

A *TBP* a TATA-kötő fehérje kódolásáért felelős. A TATA-kötő fehérje (TBP) elengedhetetlen eukarióta sejtekben a transzkripció elindításához. A TBP fehérjét univerzális transzkripciós faktornak tekintik, mindhárom nukleáris RNS polimeráz iniciációjához szükséges [34]. Esszenciális szerepe alapján megfelelő referenciagén jelölt. Rákos vastagbélsejtek esetén már bizonyították, hogy stabilabb expresszióval rendelkezik több, gyakran használt referenciával szemben [35].

A *CNOT4* a CCR4-NOT transzkripciós komplex negyedik alegységét kódolja. A CCR4-NOT egy kilenc alegységből álló fehérje komplex, szekvenciája és funkciója is erősen konzervált az eukarióta világban. A transzkripció szabályozása mellett fontos szerepet játszik az mRNS-ek lebontásában és minőségük ellenőrzésében, az RNS exportban, a translációs represszióban és fehérjék ubikvitinálásában is [36]. Kutatócsoportunk az irodalomban először mutatott rá a *CNOT4* referenciagénként való alkalmazhatóságára 20 humán sejtvonalat vizsgálva [37]. Újabb kutatások szerint gyakran használt referenciagénekkel összehasonlítva a *CNOT4* jobb referenciának bizonyult tüdőrákos minták vizsgálatakor [38].

Az *SNWI* egy spliceszozómában megtalálható komponens, amely a sejtciklus ellenőrző pontjain fontos fehérjék mRNS érését szabályozza, emellett társszabályozó több transzkripciós faktor csendesítésében és aktiválásában [39]. A kutatócsoport korábbi munkája során az *SNWI*-et megfelelően stabil referenciagénként azonosította 13 humán rákos és 7 normál sejtvonal expressziós adatainak összehasonlítása során [37].

4.6 Referenciagének azonosítása

Bár a referenciagénekkel kapcsolatban alapvető elvárás, hogy a kísérleti körülmények hatása ellenére változatlan expresszióval rendelkezzenek, a gyakorlatban mindig megfigyelhető valamekkora ingadozás – variancia – a C_t értékekben [21]. A megoldás kulcsa a legstabilabb expresszióval rendelkező gén kiválasztása, vagy az átlagtól legkisebb eltérést mutató gén megtalálása [40]. Referenciagének azonosítása esetén nem rendelkezünk semmilyen referenciaértékkel, ezért a vizsgált gének expressziós adatainak egymással történő összevetésével kell megtalálni a legstabilabbat. Ezért ezekben az esetekben különösen fontos az RT-qPCR módszer alapos optimalizálása, hogy a mért különbségek ne a mérési körülmények nem megfelelőségéből adódjanak. Az optimalizáláshoz elengedhetetlen a specifikus primerpárok használata, az anellációs hőmérséklet optimalizálása, az RT, illetve a PCR reakció lineáris dinamikus tartományának meghatározása és a PCR hatásfok értékek meghatározása és alkalmazása a kiértékelés során [41].

Az RT-qPCR mérési adatok elvégzésére több kiértékelő algoritmust is kifejlesztettek, amelyek alkalmasak több génen végzett mérések eredményei alapján jellemezni egy adott gén stabilitását, illetve sorba rendezni a vizsgált géneket [21]. Ilyen eszköz például az online elérhető RefFinder, mely tartalmazza a leggyakrabban használt algoritmusokat, azonban az ily módon végzett kiértékelések során a PCR hatásfok értékeket nem lehet figyelembe venni [42].

4.6.1 BestKeeper

A BestKeeper szoftver a génexpresszió stabilitásának értékelésére két módszert alkalmaz. Először minden gén esetében meghatároz egy leíró statisztikát, amely tartalmazza az adatok szórását, majd meghatározza a C_t értékek mértani átlagát. Ezt követően a mértani átlag és az egyes referenciagének közötti korreláció kerül kiszámításra. A stabil gének alacsony stabilitási értékkel rendelkeznek, amelyekre alacsony szórás, illetve a mértani átlaggal való erős korreláció jellemző [43]. A RefFinder online eszközön keresztül elérhető BestKeeper módszer esetében a referenciagének rangsorolása többnyire a szórásértékek analízisén alapul [44].

4.6.2 NormFinder

A NormFinder algoritmus lineáris statisztikai modellt használ a referenciagének változásainak és a vizsgált gének expressziós értékeinek csoporton belüli és csoportok közötti varianciáinak becslésére. Az algoritmus egy számított stabilitási értéket rendel a referenciagénekhez. Az alacsony stabilitási értékkel rendelkező gének csoporton belüli varianciája kisebb, ezért a felállított rangsorban magasabb helyre kerülnek [45].

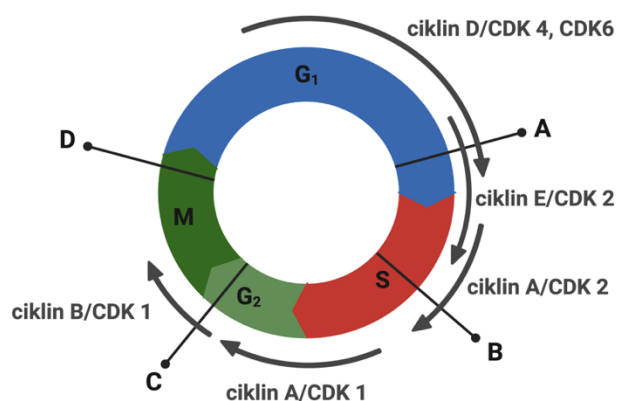
4.6.3 Összehasonlító ΔC_t módszer

A módszer a gének C_t értékeinek felhasználásával dolgozik. A technikai párhuzamos mérések adatait átlagolva egyesíti. Az egyes génekre vonatkozó átlagolt expressziós adatokból páronként különbséget képez, és egy adott génhez tartozó különbségek szórása alapján állítja fel a stabilitási rangsorát. A számításokat elvégezve a legkisebb szórást mutató gének expressziója a legstabilabb [45].

4.7 A sejtciklus jellemzése

Sejtciklusnak nevezzük azt a folyamatot, amely során a sejtben található örökítőanyag megkétszereződik, majd a sejt két utódsejtet hoz létre. Egy átlagos eukarióta sejtben négy részre oszthatjuk a sejtciklust, G₁ (gap 1), S (szintézis), G₂ (gap 2) és M (mitózis) fázisokra (7. ábra), valamint az M fázist további hat szakaszra oszthatjuk: profázis, prometafázis, metafázis, anafázis, telofázis és citokinézis. A sejtek G₁ fázisban felkészülnek a szintézisre, míg az S fázis során történik a DNS replikáció. Ezt követően a G₂ fázisban a sejtek felkészülnek az osztódásra, majd az M fázisban a kromatinállomány szegregációja történik az utódsejtekbe. Környezeti vagy fejlődési faktoroktól függően a G₁ fázisban lévő sejtek átmenetileg vagy véglegesen elhagyhatják a sejtciklust G₀ fázisba lépve, amely egy nyugalmi állapot [46].

A folyamat komplex, irányításában számos fehérje, endogén és exogén szabályozó faktor vesz részt. A sejtciklus legfontosabb endogén szabályozói a heterodimer komplexet képző ciklinek és ciklin dependens kinázok (CDK). A heterodimer tartalmaz egy katalitikus szerin/treonin kináz egységet, ezek a CDK-k, valamint egy regulátor egységet, ezek a ciklinek, amelyek a katalitikus egység aktivitását tízezerszeresre képesek növelni [47]. Azért, hogy a sejtciklus végén két teljesen ép utódsejt keletkezzen, a ciklus számos ellenőrző pontot tartalmaz, melyek feladata a DNS károsodások vagy a rosszul rendeződött kromoszómák felismerése, és a hibák elhárításáig a sejtciklus leállítása (7. ábra) [48].



- A: DNS károsodás (G₁-blokk)
- B: Hibásan replikálódott DNS (S-blokk)
- C: Replikálatlan, károsodott DNS (G₂-blokk)
- D: Abnormális mikrotubulus kötődés (M-blokk)

7. ábra A sejtciklus fázisai, a bennük található ellenőrzési pontokkal

Az első ellenőrző pont a G1 fázisban található G1-blokk, mely során a sejtbeli hibajavító folyamatok mennek végbe, annak érdekében, hogy a DNS szintézis hiba nélkül kezdődhessen meg. Az S-blokk, amely az S fázisban található, a DNS replikáció teljes végbemeneteléért felelős. A G2-blokk feladata a mitózis megkezdésének megakadályozása, amennyiben sérült a DNS. Az M fázis ellenőrző pontja során (M-blokk) a kromoszómák középsíkba rendeződésének ellenőrzése történik.

4.8 Sejtek szinkronizálása

A legtöbb sejtszintű esemény, mint a DNS replikáció, a transzkripció, a transzláció, illetve a fehérjék poszttranszlációs módosítása függ a sejtciklustól, éppen ezért ezeknek a folyamatoknak a vizsgálatához azonos fázisban lévő sejtpopulációra van szükség. A sejtek szinkronizálása többféleképpen lehetséges, például kémiai inhibitor használatával, szérum éheztetéssel, kontakt inhibícióval, valamint dupla timidin blokk alkalmazásával [49]. Kolhicinnel befolyásolható a mikrotubulusok polimerizációs-depolimerizációs egyensúlya az osztódás során, míg 5-fluorodezoxiuridinnel a replikáció gátolható reverzibilisen. A RO-3306 egy szelektív CDK1 inhibitor, a sejteket G2 és M fázis határán szinkronizálja [50], míg a dupla timidin blokk során pedig a DNS szintézis gátlásával tudjuk G1/S átmenetben szinkronizálni a sejteket [51]. Széruméheztetés esetén megfosztjuk a sejteket a növekedési faktoroktól, ezért egy idő után G0 fázisba kerülnek. Friss tápoldat adásával vagy az inhibitorok lemosásával elérhetjük, hogy a sejtek azonos pontból, szinkronizálva kezdjék újra a sejtciklusukat. Kontakt inhibíció esetén a sejtek növekedése és osztódása lelassul, amikor azok egymással érintkeznek, majd passzálassal lehetséges a sejteket G1 fázisból egyszerre elindítani a sejtciklusban. A különböző szinkronizálási technikák sosem eredményezik a teljes sejtpopuláció egyetlen fázisban történő dúsítását, mivel a kiindulási populáció heterogén, ezért bizonyos sejtek később kerülnek az adott fázisba, illetve felengedéskor sem egyszerre kerülnek újra ciklusba.

A szinkronizálás sikerességét áramlási citometriás méréssel ellenőrizhetjük. A módszer alapelve, hogy egy kapillárisban a sejteket lézerrel világítjuk meg, melyek egyesével haladnak át a detektor előtt. Így az egyes sejtek morfológiájáról, fiziológiájáról, illetve fluoreszcens, vagy antitestes jelölés esetén felszíni, vagy intracelluláris fehérje expressziójáról nyerünk információt. Ezt követően a kapillárisból kilépő közeget nagy sebességgel porlasztják, hogy minden folyadékcseppben egyetlen sejt helyezkedjen el. A töltött cseppeket ezt követően elektromos térben szétválasztják. A sejtek töltésüket a lézeres besugárzás során szerzik, amely függ azok fluoreszcenciájától. A módszerrel akár 100%-os tisztaságú sejtfrakciók is nyerhetők [52].

5 Kísérletek és módszerek

5.1 Sejtfenntartás

Kutatómunkám során a kísérleteket MOLT4 és U937 sejtvonalakon végeztük, amelyek szuszpenziós, humán rákos sejtvonalak. Mivel az eukarióta sejtek különösen érzékenyek a környezetükre és a fertőzésekre, ezért a velük történő munka nagyfokú körültekintést és sterilitást igényelt. A sejteket RPMI-1640 médiumban tartottuk fenn, amelyet 10% foetális borjú szérummal (FBS) egészítettünk ki, amely a növekedéshez szükséges faktorokat tartalmazta, illetve 1% penicillin-sztreptomycin (PS) antibiotikum keverékkel a fertőzések ellen. A sejteket inkubátorban 37 °C-on, 5% CO₂ tartalom mellett tartottuk fenn. A fenntartás során szükséges műveleteket, mint a passzálást vagy a médium cseréjét steril fülkében végeztük.

5.2 Sejtek szinkronizálása

A sejtciklusfüggő mRNS expressziós szintek vizsgálatához a fenttartott sejtvonalakból származó sejteket egy adott fázisban fel kellett dúsítani. A szinkronizálást RO-3306 reagenssel végeztük, amely CDK1 inhibitor révén a sejtciklust G2/M fázis határán blokkolja. Mind a két sejtvonal esetén 27-27 millió sejtet helyeztünk 6 lyukú tálcákra. Sejtvonalanként összesen 27 mintát kellett előkészítenünk, amely elegendő volt 9 időpontban 3 biológiai párhuzamos minta legyűjtésére. A sejteket a 6 lyukú tálcán RO-3306 reagenssel kezeltük, 10 µM végkoncentrációban, 20 órán keresztül. A sejteket ezt követően felengedtük, majd 2 milliónként T25 flasksba helyeztük. A sejteket adott időpontokban a T25 flasksból gyűjtöttük.

5.3 Minta legyűjtés

A sejtciklus különböző fázisainak vizsgálatához a szinkronizált sejtekből felengedés után adott időközönként vettünk mintát. Mivel a két sejtvonal generációs ideje eltérő, ezért a legyűjtési műveleteket eltérő időben végeztük el. A MOLT4 sejtek esetén a teljes sejtciklus közel 32 óra alatt zajlik le. A mintákat 9 időpontban gyűjtöttük, a felengedés után közvetlenül a 0 órás mintát, majd azt követően a többi mintát 4 óránként. Az U937 sejtek generációs ideje kb. 16 óra, ezért ebben az esetben a 0 órás mintát követően 2 óránként gyűjtöttünk mintákat, ebben az esetben is összesen 9 alkalommal. A legyűjtés ütemezésén kívül a minták kezelése teljes mértékben megegyezett mindkét sejtvonal esetén.

A 20 órás RO-3306 kezelést követően a sejteket centrifugáltuk 1800 rpm-en 5 percig. Az összegyűjtött sejtekről ezután eltávolítottuk a reagenst, és foszfáttal pufferált sóoldattal (PBS) mostuk. Ismét centrifugáltuk a sejteket 1800 rpm-en 5 percig, majd friss médiumban felfuszpendáltuk és 2 milliónként T25-ös flaskákba osztottuk. Ezen a ponton gyűjtöttük le a 0 órás mintákat, illetve ehhez a ponthoz számítottuk a többi minta legyűjtésének időzítését is. A mintákat még a legyűjtés előtt 10 μ M EdU (5-etinil-2'-deoxiuridin) reagenssel kezeltük 20 percen keresztül a sejtciklus analízishez. Ezt követően a sejteket 1800 rpm-en 4 percig centrifugáltuk, majd 1 ml PBS-sel mostuk. A sejtszuszpenziót két részre osztottuk, felét qPCR, felét pedig FACS analízisre.

5.4 FACS minták kezelése

A legyűjtés során kettéosztott minták egyik felét FACS vizsgálatra készítettük elő, amelyhez a Thermo Fisher Click-iT EdU Cell Cycle Kit-et használtuk. A PBS-sel mosott és centrifugált sejtekről eltávolítottuk a folyadékot, majd ismételtelen mostuk a mintákat 1% BSA-t tartalmazó PBS oldattal. A felfuszpendált mintákat 2000 rpm-en 4 percig centrifugáltuk, majd 100 μ l 4%-os paraformaldehid oldattal (PFA) fixáltuk. A fixálást szobahőmérsékleten, 15 percen keresztül, fénytől védett helyen végeztük. Miután letelt a fixáláshoz szükséges idő, a sejteket 2000 rpm-en 4 percig centrifugáltuk, majd 1 ml 1% BSA-t tartalmazó PBS oldattal mostuk. A mintákat ebben a formában 4 °C-on tároltuk további felhasználásig. A felfuszpendált sejteket 2000 rpm-en 4 percig centrifugáltuk, eltávolítottuk róluk a folyadékot, majd 100 μ l szaponint tartalmazó reagensben felfuszpendáltuk és 15 percig szobahőmérsékleten, fénytől védett helyen inkubáltuk permeabilizálás céljából. A szaponint tartalmazó oldatot 1% BSA-t tartalmazó PBS-ben, 10x hígított formában alkalmaztuk. Ezt követően a mintákat 2000 rpm-en 4 percig centrifugáltuk. A sejtekről eltávolítottuk a folyadékot, és minden mintához 87,6 μ l PBS oldatot adtunk. A következő lépésekben nagyon fontos, hogy ne változtassuk meg a reagensek hozzáadásának sorrendjét. Először 2 μ l E reagenst adtunk a szuszpenzióhoz (réz védőcsoport), ezt követően 1 μ l 5 μ M koncentrációjú pikolil-azid oldatot, végül 10 μ l reakciópuffer oldatot. A mintákat 1 órán keresztül szobahőmérsékleten, fénytől védett helyen inkubáltuk, majd 2000 rpm-en 4 percig centrifugáltuk. Miután eltávolítottuk a folyadékot a sejtekről, 500 μ l 10 μ g/ml propidium-jodidot és 20 μ g/ml RNáz A enzimet tartalmazó PBS oldattal kezeltük a mintát 30 percig szobahőmérsékleten, fénytől védett helyen.

Ezt követően a HUN-REN Természettudományi Kutatóközpont, Molekuláris Sejtbiológiai Kutatócsoport tagjai, Dr. Szabó Edit, illetve Dr. Várady György segítségével végeztük el a minták vizsgálatát FACS alkalmazásával. A FACS analízist Attune NxT áramlási citométerrel (Thermo Fischer Scientific) végeztük. A kapott adatokat a készülékhez tartozó Attune NxT szoftverrel elemeztük.

5.5 RT-qPCR mérés

Az RT-qPCR analízishez a kutatócsoport által korábban alaposan optimalizált módszert használtam fel [37].

5.5.1 RNS izolálás

A legyűjtés során kettéosztott minták másik felét RT-qPCR vizsgálatra készítettem elő. Ehhez a PBS-sel mosott sejteket üveggyöngyöket, illetve 6 μ l β -merkaptotetanolt tartalmazó, 600 μ l RLT pufferben vortexeltem 1 percig. A mintákat -20 °C-on tároltam további felhasználásig. Ezt követően a mintákból RNS-t izoláltam RNeasy Plus Mini Kit (Quiagen) alkalmazásával. A legyűjtésből nyert mintát a genomi DNS-t kötni képes oszlopra pipettáztam, az oszlop alá 2 ml térfogatú gyűjtőcsövet helyeztem, majd 30 másodpercig centrifugáltam 10000 rpm-en. A centrifugálás során a folyadék, illetve az RNS molekulák átestek az oszlopon, míg a genomi DNS tartalom jelentős része megkötődött rajta. A centrifugálás végén az oszlopot eltávolítottam, az áteső folyadékhoz pedig 550 μ l 70%-os etanolt adtam, és elegyítettem. A folyadékot két lépésben egy oszlopra pipettáztam, amely alá 2 ml térfogatú gyűjtőcsövet helyeztem, majd 15 másodpercig 10000 rpm-en centrifugáltam. Az áteső folyadékot eltávolítottam. A minta RNS tartalma és vélhetően kis mennyiségű genomi DNS szennyezés ekkor az oszlopon maradt. Az oszlop alá visszahelyeztem a gyűjtőcsövet, majd 350 μ l RW1 pufferrel mostam. 15 másodpercig 10000 rpm-en centrifugáltam, majd az átesőt ismét eltávolítottam. A genomi DNS szennyezés eltávolítása érdekében a mintát az oszlopon DNáz oldattal kezeltem RNase-Free DNase Set (Quiagen) kit alkalmazásával. Az enzim a DNS molekulákat kis méretű fragmensekké emésztette, amelyeket már el lehetett távolítani az oszlopról, az RNS mellől. A DNáz oldat előkészítéséhez a liofilizált DNáz I enzimet 550 μ l RNáz mentes vízben oldottam fel. Mivel a DNáz enzim nagyon érzékeny a fizikai denaturációra, ezért nagyon óvatosan, vortex használata nélkül elegyítettem. Az megmaradt enzim oldatot -20 °C-on tároltam. A DNáz kezeléshez mintánként 10 μ l DNáz oldathoz és 70 μ l RDD puffert adtam, amely az enzim működéséhez minden szükséges faktort tartalmaz.

A folyadékokat elegyítettem, majd közvetlenül az oszlop membránjára mértem és szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltam. Az inkubációs idő leteltével az oszlopot mostam 350 µl RW1 pufferrel, majd 15 másodpercig 10000 rpm-en centrifugáltam. A gyűjtőcsövet óvatosan eltávolítottam, anélkül, hogy az oszloppal érintkezett volna, kiöntöttem belőle a folyadékot, a peremükön maradt cseppeket pedig szűrőpapírral itattam le. A megtisztított gyűjtőcsőbe visszahelyeztem az oszlopot, majd 500 µl etanollal kiegészített RPE pufferrel mostam, végül 15 másodpercig 10000 rpm-en centrifugáltam. Az átesőt ismét óvatosan eltávolítottam, és a mosási lépést megismételtem. Az RNS eluálása előtt új, tiszta gyűjtőcsövet helyeztem az oszlop alá, majd az oszlopot 3 percig, 16000 rpm-en centrifugáltam, hogy a maradék etanol teljesen elpárologjon. Az oszlopot ezután áthelyeztem egy új 1,5 ml térfogatú Eppendorf csőbe, és 50 µl RNáz mentes vizet közvetlenül az oszlop membránjára mértem. Szobahőmérsékleten 3 percig inkubáltam, végül 1 percig 10000 rpm-en centrifugáltam. Az így kapott elúció tartalmazta az izolált RNS-t. A mintákat ezt követően jégen tartottuk további felhasználásig, majd -80 °C-on tároltuk.

5.5.2 Az izolált RNS koncentrációjának, tisztaságának és épségének ellenőrzése

A kapott RNS izolátumok koncentrációját és tisztaságát NanoDrop2000 készülék segítségével ellenőriztem. Az RNS koncentráció méréséhez 260 nm hullámhosszon mértem a minták abszorbanciáját. A fehérjeszennyezés kimutatásához a 260 nm-en és 280 nm-en mért abszorbancia értékek arányát vizsgáltam, az egyéb kismolekulás szennyezők, mint etanol, fenol, szervesetlen sók jelenlétét pedig a 260 nm-en és 230 nm-en mért abszorbancia arányával. Amennyiben a 260/280 és 260/230 arány is 2 körüli értéket adott, a mintát megfelelően tisztának ítéltam. Minden mérés során a műszerre 1 µl mintát cseppentettem, a mérést minden izolált RNS minta esetén elvégeztem. Az RNS molekulák épségét és a genomi DNS szennyeződést agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztem. A mintákat 1%-os TBE agaróz gélen futtattam meg, melyhez GelRed (Thermo Fischer Scientific) interkalálódó festéket adtunk. 12 µl össztérfogatú mintákat injektáltam a gélre, amelyek egységesen kb. 600 ng RNS-t tartalmaztak. A mintákhoz 2 µl Gel Loading Dye-t adtam (New England Biolabs), mely tartalmazott glicerint, amely injektálást követően a zseb aljára húzta a felvitt keveréket, és EDTA kelátképzőt, amely inhibeálta a fémion függő nukleázokat. Minden megfuttatott gélre GeneRuler 1kb plus DNS létrát (Thermo Fischer Scientific) helyeztem. Az agaróz gél előhívását Gel Doc Gel Documentation System (Bio-Rad) műszerrel végeztük. A kapott gélképeket Image Lab (Bio-Rad) képelemző szoftverrel értékeltem ki.

5.5.3 *Reverz transzkripció*

A qPCR analízishez cDNS mintákra van szükség, így minden minta esetén a reverz transzkripció reakcióhoz 200 ng RNS-t használtam fel. Az átírást Maxima First Stand cDNS átíró kittel végeztem (Thermo Fischer Scientific). Minden mintához szükséges 4 µl reakciópuffer és 2 µl reverz transzkriptáz enzim. Ezt a mintamennyiségre arányosan kiszámoltuk és mixet készítettünk, majd a kimért RNS mintákhoz 6 µl mixet mértünk. A reakcióelegyet pipetta segítségével homogenizáltuk. Mérésenként alkalmaztam NRT (no reverse transcriptase) kontrollt, amely nem tartalmazott mixet. Az NRT kontrol segítségével ellenőrizni tudtam a mintákban található genomi DNS szennyezés mértékét. Az előkészített reakcióelegyeket tartalmazó csöveket PCR készülékbe helyeztem, majd a mintákat 65 °C-on inkubáltam 30 percig. A program lejártá után a mintákat tartalmazó csöveket -20 °C-on tároltam a qPCR reakció összeállításáig.

5.5.4 *qPCR reakció*

Az qPCR mérésekhez először egy mixet állítottam össze. Ehhez korábban kiporciózott 53,5 µl EvaGreen interkaláló festéket (Biotium) tartalmazó Eppendorf csőbe 362 µl RNáz mentes vizet mértem. Az elegyhez 540 µl MyTaq HS Mix-et (Bioline) adtam, amely már előre tartalmazta a DNS polimeráz enzimet, a reakcióhoz szükséges dNTP-ket, Mg^{2+} ionokat, valamint a pufferált közeget. Az összeállított mixet óvatos vortex segítségével homogenizáltam, majd 3 Eppendorf csőbe 240 µl mixet mértem belőle. Az eredeti csőben maradt reagenst az NTC (no template control) mintákhoz használtam fel. A kimért reagens mixekbe 4-4 µl különböző cDNS mintát mértem. Az így kapott mintákat vortex segítségével homogenizáltam. A méréshez 96 lyukú, átlátszó falú Hard-Shell 96-Well PCR Plate (Bio-Rad) qPCR tálcát készítettem elő. A tálcára az első cDNS templátot is tartalmazó mixből az első oszlop mind a nyolc lyukába 27 µl-t mértem. A második cDNS templátot tartalmazó mixet a negyedik oszlop lyukaiba, a harmadik cDNS templátot tartalmazó mixet a hetedik oszlop lyukaiba mértem bele. A tizedik oszlopba a reagens mixből juttattam szintén 27 µl oldatot, amelyet NTC kontrollnak használtam. Előkészítettem a nyolc különböző mérni kívánt génhez tervezett primert tartalmazó csövet. A korábban porciózott, 4 µM koncentrációjú primer oldatok a forward és reverz primert is tartalmazták. Az első primer elegyből az A1, A4, A7 és A10-es lyukakba mértem 3-3 µl-t. A második primer elegyből a B1, B4, B7 és B10-es lyukakba, és így tovább a többi primerrel is soronként haladva. A minták összterfoglata 30 µl lett. Az összemért

mintákat először pipetta segítségével homogenizáltam. A megfelelő homogenizálás érdekében minimum hetvenszer kellett felkeverni minden minta esetén a folyadékot. A mintákat ezt követően három részre osztottam. Ehhez a 30 µl térfogatú folyadékból 10-10 µl-t a tőle jobbra fekvő két üres lyukba mértem. A keverési és osztási lépést minden mintán megismételtem, az NTC-k homogenizálása esetén csupán harmincszor kevertük fel a folyadékot. A 96 lyukú tálcával végzett munka során vigyáztam arra, hogy a tálca felett a lehető legkevesebb mozdulatot végezzem a kontamináció elkerülése érdekében. A mérési lépéseket a lehető legprecízebben végeztem. Az összeállított qPCR tálcát fólia segítségével lezártam, majd centrifugáltam.

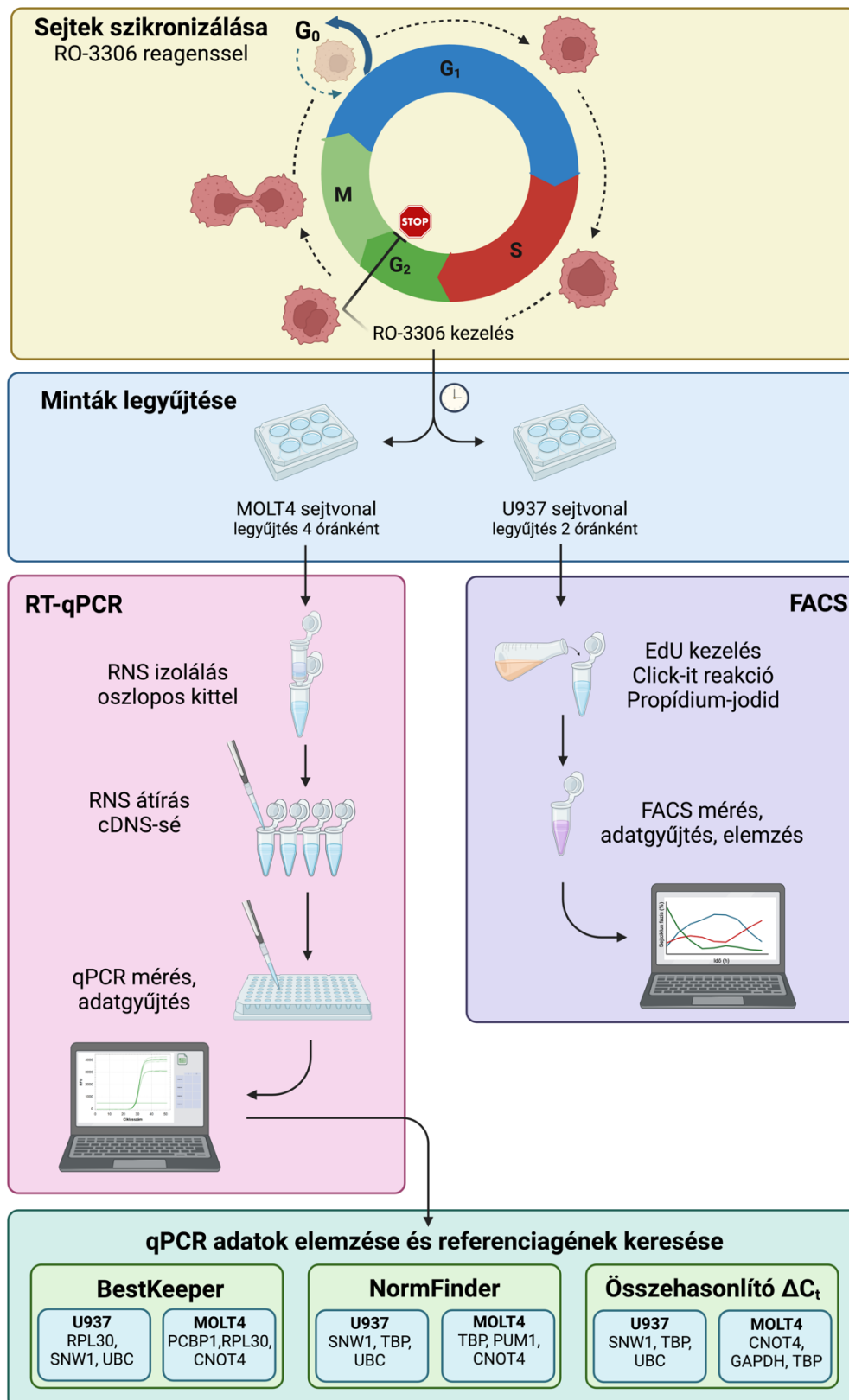
Az előkészített tálcát CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) qPCR készülékbe helyeztem és elindítottam az előre beállított programot. A mérés programja alapján a készülék először felfűtötte a tálcát 95 °C-ra, és ezt a hőmérsékletet tartotta 5 percig. Ezután következik a ciklikus szakasz, amely első felében 30 másodpercig 95 °C-on tartotta a tálcát, majd gyors lehűtés után 63 °C-on tartotta 30 másodpercig, végül detektálta a fluoreszcens jelet. A ciklus összesen ötvenszer ismétlődött. Az utolsó ciklus után az olvadásgörbe felvételéhez a készülék lassan, 63 °C-ról 95 °C-ra melegítette a tálcát, miközben 0,5 °C-onként detektálta a fluoreszcens jelet.

6 Eredmények és értékelésük

A referenciagének keresését célzó génexpressziós mérést öt lépésből felépülő kísérletsorozatként állítottunk össze (8. ábra). Ennek elemei a sejtek szinkronizálása, a szinkronizált sejtek legyűjtése, a legyűjtött sejtek vizsgálata FACS alkalmazásával, a génexpresszió mérése RT-qPCR technikával, végül pedig a kapott adatok elemzése és kiértékelése. A kísérleteket U937 és MOLT4 szuszpenziós, humán rákos sejtvonalakon végeztük el, mindkét sejtvonal esetén 3-3 biológiai párhuzamos felhasználásával. A qPCR mérés során kapott génexpressziós adatok kiértékelését BestKeeper, NormFinder szoftverekkel és összehasonlító ΔC_t módszerrel végeztük annak céljából, hogy ki tudjuk választani a 12 jelölt gén közül (*ACTB*, *GAPD*, *UBC*, *CNOT4*, *RPL30*, *HNRNPL*, *IPO8*, *SNW1*, *TBP*, *PUM1*, *PPIA*, *PCBP1*) a legstabilabb expresszióval rendelkezőket.

6.1 Sejtek legyűjtése

A kísérlet során a két alkalmazott sejtvonal között a két legfontosabb különbség azok ciklusideje volt. Az U937 sejteknek jellemzően 16 óra kellett egy teljes sejtciklus megtételéhez, míg a MOLT4 sejtek esetén ez az idő 32 óra volt. Ez magyarázza a legyűjtések eltérő ütemezését. A kísérletek során a sejtvonalakat RO-3306 CDK1 inhibitor segítségével szinkronizáltuk G2 és M fázis határán. A szinkronizált, majd felengedett U937 sejteket 2 óránként, míg a MOLT4 sejteket 4 óránként gyűjtöttük le. Mindkét sejtvonal esetén összesen 9 pontban, 3-3 biológiai párhuzamos esetén végeztük el a kísérleteket. Legyűjtés során a sejteket két felé osztottuk. Először FACS alkalmazásával meghatároztuk a sejtek mennyiségét a sejtciklus adott fázisaiban, majd RNS izolálást követően mértük meg a referenciagének expresszióját a különböző mintákban.



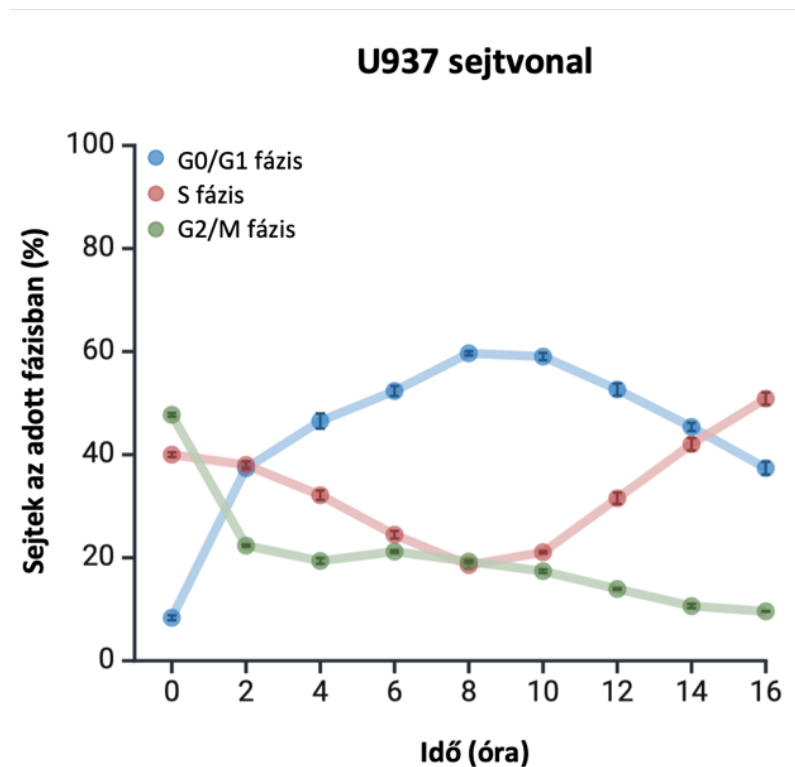
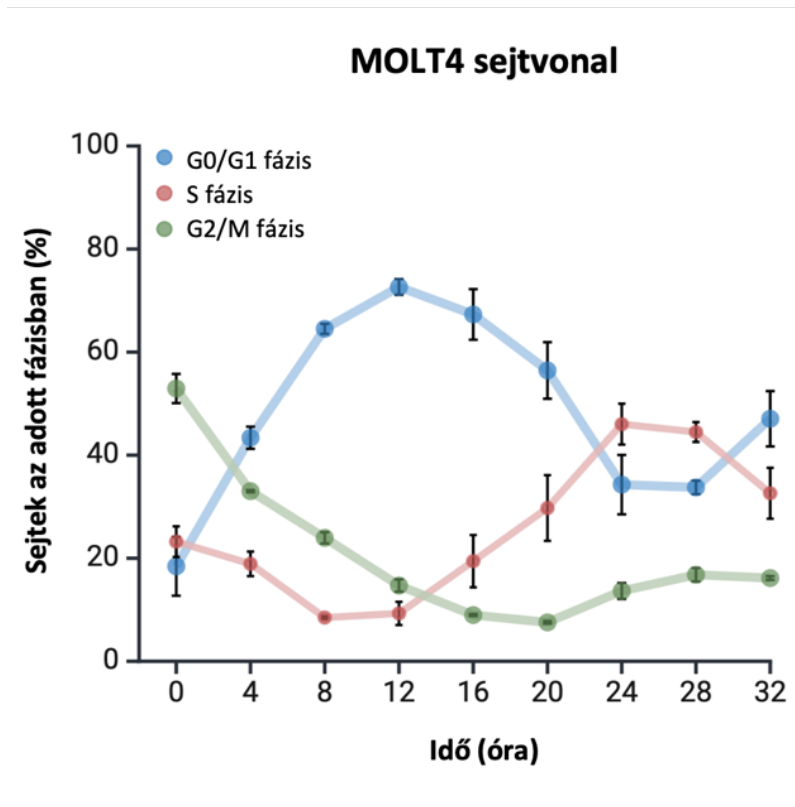
8. ábra A kísérleti elrendezést bemutató sematikus ábra

6.2 Szinkronizálás ellenőrzése

A sejteket legyűjtés előtt EdU (5-etinil-2'-dezoxiuridin) reagenssel kezeltük. Az EdU egy timidin analóg, amely az éppen S fázisban lévő sejtek DNS-ébe épül, így lehetővé téve az S, illetve a G0/G1 és G2/M fázisok megkülönböztetését. Ezt követően az EdU-val kezelt sejteket fixáltuk, majd szaponin alkalmazásával permeabilizáltuk, hogy a továbbiakban hozzáadott reagensok számára a DNS jól hozzáférhető legyen. Ezt követően adtuk hozzá a Cu(I) tartalmú reagenst, amelyben a Cu^+ ionok az acetilén kötéshez koordinálva aktiválják azt, hogy Sharpless-cikloaddíció révén az azid tartalmú reagenssel, triazol gyűrűt képezzen. Az aktiválás után fluoreszcensen jelölt pikolil-azid festéket adtunk a mintához, hogy a „click-it” reakció lejátszódhasson. Ezt követően a sejtek DNS-ét propídium-jodiddal festettük, ezzel elkülönítve az egyszeres DNS mennyiséggel rendelkező G0/G1, illetve kétszeres DNS mennyiséggel rendelkező G2/M fázisú sejteket. Mivel a propídium-jodid az RNS-hez is képes kapcsolódni, RNázal kezeljük a mintákat. A mérés eredményét Excel segítségével összegeztük, az ábrát BioRender segítségével készítettük sejtvonalanként, összesen két diagramon (9. ábra).

A MOLT4 sejtvonal esetén kifejezetten jól sikerült a szinkronizálás, mivel a 0 órához tartozó minták esetén a G2/M fázisban tartózkodó sejtek a teljes populáció 53%-át adják (9. ábra). A továbbiakban a görbéket követve könnyen azonosíthatóak a sejtciklus egyes fázisaihoz tartozó minták. A G2/M fázis 0 óránál, a G0/G1 fázis a 12 óránál, az S fázis pedig 24 óránál tetőzik.

Az U937 sejtvonal esetén is sikeres volt a szinkronizálás, a sejtek közel 50%-a G2/M fázisba került a 0 órás mintákban (9. ábra). Bár az U937 sejtek esetén rövidebb a generációs idő, mégis sikerült jól elkülöníteni, hogy az egyes mintákban melyik fázis dúsult leginkább. A G2/M fázis 0 óránál, a G0/G1 fázis 8 óránál, míg az S fázis 16 óránál tetőzött. Az eredmények alapján a szinkronizálás sikeres volt, mivel mind a két sejtvonal esetén rendelkezünk olyan mintával, melyben az adott fázisban lévő sejtek többségben vannak a többi két fázishoz képest.



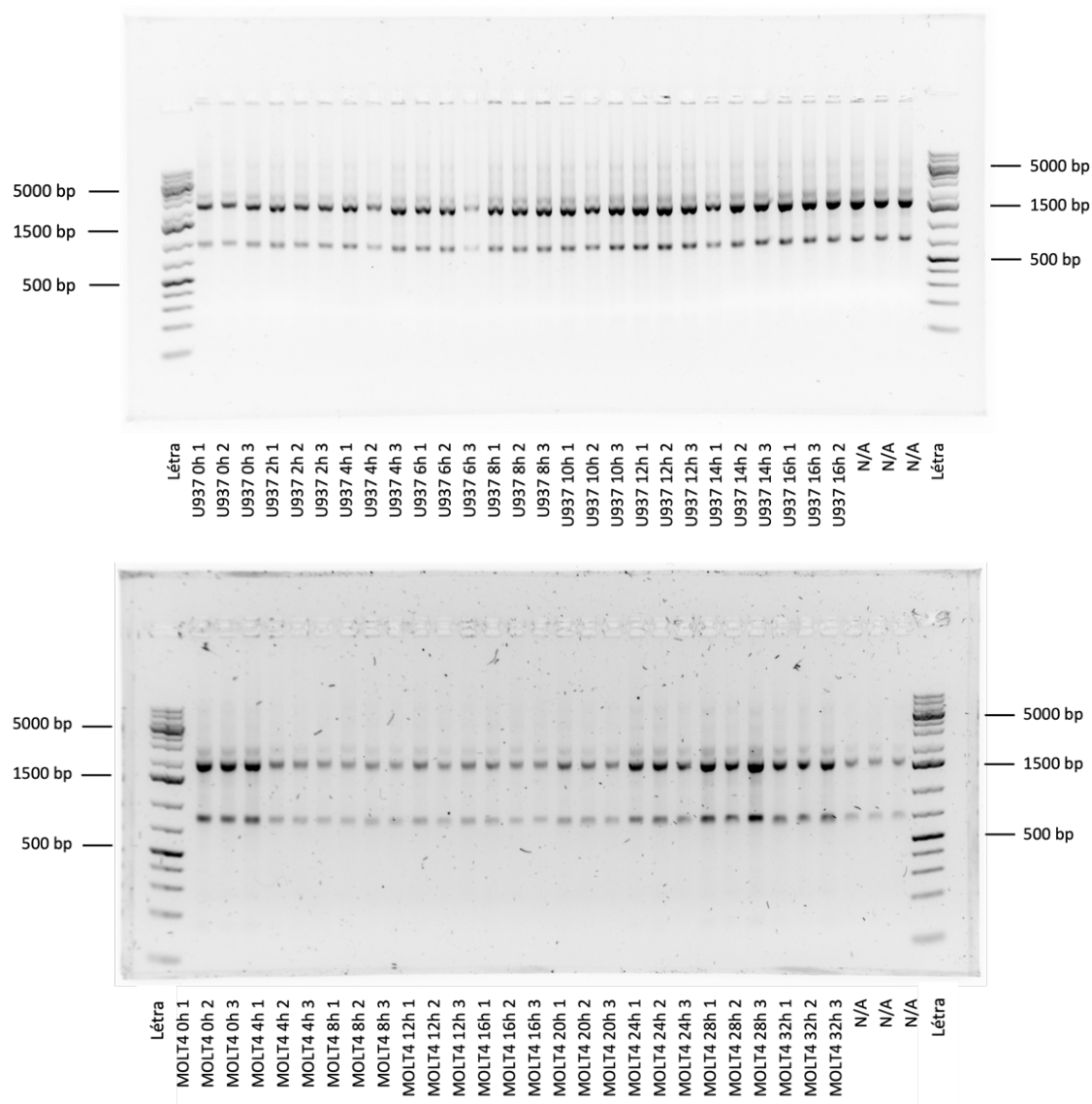
9. ábra A sejtek mennyisége a sejtciklus különböző fázisaiban a MOLT4 és az U937 sejtvonal esetében
 Az ábrán az egyes sejtfázisokban található sejtek százalékos eloszlása látszik a legyűjtési idő függvényében. Kékkel a G0 vagy G1 fázisú sejtek, pirossal az S fázisúak, zölddel a G2 vagy M fázisúak. A hibasávok az átlagtól való eltérést jelölik.

6.3 RT-qPCR mérés

A referenciagének expressziójának mérésére a minták mRNS tartalmát kellett kvantitatív módszerrel vizsgálni, amelyre a legjobb választás az RT-qPCR mérés volt.

6.3.1 RNS izolálás

A feldolgozás első lépése a legyűjtött sejtek lízise volt, mely során az összes sejtalkotóban megtalálható RNS hozzáférhetővé vált. Az mRNS expresszióhoz a sejtekben található összes RNS-t izolálni kell. Az izolálást centrifugálható oszlopon végeztük, ahol először a genomi DNS-t távolítottuk el a mintákból, majd több lépésben vizes-etanolos mosásokat végeztünk. A DNS szennyezés eltávolításáért DNázssal kezeltük a mintákat, majd a keletkező DNS fragmenseket lemostuk az oszlopról. Az izolált RNS mintákban ellenőriznünk kellett az RNS koncentrációját, tisztaságát, és épségét. A koncentráció és tisztaság mérését Nanodroppal végeztük. A minták abszorbanciáját megmértük 260, 280 és 230 nm hullámhosszon. A 260/280 arány a minta fehérje szennyezettségéről, míg a 260/230 arány a kis molekulás szennyezőkről (szervetlen sók, fenolok, etanol) adott információt. Mivel mindkét arány 2 körüli értéket volt, tisztának ítéltük a mintákat. A mért RNS koncentrációt feljegyeztük, a reverz transzkripció során a koncentráció értékek felhasználásával mértünk minden reakcióba azonos mennyiségű RNS-t. A mintákban az RNS épségét agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztük (10. ábra). Mivel a mérni kívánt mRNS-ek mennyisége túl alacsony, ami nem tesz lehetővé közvetlen vizsgálatokat, ezért a riboszómális RNS két egységét (40S, 60S) vizsgáltuk a gélen. A gélen futtatott minták alapján a riboszómális RNS nem degradálódott, így az izolált RNS teljes mennyiségét épnek ítéltük.



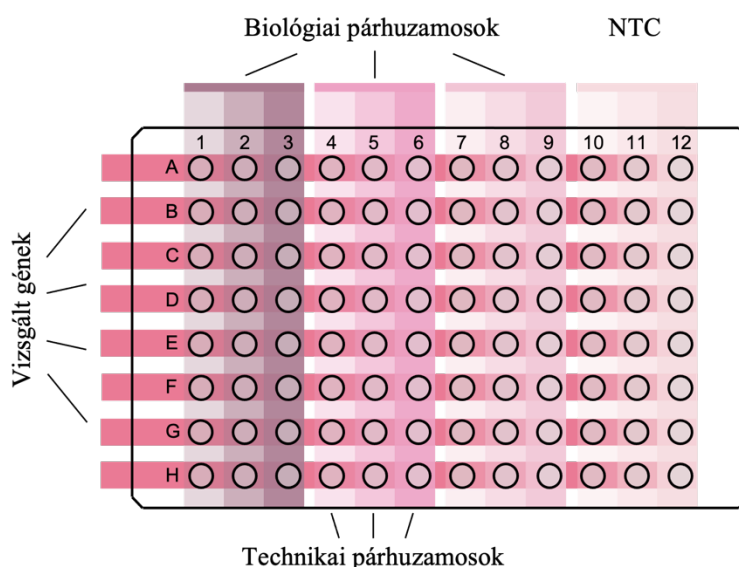
10. ábra Az izolált RNS minták épségének ellenőrzése 1%-os TBE agaróz gélelektroforézis alkalmazásával az U937 és MOLT4 sejtvonalak esetén

6.3.2 Reverz transzkripció

Mivel az RNS minták rendkívül érzékenyek, igyekeztünk minél előbb átírni azokat cDNS-sé. Az átírás során minden reakcióba azonos anyagmennyiségű, 200 ng RNS-t, primert és enzimet mértünk. Random hexamer primer technikát használtunk, hogy a lehető legmagasabb hatásfokkal játszódhasson le a reakció. A reverz transzkripció során minden minta esetén készítettünk egy NRT (no reverse transcriptase) kontrollt is, amely a reakcióhoz szükséges összes elemet tartalmazta az enzim kivételével. Az NRT kontroll segítségével ellenőriztük qPCR reakciók során a minták genomi DNS szennyezését.

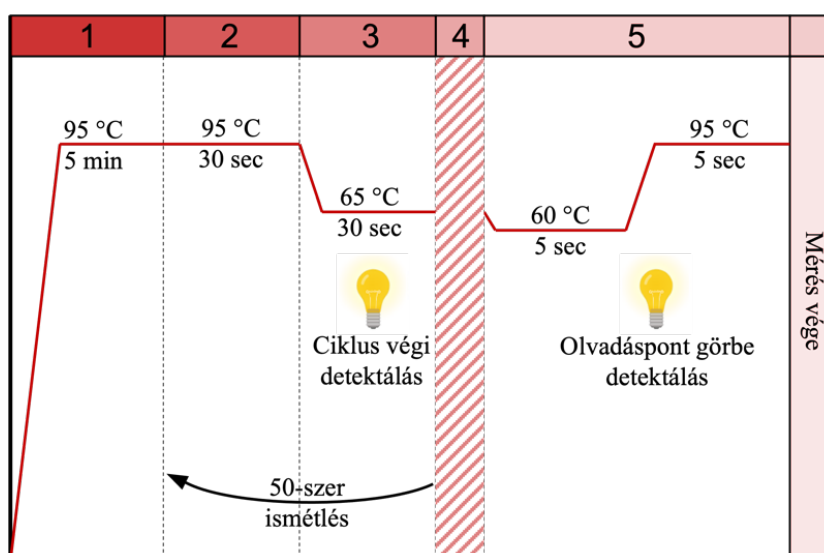
6.3.3 qPCR analízis

A mintákban a referenciagének mRNS expresszióját qPCR technikával végeztük, amelyhez az előkészített, szinkronizált sejtek RNS-éből átírt cDNS mintákat használtuk fel. A kutatócsoport korábbi munkája során jól optimalizált mérési protokoll rendelkezésünkre állt a vizsgált gének esetén, amely a festék, az enzim és primer koncentrációját, valamint a hőmérsékletprofilt is pontosan meghatározta [37]. Mivel a kísérlet célja számos mintában a génexpressziós szintek összehasonlítása volt, ezért hatalmas fontosságot kapott a pontos mennyiségi bemérés. A körülményeket nehezítette a PCR reakció érzékenysége is. A teljes RT-qPCR reakciósorozatot szeparált térben, maszk viselése mellett, nagyfokú precizitással kellett végezni. A qPCR méréseket 96 lyukú tálcán állítottuk össze, amely egyszerre 3 minta mérését tette lehetővé 8 különböző gén esetén (11. ábra). Minden gén esetén NTC (no template control) kontrollokat is alkalmaztunk, amelyek a reakcióelegy összes elemét tartalmazták, kivéve a cDNS-t. Az NTC kontrollok segítségével tudtuk ellenőrizni a qPCR reakció során történt kontaminációt. Mindkét sejtvonalon az adott időpontban gyűjtött minták esetén 3 biológiai párhuzamost vizsgáltunk, és minden biológiai párhuzamos esetén, beleértve az NTC-ket is, 3 technikai párhuzamos mérést végeztünk annak érdekében, hogy a kapott eredmények minél helyesebben tükrözzék a valós értékeket.



11. ábra A qPCR mérés során használt 96 lyukú tálcák kísérleti összeállítása

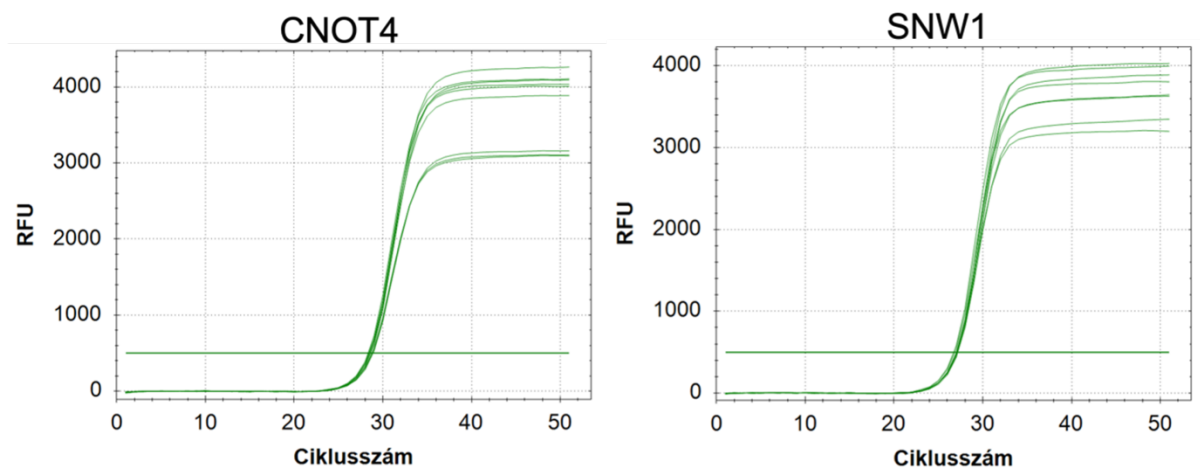
A mintákat tartalmazó 96 lyukú tálcákat Bio-Rad CFX96 qPCR készülékbe helyeztük, amely az optimalizált hőmérsékletprofil alapján vezette a reakciót (12. ábra). Első lépésként felfűtötte a mintákat 95 °C-ra, ahol egyrészt denaturálódtak a cDNS szálak, másrészt aktív formába került a HS-MyTaq polimeráz enzim. A fűtést követően a primerek olvadási hőmérséklete alá hűlt a készülék, valamint a polimerizáció is a primerek tapadási hőmérsékletén, szuboptimális hőmérsékleten ment végbe. A ciklus végén UV detektor segítségével regisztrálta a készülék a minták fluoreszcenciáját. A ciklust ötvenszer ismételte meg egy mérés során. A méréshez használt EvaGreen egy interkalálódó festék, így az amplikonok specifikusságát olvadásgörbe analízis segítségével elemeztük. Ehhez a készülék végül lassan felfűtötte a mintákat 95 °C-os hőmérsékletre, közben 0,5 °C-ként detektálta a fluoreszcens jelet.



12. ábra qPCR mérés során alkalmazott hőmérsékletprofil és detektálási pontok

6.3.3.1 Amplifikációs görbék

Minden mérés után, minden technikai párhuzamos mintáról külön amplifikációs görbét kaptunk, amelyet a BioRad CFX Maestro szoftverrel tudtunk elemezni. Ezen görbék segítségével tudtuk ellenőrizni, hogy minden minta tartalmazott-e templátot (13. ábra). Az NTC kontrollok segítségével kizártuk a kiértékelésből és újramértük azokat a mintákat, amelyek esetén kontamináció történt. Minden esetben manuálisan állítottuk a küszöbértéket 500 RFU-ra (relatív fluoreszcens egység), így minden mérés során egységesen történt a C_t -értékek leolvasása. Technikai párhuzamosok esetén a 0,5 ciklusszámnál nagyobb szórást mutató görbéket kizártuk a kiértékelésből, mely keverési hibából adódhatott, de minden mérés esetében legalább két technikai párhuzamost felhasználtunk.



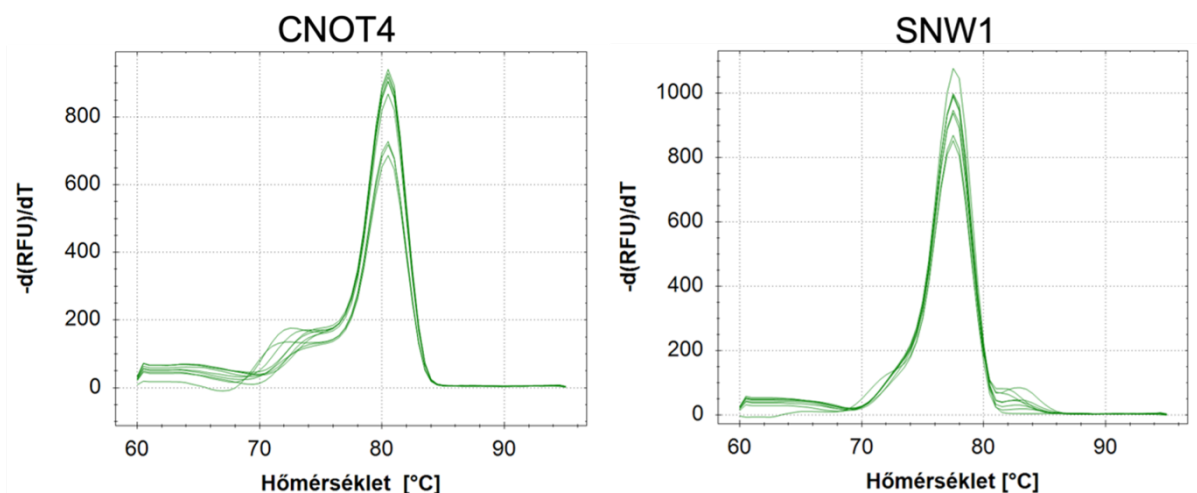
13. ábra A CNOT4 és SNW1 gének példáján bemutatott amplifikációs görbék

Az ábra az RFU (relatív fluoreszcens egység) ábrázolja a ciklusszám függvényében.

A küszöbértéket minden görbe esetén 500 RFU értékre állítottuk.

6.3.3.2 Olvadásgörbe analízis

Az egyes mérések esetén a keletkezett termék specifikusságát olvadásgörbe analízissel ellenőriztük. Ehhez a láncreakció végén keletkezett összes terméket lassan melegítettük, miközben 0,5 °C-ként mértük a fluoreszcenciát. Mivel a reakció követésére kettősszálú DNS-be interkalálódó EvaGreen festéket használtunk, ezért az minden kettősszálú PCR termékbe képes volt interkalálódni. A hőmérséklet hatására a különböző hosszúságú és szekvenciájú amplikonok eltérő időpontban denaturálódnak, ami eltérő lefutású fluoreszcens jel csökkenést okoz. A nyers olvadásgörbe adatai nehezen értelmezhetőek, ezért ennek idő szerinti első negatív deriváltját vizsgálják. Az így kapott görbe maximumot mutat ott, ahol a leggyorsabban csökkent a fluoreszcens jel, tehát ahol az adott amplikon olvadáspontja van (14. ábra). Ha az adott gén vizsgálata esetén egy helyre esnek az olvadásgörbék maximum értékei, akkor azonos olvadáspontú termék keletkezett, ezek teljes azonosságát azonban szekvenálással lehetne ellenőrizni. Az általam alkalmazott protokoll elkészítése során a felhasznált génekről korábban bizonyították, hogy az azonos olvadáspontú PCR termékek szekvenciái is azonosak, ezért nekem elegendő volt csupán olvadásgörbe analízist elvégeztük. Abban az esetben, amikor eltérő olvadásgörbét tapasztaltunk a qPCR mérések során, az adott technikai párhuzamos mintát kizártuk az értékelésből.



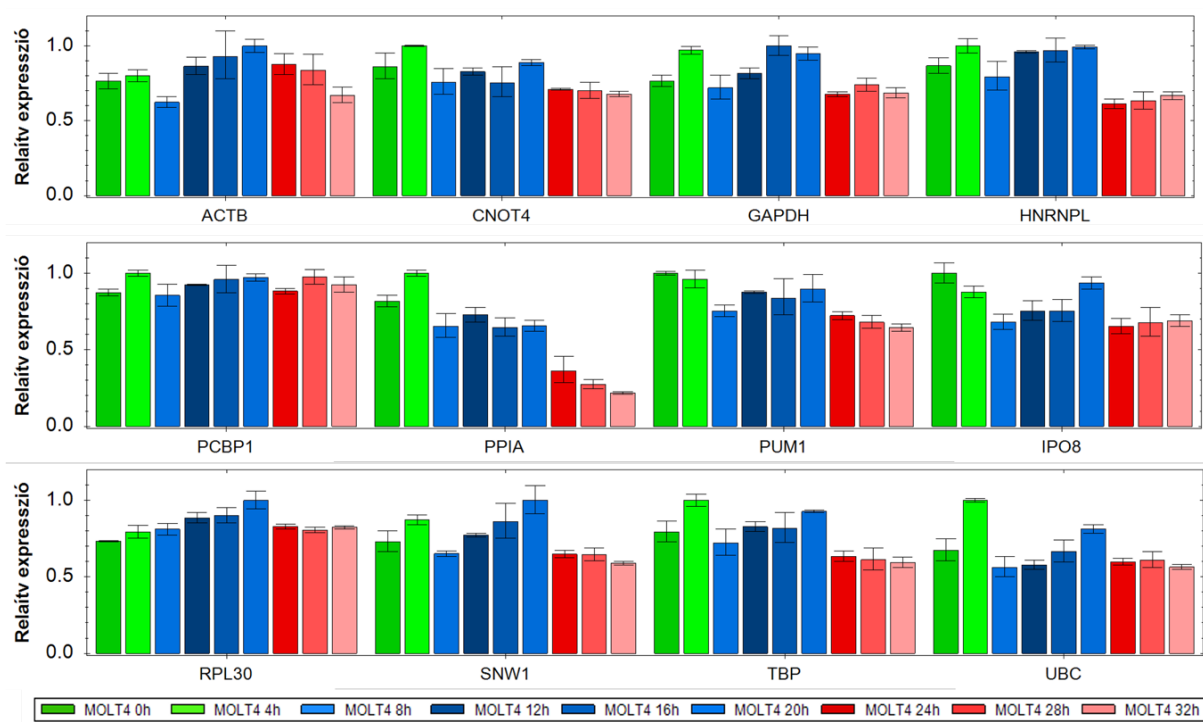
14. ábra A CNOT4 és SNW1 gén példáján bemutatott olvadásgörbe analízis

Az ábrán az RFU (relatív fluoreszcens egység) értékek idő szerinti negatív első deriváltját mutatja a hőmérséklet függvényében.

6.3.3.3 A génexpressziós adatok kiértékelése

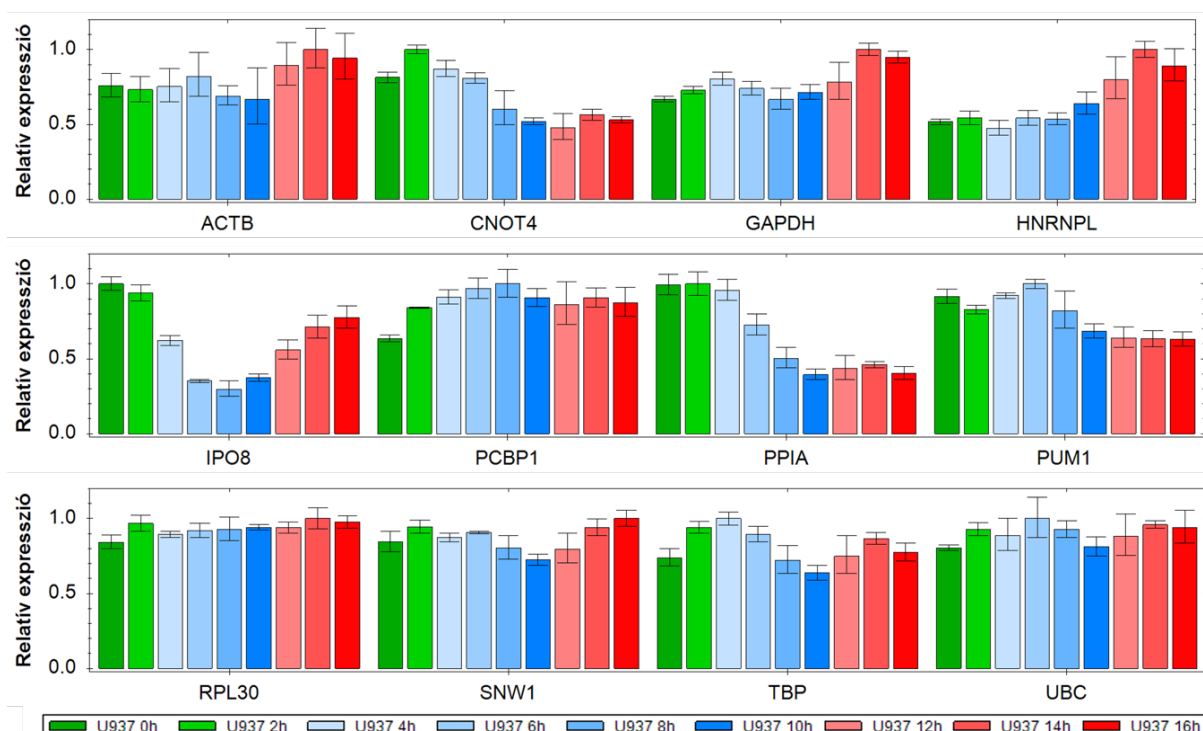
A megfelelőnek ítélt adatokból előzetesen a Bio-Rad CFX Maestro szoftver Gene Study felületén végeztünk elemzést, mely a nyers adatok összegzésére szolgál. Segítségével gyakorlatilag az összes mért érték átláthatóvá válik. Az adatok rendszerezésére több lehetőséget is kínál, melyek közül a biológiai csoportok szerinti rendezést választottuk. Ebben az elrendezésben a program egy oszlopdiagramba rendezi mind a technikai, mind a biológiai párhuzamosokat, az oszlop magassága az átlagos relatív expressziós szintet mutatja, amely körül az adatok szórása is látható (15. ábra és 16. ábra). Az egyes oszlopok adott legyűjtési időponthoz tartoznak. A FACS mérés segítségével az egyes legyűjtési időpontokat meg tudtuk feleltetni az arra leginkább jellemző sejtciklus fázisnak. Az egyes fázisokat eltérő színnel jelöltem; zöld színnel a G2/M fázisú, kékkel a G1/G0 fázisú, míg pirossal az S fázisú sejtekben leggazdagabb legyűjtéshez tartozó adatokat jelöltük. Az oszlopokat a vizsgált referenciagén szerint kilences csoportokba rendeztük, így mindkét sejtvonalon, minden vizsgált gén expressziós szintjének változása a sejtciklus teljes folyamata alatt látható. A kapott oszlopdiagramokkal kapcsolatban fontos, hogy a relatív expressziós szintek csak adott géneken belül összehasonlíthatók, a gének közötti expresszió mértékét a szoftver nem tudja figyelembe venni. Adott génen belül a legmagasabb expressziós szintű legyűjtési időpontra normálja a többi értéket.

A MOLT4 sejtvonal adatai alapján elmondhatjuk, hogy a *PPIA* gén expressziója erős sejtciklus függést mutatnak, 24 óra alatt ötszörös változás figyelhető meg (15. ábra). Hasonló módon az *ACTB* expressziója is változik, maximális koncentrációját G1 fázisban éri el, továbbá a *PPIA* expressziós értékei is viszonylag széles skálán mozognak. Velük szemben a *PCBP1* és a *CNOT4* gének is stabilnak látszanak, értékeik kisebb mértékben változnak. A későbbi kiértékelések során a stabilitási rangsor elején helyezkedett el az *TBP* és *UBC* is. Ezen gének adatai a ábrán nem tűnnek állandónak, ennek ellenére több szoftver is megbízható referenciagénként azonosította ezeket. A látszatnak ellentmondó eredmény magyarázható azzal, hogy a szoftverből nyert diagram relatív expressziós szinteket ábrázol, a kiértékelő programok azonban közvetlenül a C_t értékekkel és a PCR hatásfokával dolgoznak. Tehát eredendően alacsony expressziós szintek esetén viszonylag kis mennyiségi változás is jelentős relatív különbségként mutatkozik meg, ezzel szemben magas expressziós szintek mellett a nagyobb mértékű mennyiségi különbségek elfedve maradhatnak csupán arányaikat vizsgálva.



15. ábra A referenciagének relatív expressziós értékei a MOLT4 sejtvonal esetén

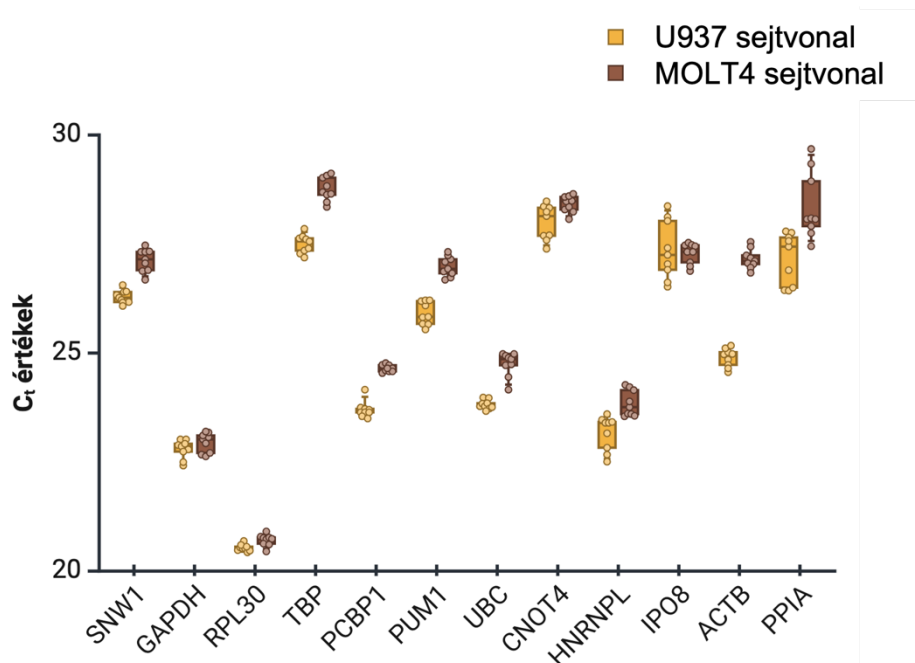
Az U937 sejtvonal adatait hasonló módon elemezve még látványosabb sejtciklus függő lefutások figyelhetők meg az *IPO8*, *PPIA* és *HNRNPL* gének esetén (16. ábra). Az *IPO8* G2/M fázisban mutat maximumot, majd az expressziós szint 8 óra alatt a harmadára esik. A *PPIA* gén esetében az expresszió szintén G2/M fázisban éri el a legmagasabb értékét, ezt követően azonban kevésbé változik a szintje. A *HNRNPL* kizárólag S fázisban emelkedik meg közel kétszeresére. Ezekkel a génekkel szemben stabilnak mutatkozik az *SNW1* és az *UBC*. A szoftver alapján az *RPL30* gén is stabilnak tűnik, azonban az alkalmazott kiértékelő programok mégsem helyezik a legjobb referenciák közé.



16. ábra A referenciagének relatív expresszió értékei az U937 sejtvonal esetén

Pusztán a GeneStudy vizualizálása félrevezető lehet, mivel az egymás mellé helyezett relatív expressziós adatok csak adott gén értékein belül összehasonlíthatók. A génexpresszió stabilitását jobban szemlélteti a 17. ábra, amely az adott génekre mért C_t értékeket ábrázolja box-plot diagramon, az egyedi mérési pontok feltüntetése mellett. Az x tengely mentén a géneket az összegzett stabilitási rangsor szerint ábrázoltam, amely balról jobbra növekszik. Az ábráról leolvasható, hogy sejtvonalakon belül és sejtvonalak között is kisebb szórást mutató gének kerültek előrébb a rangsorban. Azonban megfigyelhető némi torzítás is. Egyes gének, mint az *RPL30* vagy *PCBP1* sokkal kisebb szórást mutatnak a C_t értékeikben, mint a rangsorban előttük álló gének. Az *RPL30* és *PCBP1* azonban viszonylag alacsony C_t értékkel rendelkezik, tehát sokkal nagyobb mennyiségben volt jelen a mintákban. A jelentős mennyiségi különbség

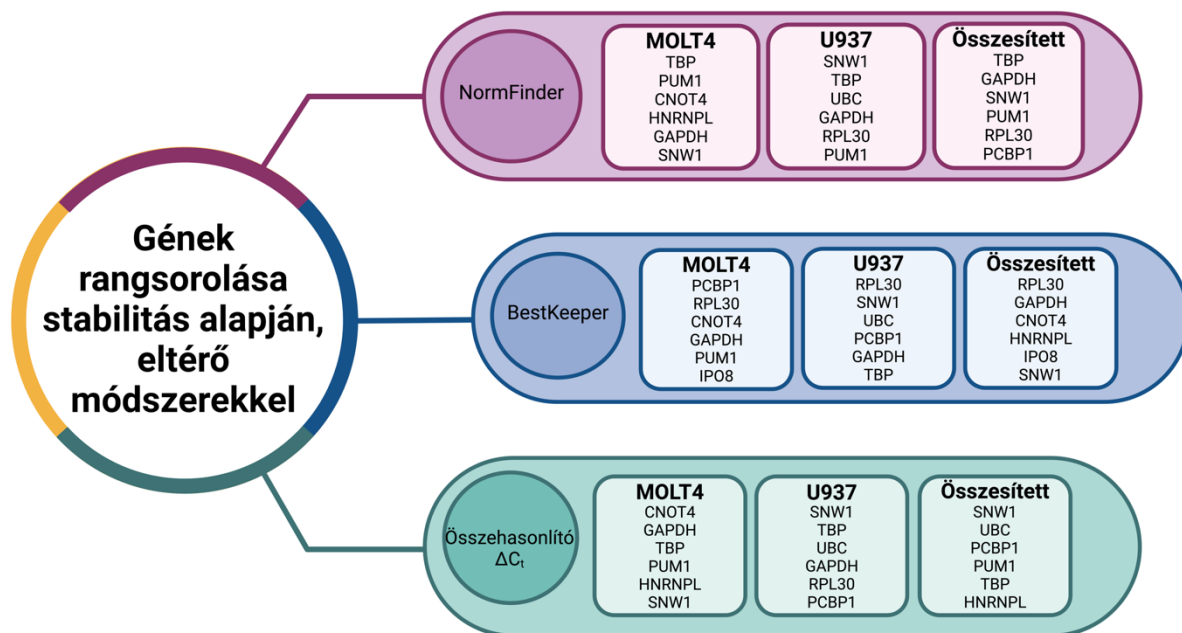
teszi lehetővé a szórásértékek torzítását az ábrán, emellett rámutat a referenciagén kereső szoftverek szükségességére is, mivel mint látható a nyers adatok egyszerű összehasonlításával nem lehetséges egyértelmű génstabilitási rangsort felállítani.



17. ábra Az egyes génekhez tartozó C_t értékek box-plot ábrázolása az egyedi mérési pontok feltűntetése mellett
Az ábra függőleges tengelyén a C_t értékek, vízszintes tengelyén az egyes referenciagének láthatóak.
Narancssárgával az U937 sejtvonal, barnával a MOLT4 sejtvonal értékei látszanak.

6.4 Stabil referenciagének keresése

A megfelelő referenciagének kiválasztására több módszer is alkalmazható. Ezek legtöbb esetben a kísérletekből származó C_t értékeket, valamint a PCR reakciók hatásfokát használják fel számításaik során. Az algoritmus során a bevitt C_t értékek szórásainak vagy eltéréseinek összehasonlításával felállítanak egy stabilitási rangsort. A rangsor elején szereplő gének nagyobb stabilitást mutatnak, tehát a vizsgált sejtvonalak és kísérleti elrendezés esetén a legalkalmasabbnak bizonyulnak. A kísérletekből nyert adatok kiértékelésére és megfelelő referenciagének megtalálására három, eltérő módon működő módszert választottunk; az összehasonlító ΔC_t módszert, illetve a BestKeeper és NormFinder szoftvereket (18. ábra). Minden módszer algoritmusát lefuttattuk a MOLT4 és U937 sejtvonalak értékein, valamint a két sejtvonal egyesített értékein is, így külön-külön, valamint a két sejtvonalra együtt is meg tudtuk határozni a legnagyobb stabilitással rendelkező referenciagéneket a sejtciklus során.



18. ábra A referenciagének kiértékelésének vázlata és eredményei

6.4.1 Összehasonlító ΔC_t módszer

A legstabilabb referenciagének kiválasztására elsőként az összehasonlító ΔC_t módszert használtuk, amelyhez a számításokat Microsoft Excelben végeztük. Elsőként minden mérés technikai párhuzamosainak vettük az átlagos C_t értékét, majd a vizsgált gén esetén páronként különbséget vontunk belőlük. Az így képzett páronkénti összehasonlításoknak kiszámítottuk az átlagát és szórását minden gén esetén. A módszer a gének rangsorát a páronkénti összehasonlítások szórása alapján állítja fel. Amely gén esetén a szórás legkisebbnek adódott, az került első helyre a rangsorban. Az összehasonlító ΔC_t módszer csupán a mintákhoz tartozó C_t értékeket használja fel, tehát számítása manuálisan elvégezhető és jól követhető. A módszer éppen ezért inkább tájékoztató jellegű információt ad a referenciagének stabilitásáról. A kapott rangsorokat az 1. táblázatban egyesítettük.

	MOLT4	U937	Összesített
1	CNOT4	SNW1	SNW1
2	GAPDH	TBP	UBC
3	TBP	UBC	PCBP1
4	PUM1	GAPDH	PUM1
5	HNRNPL	RPL30	TBP
6	SNW1	PCBP1	HNRNPL
7	PCBP1	PUM1	CNOT4
8	IPO8	CNOT4	GAPDH
9	UBC	ACTB	RPL30
10	RPL30	HNRNPL	PPIA
11	ACTB	PPIA	IPO8
12	PPIA	IPO8	ACTB

1. táblázat Összehasonlító ΔC_t módszerrel kapott stabilitási rangsor

6.4.2 BestKeeper

A BestKeeperrel végzett elemzéshez a RefFinder online eszközt alkalmaztuk, mert a Microsoft Excelben kezelhető BestKeeper eszköz nem tud tíz génnél többet elemezni. Az online felületen elérhető BestKeeperrel viszont a PCR hatásfok értékeket nem lehet figyelembe venni, azonban mivel azok minden esetben 95% felett voltak, ezért ez nem befolyásolja döntően az eredményeket. A BestKeeper szoftver kiszámítja a C_t értékek mértani átlaga és az egyes referenciagének közötti korrelációt. A kapott értékeket a 2. táblázat tartalmazza, ahol az alacsony stabilitási értékek a stabilabb expresszióval rendelkező génekre jellemzőek.

	MOLT4	U937	Összesített
1	PCBP1	RPL30	RPL30
2	RPL30	SNW1	GAPDH
3	CNOT4	UBC	CNOT4
4	GAPDH	PCBP1	HNRNPL
5	PUM1	GAPDH	IPO8
6	IPO8	TBP	SNW1
7	TBP	PUM1	PCBP1
8	ACTB	ACTB	UBC
9	SNW1	HNRNPL	PUM1
10	UBC	CNOT4	TBP
11	HNRNPL	PPIA	PPIA
12	PPIA	IPO8	ACTB

2. táblázat A BestKeeper szoftver által felállított stabilitási rangsor

6.4.3 NormFinder

A NormFinder szoftver a PCR hatásfokának és C_t értékeknek a felhasználásával lineáris statisztikai modell segítségével képez egy úgynevezett stabilitási indexet, amely a bevitt adatokból számolt korrigált expressziós értékek varianciáinak összehasonlításából származik. Érdekes módon a három referenciagén kereső módszer közül a NormFinder adta a leginkább eltérő eredményeket a BestKeeper és összehasonlító ΔC_t módszerhez képest, amely rámutat az egyes algoritmusok közötti különbségekre, illetve arra, hogy referenciagén keresés esetén minél több módszert használjunk. A NormFinder szoftverrel kapott rangsorokat a 3. táblázatban egyesítettük.

	MOLT4	U937	Összesített
1	TBP	SNW1	TBP
2	PUM1	TBP	GAPDH
3	CNOT4	UBC	SNW1
4	HNRNPL	GAPDH	PUM1
5	GAPDH	RPL30	RPL30
6	SNW1	PUM1	PCBP1
7	IPO8	PCBP1	CNOT4
8	UBC	CNOT4	ACTB
9	PCBP1	ACTB	UBC
10	RPL30	HNRNPL	HNRNPL
11	ACTB	PPIA	IPO8
12	PPIA	IPO8	PPIA

3. táblázat A NormFinder szoftver segítségével felállított stabilitási rangsor

6.4.4 Összesített rangsor

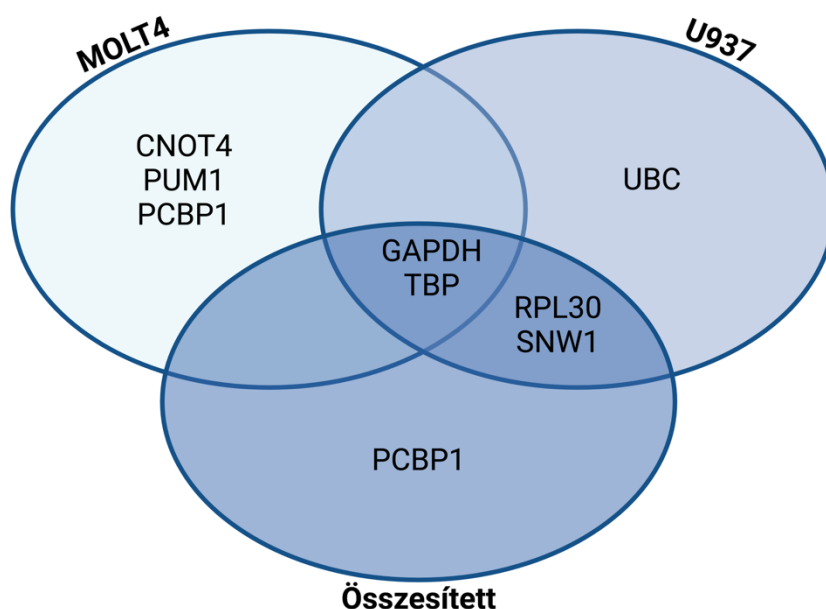
A három kiértékelő módszer eredményeit egy táblázatban egyesítettük (4. táblázat). A különböző módszerekkel kapott rangsorok alapján az adott génre vonatkozó rangok mértani átlagából képeztük egy új, összesített rangsort. Az U937 sejtvonalon az *SNW1*, *TBP*, *UBC*, *GAPDH* és *PUM1* gének tűnnek a legalkalmasabb referenciagéneknek a sejtciklus során, míg a gyakran használt referenciagének közül az *ACTB*, *PPIA* és *IPO8* gének alkalmazhatósága megkérdőjelezhető kvantitatív analízisre.

A MOLT4 sejtvonal esetén az *SNW1*, *PCBP*, *UBC*, *PUM1* és *TBP* gének megfelelő stabilitást mutattak mindhárom módszerrel, ezért munkánk alapján ezeket ajánljuk referenciagéneknek. A két sejtvonal nagy hasonlóságot mutat a legkevésbé stabil gének tekintetében, mivel a MOLT4 sejtvonal esetén is az *ACTB*, *PPIA* és *IPO8* gének bizonyultak a legkevésbé stabilnak.

	Végső sorrend	Gén	Összehasonlító ΔCt		NormFinder		BestKeeper		Sorrendek mértani átlaga
			Sorrend	Szórás átlag	Sorrend	Stabilitási érték	Sorrend	Stabilitási érték	
MOLT4 sejtvonala	1	CNOT4	1	0,248	3	0,075	3	0,208	2,08
	2	TBP	3	0,252	1	0,073	10	0,236	3,11
	3	GAPDH	2	0,251	5	0,084	4	0,212	3,42
	4	PUM1	4	0,254	2	0,075	5	0,222	3,42
	5	PCBP1	7	0,288	9	0,146	1	0,098	3,98
	6	RPL30	10	0,306	10	0,163	2	0,106	5,85
	7	HNRNPL	5	0,261	4	0,082	11	0,284	6,04
	8	SNW1	6	0,262	6	0,089	8	0,242	6,60
	9	IPO8	8	0,292	7	0,130	6	0,229	6,95
	10	UBC	9	0,293	8	0,136	9	0,258	8,65
	11	ACTB	11	0,331	11	0,176	7	0,238	9,46
	12	PPIA	12	0,644	12	0,428	12	0,641	12,00
U937 sejtvonala	1	SNW1	1	0,340	1	0,047	2	0,165	1,26
	2	TBP	2	0,354	2	0,077	6	0,222	2,88
	3	RPL30	5	0,394	5	0,164	1	0,105	2,92
	4	UBC	3	0,357	3	0,110	3	0,176	3,00
	5	GAPDH	4	0,372	4	0,135	5	0,208	4,31
	6	PCBP1	6	0,420	7	0,206	4	0,197	5,52
	7	PUM1	7	0,427	6	0,195	7	0,253	6,65
	8	CNOT4	8	0,474	8	0,249	10	0,380	8,62
	9	ACTB	9	0,481	9	0,252	8	0,342	8,65
	10	HNRNPL	10	0,527	10	0,309	9	0,353	9,65
	11	PPIA	11	0,608	11	0,375	11	0,539	11,00
	12	IPO8	12	0,681	12	0,423	12	0,570	12,00
Összes sejtvonala	1	SNW1	1	0,421	3	0,113	6	0,435	2,62
	2	GAPDH	8	0,539	2	0,108	2	0,218	3,17
	3	RPL30	9	0,555	5	0,172	1	0,138	3,56
	4	TBP	5	0,480	1	0,079	10	0,628	3,68
	5	PCBP1	3	0,473	6	0,176	7	0,475	5,01
	6	PUM1	4	0,475	4	0,145	9	0,537	5,24
	7	UBC	2	0,441	9	0,216	8	0,479	5,24
	8	CNOT4	7	0,519	7	0,203	3	0,332	5,28
	9	HNRNPL	6	0,518	10	0,259	4	0,375	6,21
	10	IPO8	11	0,748	11	0,348	5	0,401	8,46
	11	ACTB	12	0,909	8	0,214	12	1,132	10,48
	12	PPIA	10	0,721	12	0,404	11	0,675	10,97

4. táblázat A különböző referenciagén kiértékelő módszerekkel kapott rangsorok összesítve

A két sejtvonal egyidejű elemzéséből nyert összesített rangsor eltér a sejtvonalanként felállított rangsortól. Ebben az esetben a legstabilabbnak a *CNOT4*, *GAPDH*, *TBP*, *PUM1* és *PCBP1* gének mutatkoztak. Legkevésbé alkalmasnak pedig az *ACTB*, *RPL30* és *PPIA* gének. Az kapott értékek összehasonlítása alapján megállapíthatjuk, hogy ugyan sikerült mindkét sejtvonalra a sejtciklus során stabil referenciagént találni, azonban az eredmények közti eltérések rámutatnak arra, hogy ezek nem univerzális referenciagének (19. ábra). Éppen ezért elmondható, hogy amennyiben korábban nem vizsgált sejtvonalon szeretnénk génexpressziós méréseket végezni a sejtciklus nyomon követésére, a kísérletsort mindenképpen az alkalmazni kívánt referenciagén sejtciklus során való stabilitásának ellenőrzésével kell kezdeni. A dolgozatom segítséget nyújt mind a referenciagének kiválasztásában, mind pedig a stabilitási vizsgálat elvégzésében.



19. ábra Az egyes csoportokon kapott öt legstabilabb expresszióval rendelkező gén alkalmazhatósága

7 Összefoglalás

Munkám kezdetén célul tűztem ki olyan referenciagének azonosítását, amelyek a sejtciklus teljes folyamata alatt stabil mRNA expresszióval rendelkeznek. Kiválasztottam kettő, jól szinkronizálható humán rákos sejtvonalat (U937, MOLT4), amelyek sejtciklusát RO-3306 kezelés segítségével G2/M fázisban blokkoltam. A szinkronizált sejteket felengedés után szabályos időközönként legyűjtöttem, az U937 sejteket két óránként, a MOLT4 sejteket négy óránként. FACS méréssel határoztam meg, melyik legyűjtés esetén a sejtek melyik fázisban dúsultak fel leginkább, ez alapján tudtam vizsgálni az egyes gének expressziójának sejtciklus függését. A kutatócsoport korábbi munkája alapján 12 referenciagén jelöltet vizsgáltam, amelyek mRNA kifejeződését RT-qPCR módszerrel elemeztem. A minták teljes RNS tartalmát oszlopos kit alkalmazásával izoláltam, az RNS izolátumok mennyiségét és szennyezettségét NanoDrop segítségével határoztam meg, a mintákban az RNS-ek épségét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem. A mintákban található összes RNS-t átírtam cDNS-sé random hexamer primer technika alkalmazásával reverz transzkripció során. A kapott cDNS mintákon 12 referenciagén expresszióját mértem meg qPCR módszerrel.

A kapott adatokat három, egymástól független módszerrel értékeltem ki, az összehasonlító ΔC_t módszerrel, a BestKeeper és a NormFinder szoftverekkel. Az eredmények minden esetben egy, a gének stabilitását reprezentáló rangsorként adódtak. Az eredményeket vizsgáltam az egyes sejtvonalakon és a két sejtvonalra összegezve is. A kiértékelés alapján elmondható, hogy MOLT4 sejtek esetén a *CNOT4*, *TBP* és *GAPDH*, míg U937 sejtek esetén *SNW1*, *TBP* és *RPL30* a három legalkalmasabb referenciagén. Az összesített adatok kiértékelése alapján MOLT4 és U937 sejteken egyidejűleg végzett mérések esetén az *SNW1*, *GAPDH* és *RPL30* gének a legjobb választások referenciaértéknek. Továbbá megállapítható az is, hogy az *IPO8*, *PPIA* és *ACTB* egyik sejtvonalon sem a legalkalmasabb referenciagénnek, habár az irodalomban gyakran alkalmazzák ezeket sejtciklus-függő génexpresszió normalizálásakor.

Mint arra munkám is rámutat, génexpressziós szintek mérése esetén a kísérlet tervezése során minden esetben szükséges a használni kívánt referenciagének ellenőrzése, és kiválasztásuk során körültekintően kell eljárni. A dolgozatomban ebben kíván segítséget nyújtani a sejtciklust vizsgáló kutatások számára. Eredményeim megerősítik azt a korábbi megfigyelést, hogy a *CNOT4* és az *SNW1* gének megfelelően alkalmazhatóak referenciagénként.

8 Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Vértessy G. Beátának, a belém fektetett bizalmat és támogatást, amely nélkül nem születhetett volna meg ez a dolgozat.

Köszönettel tartozom konzulenseimnek Nagy Nikolettnek és Tóth Otíliának, a folyamatos segítségért, támogatásért, türelemért és takácsokért, amelyeket a munkám során nyújtottak nekem. Illetve köszönöm a kutató csoport összes tagjának, hogy barátságos légkörben tudtam velük együtt dolgozni, és bátran fordulhattam hozzájuk kérdéseimmel.

Továbbá hálával tartozom családomnak, akik minden szükséges támogatást és szeretetet megadtak, hogy ez a dolgozat elkészülhessen.

9 Felhasznált irodalom

- [1] M. Kubista *et al.*, “The real-time polymerase chain reaction.,” *Mol. Aspects Med.*, vol. 27, no. 2–3, pp. 95–125, Jun. 2006, doi: 10.1016/j.mam.2005.12.007.
- [2] R. Higuchi, C. Fockler, G. Dollinger, and R. Watson, “Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 11, no. 9, pp. 1026–1030, Sep. 1993, doi: 10.1038/nbt0993-1026.
- [3] M. L. Wong and J. F. Medrano, “Real-time PCR for mRNA quantitation.,” *BioTechniques*, vol. 39, no. 1, pp. 75–85, Jul. 2005, doi: 10.2144/05391RV01.
- [4] A. Tichopad, M. Dilger, G. Schwarz, and M. W. Pfaffl, “Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 31, no. 20, p. e122, Oct. 2003, doi: 10.1093/nar/gng122.
- [5] C. A. Heid, J. Stevens, K. J. Livak, and P. M. Williams, “Real time quantitative PCR.,” *Genome Res.*, vol. 6, no. 10, pp. 986–994, Oct. 1996, doi: 10.1101/gr.6.10.986.
- [6] N. von Ahsen, E. Schütz, V. W. Armstrong, and M. Oellerich, “Rapid Detection of Prothrombotic Mutations of Prothrombin (G20210A), FactorV (G1691A), and Methylenetetrahydrofolate Reductase (C677T) by Real-Time Fluorescence PCR with the LightCycler,” *Clin. Chem.*, vol. 45, no. 5, pp. 694–696, May 1999, doi: 10.1093/clinchem/45.5.694.
- [7] S. A. Bustin, “Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.,” *J. Mol. Endocrinol.*, vol. 25, no. 2, pp. 169–193, Oct. 2000, doi: 10.1677/jme.0.0250169.
- [8] J. Nygren, N. Svanvik, and M. Kubista, “The interactions between the fluorescent dye thiazole orange and DNA,” *Biopolymers*, Jul. 1998.
- [9] K. M. Ririe, R. P. Rasmussen, and C. T. Wittwer, “Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction.,” *Anal. Biochem.*, vol. 245, no. 2, pp. 154–160, Feb. 1997, doi: 10.1006/abio.1996.9916.
- [10] M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, and R. H. Berg, “Peptide nucleic acids (PNA). Oligonucleotide analogs with an achiral peptide backbone,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 114, no. 5, pp. 1895–1897, Feb. 1992, doi: 10.1021/ja00031a062.
- [11] J.-M. Costa, P. Ernault, M. Olivi, T. Gaillon, and K. Arar, “Chimeric LNA/DNA probes as a detection system for real-time PCR.,” *Clin. Biochem.*, vol. 37, no. 10, pp. 930–932, Oct. 2004, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2004.05.020.
- [12] D. Shrestha, A. Jenei, P. Nagy, G. Vereb, and J. Szöllősi, “Understanding FRET as a research tool for cellular studies.,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 4, pp. 6718–6756, Mar. 2015, doi: 10.3390/ijms16046718.
- [13] B. Caplin, Rasmussen, P. Bernard, and C. Wittwer, “The most direct way to monitor PCR amplification for.”
- [14] S. Tyagi and F. R. Kramer, “Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization.,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 14, no. 3, pp. 303–308, Mar. 1996, doi: 10.1038/nbt0396-303.

- [15] U. E. Gibson, C. A. Heid, and P. M. Williams, "A novel method for real time quantitative RT-PCR.," *Genome Res.*, vol. 6, no. 10, pp. 995–1001, Oct. 1996, doi: 10.1101/gr.6.10.995.
- [16] P. S. Bernard and C. T. Wittwer, "Homogeneous amplification and variant detection by fluorescent hybridization probes.," *Clin. Chem.*, vol. 46, no. 2, pp. 147–148, Feb. 2000, doi: 10.1093/clinchem/46.2.147.
- [17] S. A. Bustin, "Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems.," *J. Mol. Endocrinol.*, vol. 29, no. 1, pp. 23–39, Aug. 2002, doi: 10.1677/jme.0.0290023.
- [18] G. Bonnet, S. Tyagi, A. Libchaber, and F. R. Kramer, "Thermodynamic basis of the enhanced specificity of structured DNA probes.," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 96, no. 11, pp. 6171–6176, May 1999, doi: 10.1073/pnas.96.11.6171.
- [19] A. Ståhlberg, J. Håkansson, X. Xian, H. Semb, and M. Kubista, "Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification.," *Clin. Chem.*, vol. 50, no. 3, pp. 509–515, Mar. 2004, doi: 10.1373/clinchem.2003.026161.
- [20] F. Souazé, A. Ntodou-Thomé, C. Y. Tran, W. Rostène, and P. Forgez, "Quantitative RT-PCR: limits and accuracy.," *BioTechniques*, vol. 21, no. 2, pp. 280–285, Aug. 1996, doi: 10.2144/96212rr01.
- [21] B. Kozera and M. Rapacz, "Reference genes in real-time PCR.," *J. Appl. Genet.*, vol. 54, no. 4, pp. 391–406, Nov. 2013, doi: 10.1007/s13353-013-0173-x.
- [22] M. Sorof Uddin and Q. Cheng, "Recent application of biotechniques for the improvement of mango research," in *Applied plant genomics and biotechnology*, Elsevier, 2015, pp. 195–212.
- [23] M. R. Paule and R. J. White, "Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 28, no. 6, pp. 1283–1298, Mar. 2000, doi: 10.1093/nar/28.6.1283.
- [24] W. J. de Leeuw, P. E. Slagboom, and J. Vijg, "Quantitative comparison of mRNA levels in mammalian tissues: 28S ribosomal RNA level as an accurate internal control.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 17, no. 23, pp. 10137–10138, Dec. 1989, doi: 10.1093/nar/17.23.10137.
- [25] H. Zhong and J. W. Simons, "Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 259, no. 3, pp. 523–526, Jun. 1999, doi: 10.1006/bbrc.1999.0815.
- [26] E. Spanakis, "Problems related to the interpretation of autoradiographic data on gene expression using common constitutive transcripts as controls.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 21, no. 16, pp. 3809–3819, Aug. 1993, doi: 10.1093/nar/21.16.3809.
- [27] J. Jo *et al.*, "Conventionally used reference genes are not outstanding for normalization of gene expression in human cancer research.," *BMC Bioinformatics*, vol. 20, no. Suppl 10, p. 245, May 2019, doi: 10.1186/s12859-019-2809-2.
- [28] R. D. Barber, D. W. Harmer, R. A. Coleman, and B. J. Clark, "GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues.," *Physiol. Genomics*, vol. 21, no. 3, pp. 389–395, May 2005, doi: 10.1152/physiolgenomics.00025.2005.
- [29] N. W. Seidler, "GAPDH and intermediary metabolism.," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 985, pp. 37–59, 2013, doi: 10.1007/978-94-007-4716-6_2.
- [30] W. Ruan and M. Lai, "Actin, a reliable marker of internal control?," *Clin. Chim. Acta*, vol. 385, no. 1–2, pp. 1–5, Oct. 2007, doi: 10.1016/j.cca.2007.07.003.

- [31] G. Hou, Z. Lu, J. Jiang, and X. Yang, “Ribosomal protein L32 enhances hepatocellular carcinoma progression,” *Cancer Med.*, vol. 12, no. 9, pp. 10791–10803, May 2023, doi: 10.1002/cam4.5811.
- [32] S. Xue and M. Barna, “Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 13, no. 6, pp. 355–369, May 2012, doi: 10.1038/nrm3359.
- [33] E. Kriegova *et al.*, “PSMB2 and RPL32 are suitable denominators to normalize gene expression profiles in bronchoalveolar cells,” *BMC Mol. Biol.*, vol. 9, p. 69, Jul. 2008, doi: 10.1186/1471-2199-9-69.
- [34] I. Davidson, “The genetics of TBP and TBP-related factors,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 28, no. 7, pp. 391–398, Jul. 2003, doi: 10.1016/S0968-0004(03)00117-8.
- [35] S. Kim *et al.*, “YWHAZ and TBP are potential reference gene candidates for qPCR analysis of response to radiation therapy in colorectal cancer,” *Sci. Rep.*, vol. 13, no. 1, p. 12902, Aug. 2023, doi: 10.1038/s41598-023-39488-6.
- [36] J. E. Miller and J. C. Reese, “Ccr4-Not complex: the control freak of eukaryotic cells,” *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 47, no. 4, pp. 315–333, Aug. 2012, doi: 10.3109/10409238.2012.667214.
- [37] G. A. Rácz, N. Nagy, J. Tóvári, Á. Apáti, and B. G. Vértessy, “Identification of new reference genes with stable expression patterns for gene expression studies using human cancer and normal cell lines,” *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, p. 19459, Sep. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-98869-x.
- [38] W. Gu *et al.*, “Experimental assessment of robust reference genes for qRT-PCR in lung cancer studies,” *Front. Oncol.*, vol. 13, p. 1178629, May 2023, doi: 10.3389/fonc.2023.1178629.
- [39] C. E. Olgun and M. Muyan, “SNW1 (SNW domain containing 1),” *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.*, no. 6, Nov. 2018, doi: 10.4267/2042/68909.
- [40] J. Vandesompele *et al.*, “Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes,” *Genome Biol.*, vol. 3, no. 7, p. RESEARCH0034, Jun. 2002, doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034.
- [41] S. A. Bustin *et al.*, “The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments,” *Clin. Chem.*, vol. 55, no. 4, pp. 611–622, Apr. 2009, doi: 10.1373/clinchem.2008.112797.
- [42] F. Xie, P. Xiao, D. Chen, L. Xu, and B. Zhang, “miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs,” *Plant Mol. Biol.*, Jan. 2012, doi: 10.1007/s11103-012-9885-2.
- [43] M. W. Pfaffl, A. Tichopad, C. Prgomet, and T. P. Neuvians, “Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 26, no. 6, pp. 509–515, Mar. 2004, doi: 10.1023/B:BILE.0000019559.84305.47.
- [44] W. De Spiegelaere *et al.*, “Reference gene validation for RT-qPCR, a note on different available software packages,” *PLoS ONE*, vol. 10, no. 3, p. e0122515, Mar. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0122515.
- [45] M. Shakeel, A. Rodriguez, U. B. Tahir, and F. Jin, “Gene expression studies of reference genes for quantitative real-time PCR: an overview in insects,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 40, no. 2, pp. 227–236, Feb. 2018, doi: 10.1007/s10529-017-2465-4.

- [46] S. van den Heuvel, “Cell-cycle regulation.,” *WormBook*, pp. 1–16, Sep. 2005, doi: 10.1895/wormbook.1.28.1.
- [47] J. Lew, “MAP kinases and CDKs: kinetic basis for catalytic activation.,” *Biochemistry*, vol. 42, no. 4, pp. 849–856, Feb. 2003, doi: 10.1021/bi0269761.
- [48] V. W. Yang, “The Cell Cycle,” in *Physiology of the gastrointestinal tract*, Elsevier, 2018, pp. 197–219.
- [49] Z. Wang, “Cell cycle progression and synchronization: an overview.,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 2579, pp. 3–23, 2022, doi: 10.1007/978-1-0716-2736-5_1.
- [50] S. Sunada, H. Saito, D. Zhang, Z. Xu, and Y. Miki, “CDK1 inhibitor controls G2/M phase transition and reverses DNA damage sensitivity.,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 550, pp. 56–61, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.bbrc.2021.02.117.
- [51] G. Chen and X. Deng, “Cell synchronization by double thymidine block.,” *Bio Protoc*, vol. 8, no. 17, Sep. 2018, doi: 10.21769/BioProtoc.2994.
- [52] S. F. Ibrahim and G. van den Engh, “Flow cytometry and cell sorting.,” *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, vol. 106, pp. 19–39, 2007, doi: 10.1007/10_2007_073.