

XXXI. OTDK Biológia szekció
SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
ORVOSI BIOLÓGIAI INTÉZET



**Antiszensz RNS-ek szerepe a génműködés
szabályozásában**

Készítette: Csabai Zsolt SZTE TTIK Biológia MSc I
Témavezetők: Dr. Boldogkői Zsolt és Dr. Tombácz Dóra

Szeged

2012

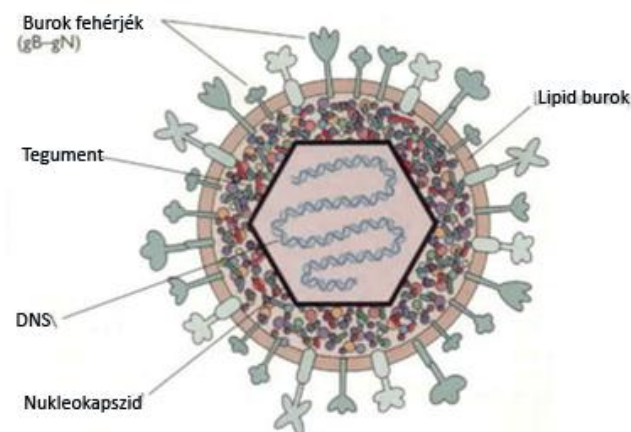
Tartalomjegyzék:

Bevezetés	4
Antiszensz RNS-ek	5
Nc(non coding az nem-kódoló)RNS-ek	5
NAT (Natural antisense transcript)	5
Vírus genom.....	6
<i>ie180</i> gén	6
<i>ep0</i> gén (early protein 0)	7
<i>us1</i> gén.....	7
<i>ul41</i> (VHS)	7
LAT és AST	7
Célkitűzések	9
Anyag és módszer.....	10
Sejt- és vírusfenntartás, fertőzés	10
Totál RNS izolálás	10
Kezelés TurboDNase-zal	11
Primer tervezés	11
Reverz transzkripció	11
cDNS konverzió.....	12
Real-Time PCR.....	14
Primer analízis	15
Szekvenálás.....	16
VHS mutáns készítése	16
Relatív kópiaszám meghatározás	16
Eredmények	17
TIN (Transcription Interference Network)	18
Waterfall model (Vizesés modell)	19
SeeSaw model (Libikóka modell).....	20
Divergensen átfedő gének	20

Konvergensen átfedő protein-kódoló gének	23
A kiterjesztett Libikóka modell	23
Összefoglalás	25
Referenciák	26
Köszönetnyilvánítás	31
Függelék	32

Bevezetés

Az Aujeszky féle vírus (AyV) az α -herpeszvírusok alcsaládjába tartozó (duplaszálú) dsDNS vírus. Az Aujeszky-féle betegséggel kapcsolatban került ez a vírus előtérbe, mint egy, a sertéseket megbetegítő vírus. Az általa okozott tünetek miatt régebben „álveszettség”-ként ismerték. Először 1902-ben Aujeszky Aladár írta le önálló betegségként [1]. Az AyV-t előszeretettel alkalmazzák modellorganizmusként, hiszen egy neurotróp vírusról van szó, mely így ideális neuronális nyomjelző *in vivo* vizsgálati körülmények között is. A vírus nem humánpatogén, ellenben számos emlős sejt típusra nézve fertőző tulajdonsággal bír (1. Ábra).



1.ábra Herpesz szimplex vírus

Az AyV genomja nagyjából 150 kb (kilobázis), s 70 proteint kódoló génje van. A vírus teljes genomszekvenciája ismert. Az AyV nem csupán neuronális nyomjelzőként használható, hanem a transzkripcionális szabályozás vizsgálatához is remek modellorganizmusnak számít, ugyanis kompakt genomi struktúrával, csekély mennyiségű intronnal, valamint nagyon rövid intergenikus régiókkal rendelkezik [2]. Ezen kívül még fontos tulajdonsága, hogy a replikációs ciklusa gyors, mintegy 24 órát igényel a fertőző „utód” létrehozásához.

Más herpeszvírusokhoz hasonlóan, génjei a lítikus ciklus során kaszkádszerűen íródnak le, a gének a transzkripció kinetika, valamint más géntermékektől való függésük alapján 3 fő csoportra oszthatók: azonnali korai (IE; immediate early), korai (E; early) és kései (L; late). Elsőként az IE gének íródnak le, melyek expressziója független a *de novo* proteinszintézistől.

Az azonnali korai gének termékei általában transzkripció faktorok, vagy egyéb szabályozó fehérjék. Ezek az IE géntermékek fontos szerepet töltenek be az E gének transzkripciójában. Az early transzkriptek DNS anyagcserében és replikációban vesznek részt. A late gének – melyeknek főként a struktúrfehérjék kifejeződésében van szerepük, mint a tegument, kapszid, köpeny felépítése- működése részlegesen, vagy teljes mértékben a virális DNS replikációtól függ (1.ábra).

Antiszensz RNS-ek

Nc(non coding, azaz nem-kódoló)RNS-ek

A jelenkori technológiai fejlődés lehetővé teszi a genomok expresziójának nagy felbontásban való vizsgálatát. Az utóbbi évek genomikai eredményei azt mutatják, hogy a transzkriptumnak csak nagyon kis hányadát teszik ki a fehérje kódolásban közvetítőként szerepet játszó mRNS-ek [3], [4], [5] és [6]. Arról pedig még mindig folyik a vita, hogy ez a nagyfokú átírás csupán transzkripció zajként kezelendő, vagy pedig a ncRNS-ek rendelkeznek olyan funkcióval, amit még nem ismerünk [7], [8], [9]. Az elmúlt néhány évben több ncRNS-t fedeztek fel különböző funkciókkal, ez egy rejtett szintje a transzkriptom komplexitásának. Úgy tűnik tehát, hogy a ncRNS-ek egy nagyfokú, komplex szabályozó hálózatot alkotnak, melyek több szinten szabályozzák a génexpressziót [10].

NAT (Natural antisense transcript)

Az elmúlt években az a nézet, miszerint az RNS csupán egy passzív közvetítő a DNS és a fehérjék között, mára gyökeresen megváltozott. A NAT-ok tulajdonképpen a DNS nem kódoló száláról íródnak le, melyek teljes vagy részleges komplementerei az mRNS-eknek. Két csoportra oszthatjuk őket a cisz-NAT és az a transz-NAT. A cisz-NAT vagy másnéven átfedő RNS-es, az ellenkező szálról íródik át, de az mRNS-sel azonos lokuszról, valamint mind a neve is mutatja, részben, vagy teljesen átfed az mRNS-sel. Ezzel szemben a transz-NAT másik lokuszról átíródó szekvencia, amely nem tökéletes komplementere a szabályozni kívánt mRNS-nek, de nagy százalékban megegyezik vele [11]. A transz-NAT-nek két fontos képviselője van, az egyik a miRNS, a másik pedig a kis interfeláló, azaz siRNS. A miRNS-ek posztranszkripcionálisan szabályozzák a gént a komplement szekvenciához kötődve, míg a kis

RNS-ek két módon hatnak [12], [13]. Egyrészt a kromatin módosításban játszanak szerepet DNS metiláció és hiszton módosítás révén, másrészt pre-transzkripcionálisan szabályozzák a polimeráz II bekötődését, ezzel együtt az aktivitását képesek gátolni [14], [15].

A *Herpesviridae* család tagjai sokáig nem merültek fel, mint a lehetséges antiszensz szabályozás vizsgálatának tárgyai, annak ellenére, hogy Bernard Roizman az 1970-es évek közepén a HSV-ben megfigyelt duplex RNS-ekről írt [16].

Vírus genom:

A gének egymáshoz viszonyítva különbözőképpen helyezkedhetnek el. Az AyV genomstruktúrája jellegzetes, moduláris szerkezetű. Vannak tandem elhelyezkedő gének, ezek között található egymásba ágyazódott, azaz nested gének is. Egyes gének, géncsoportok az egymáshoz viszonyított irányultságuk alapján lehetnek konvergensek vagy divergensek. A konvergens gének a 3' UTR régióban fedhetnek át, azonban találtak már ORF-ORF régióban átfedő géneket is, de ez nagyon ritka. A divergens gének azonban egymáshoz viszonyítva ellentétes orientációban állnak, léteznek 5'-5' UTR átfedő gének, 5' UTR-ORF átfedések, valamint ORF-ORF átfedések is.

Két egyedi régiója van a genomnak (US: unique short; UL: unique long), az internális és terminális végén repeat szekvenciák vannak (IRS és TRS). A vírusnak 3 replikációs kezdőpontja (OriL és két OriS) van, amelyek az UL régióban találhatók. Az AyV-nak összesen 70 fehérje kódoló génje van, melyek közül 40 az UL régióban helyezkedik el, s amelyek nélkülözhetetlen szerkezeti fehérjéket kódolnak. A struktúrgének a herpeszvírus családban igen konzervatívak [17], [18], [19]. A vírusnak három kulcsfontosságú, szabályozó (regulátor) génje van: az *ie180*, az *ep0*, és az *us1*. Az utóbbi időben az endoribonukleáz (RNáz) aktivitással rendelkező, *ul41* gént is ide sorolják (2.ábra)..

ie180 gén

Az AyV egyetlen IE génje, amely két kópiában található meg (IRS és TRS régióban is). Nagyon sok génre nézve aktiváló hatással bír azonban az *ul41*-es gént nagy dózisban legátolja, kis dózisban azonban ezt is serkenti. Ha a gént kiütjük, akkor egyetlen vírusfehérje sem kerül átírásra [17].

***ep0* gén (early protein 0)**

Az *ep0* az UL régióban kódolódó korai gén, transzkripció aktivátor szereppel bír. A fertőzést követően a második órában már intenzíven kifejeződik. Az *ie180* és az *ul23* gének expresszióját aktiválja, azonban az *ul41* gén kifejeződését gátolja. Az *ep0* komplementer az úgynevezett large latency transcript-tel (LLT), mely egyike a vírus két ismert, önálló promóterrel rendelkező antiszensz RNS-ének. RING finger doménnel kapcsolódik az *ie180* és *ul23* gének promóteréhez [17], [18].

***us1* gén**

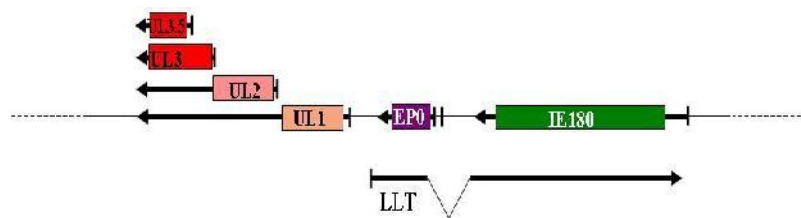
Az *ie180*-hoz hasonlóan ez is két kópiában található meg a vírus genomjában (IRS és TRS). Az *us1* is egy korai gén, amely részt vesz más gének transzkripciójának szabályozásában és ezen kívül antiapoptotikus feladatot lát el [17].

***ul41* (VHS)**

Az *ul41* gén által kódolt VHS protein egy ribonukleáz (RNáz) aktivitással rendelkező, a saját és a gazdasejt mRNS-ét lebontó fehérje, tehát szabályozza mind a vírus mind a sejt génexpresszióját és blokkolja a sejt saját fehérjéinek szintézisét is [17], [19].

LAT és AST – a két ismert, önálló promóterrel rendelkező antiszensz transzkript

Több, mint két évtizede ismert a herpeszvírusok látens állapotában leíró egyik génje a LAT: latency-associated transcript (LLT: large latency transcript) (2. Ábra). Először, 1984-ben a HSV-nél (Herpes simplex) mutatták ki *in situ* hibridizációval [20] majd 1987-ben Northern-blottal is detektálták [21], [22]. A másik az AST (AntiSense Transkript). Az ún. putatív antiszensz promóter (ASP), amely a PRV inverted repeat (IR) régiójában található - s ebből kifolyólag két kópiában van jelen - az AST expressziójának a szabályozásában játszik szerepet. Kimutatták, hogy egy pontmutáció ebben az ASP régióban a PRV virulenciáját képes lecsökkenteni [23].



2.ábra Az AyV genom LLT-t kódoló régiójának sematikus ábrája

A LAT-AST régió gyakorlatilag a vírusgenom két kulcsgénjével (*ep0* és *ie180*) esik egybe. Korábban úgy gondolták, hogy e két, latenciában aktív RNS gén valójában egy transzkript, mely splicingon esik át. Ilyen formában LLT (Large Latency Transcript) néven ismert.

Összgenomszintű expressziós vizsgálatot neurotróp herpeszvírusoknál eddig csak a mi kutatócsoportunk végzett. Így konkrét, az antiszensz-RNS-ek kutatására irányuló kísérletet sem végeztek még. Egyedül a β -herpeszvírusok egyik tagjával, a citomegalovírusnál (HCMV) [24] mutatták ki, hogy a DNS minkét száláról folyik transzkripció.

Célkitűzések

Terveink között szerepelt, az AyV mind a 70 génjének kinetikai vizsgálata. Célunk (volt) számos, kulcsfontosságú, szabályozó gén (*ep0*, *vhs*, *us1*, *ul54*) hatásának analízise knock-out mutáns vírusokban. Kíváncsiak voltunk arra, hogy van-e valamilyen jelentősége annak, hogy a vírusgének sajátos elrendeződés szerint helyezkednek el a genomban, s hogy ennél a vírusról is igaz-e az egyre nagyobb számban, a legkülönbözőbb fajoknál megfigyelhető, nagymértékű antiszensz RNS jelenlét, expresszió.

A gének kifejeződését szálspecifikus primerek segítségével kívántuk vizsgálni, reverz transzkripciót követő real-time PCR segítségével. A szálspecifikus primerek használata a reverz transzkripció során lehetővé teszi a szensz (mRNS) és antiszensz RNS szálak elkülönítését. Célunk volt azonban az antiszensz RNS-ek kimutatására egy párhuzamos technika kidolgozása is. Egy olyan módszert kívántunk kidolgozni, mely a reverz transzkripció során esetlegesen előforduló fals (primer aspecifikus helyre való bekötődése) és self primingot (mRNS visszahajlása, s ezáltal, a komplementer szál megírása), illetve azt az eseményt, amikor a reverz transzkriptáz enzim a második cDNS szálát is megírja, elkerüli. Az előbbi két eset elkerülésére cDNS konverziót, míg a harmadik eset elkerülésének biztosítására RNS konverziót terveztünk, melyhez a DNS metiláció vizsgálatához használt biszulfid konverzió módszerét kívántuk használni. Ezzel a módszerrel ugyanis elérhettük azt, hogy a komplementer RNS szálak (szensz és antiszensz) elvesztik komplementaritásukat. A konvertált szálakat „konverzió specifikus” primerekkel szerettük volna felszaporítani, s a szekvenciákat pirosekvenátorral azonosítani. Ezen eredmények nyomán pedig szerettünk volna felállítani egy olyan hipotézist mely magyarázatot ad a gének kifejeződésének időbeliségére a közöttük lévő kölcsönhatások alapján, s az antiszensz RNS-ek szerepére.

E sokrétű, összetett kísérlet-sorozatban én az antiszensz RNS-ek detektálásában, analízisében vettem részt, így a hangsúlyt dolgozatomban ezekre, illetve az ezen eredményekből született módszerekre, hipotézisekre helyezem.

Anyag és módszer:

Sejt- és vírusfenntartás, fertőzés:

A kísérleteinkhez az AyV Kaplan (Ka) törzsét és knock-out mutánsait használtuk. A vírusokat sertésvese sejtvonalon (porcine kidney 15, PK-15) szaporítottuk. A PK-15 sejtkultúrát 37°C-on, CO₂ termosztátban (5% CO₂), Dulbecco's modified Eagle medium-ban (DMEM) tartottuk fenn. A DMEM oldathoz 5% fetal bovine serumot (Gibco) és ml-enként 80 µl gentamicint (Gibco) adtunk.

A fertőzés során 1 pfu (plaque forming units)/sejt mennyiségű Ka vírustörzzsel (illetve ún. knock-out mutánsokkal) fertőztük meg a PK sejteket. Egy óra inkubáció után DMEM oldatot adtunk hozzá, majd 1, 2, 4, 6, 8, 12, illetve 24 óra után leállítottuk a fertőzést. Lecentrifugáltuk (5 perc, 1000 rpm, 4°C) a sejteket, majd 20 ml PBS-el mostuk a sejteket ugyanezen körülmények között centrifugálva és végül -80°C-on tároltuk őket.

Totál RNS izolálás:

Az előbbieken említett fertőzött sejtekből az RNS izolálása és tisztítása NucleoSpin RNA II Kit-el történt és a hozzá tartozó protokoll alapján dolgoztunk.

Az RNS tisztítás első lépéseként a lecentrifugált fertőzött sejteket, β-merkaptóetanollal, RA1 lízis pufferrel valamint proteinázK-val kezeltük. A lízis puffer segít az RNS-ek membránhoz való kötődésében, valamint inaktiválja az RNázok működését. Ezután a Kit-hez tartozó speciális filterhez kötöttük az RNS-t és egy rövid centrifugálás után 70%-os etanollal mostuk. A preparátumokat ezek után a szintén Kit-hez tartozó szilika membránra vittük, melyre az RNS-ek a centrifugálás során kötődnek ki. Hozzáértünk ezután MDB puffert mely azért fontos mivel sóelvonó hatású, így növelve később a DNáz-ok hatékonyságát. A membránra azonban nem csak az RNS, hanem a DNS is képes kikötődni ezért DNáz I-es kezelést végeztünk. Ezt követően újra centrifugálás következett az RA2 pufferrel, mely szerepe, hogy

inaktiválja a DNáz-t. A következő lépésben az RA3 pufferrel mostuk a membránra kikötött RNS-eket kétszeri ismétléssel, majd a membránról az eluciót RNáz mentes vízzel végeztük, így megkapva a tisztított totál RNS-t.

Kezelés TurboDNase-zal:

A teljes DNS-mentesség elérése érdekében a 60 µl végtérfogatú RNS-eket TurboDNase-zal kezeltük: az RNS mintához a 10-szeres Turbo DNase pufferből 1-szeres mennyiséget adtunk (60 µl-hez 6 µl-t), valamint 2 unit Turbo DNase enzimet. A reakcióelegyet 37°C-on inkubáltuk 30 percen keresztül. Az enzimet hővel inaktiváltuk: 75°C-on 10 percig.

A tisztított totál RNS mennyiségének meghatározása BioPhotometer Plus (Eppendorf) segítségével történt. A méréseket 260 nm-en, 3 szoros ismétléssel végeztük.

Primer tervezés:

A primerek tervezését a FastPCR Professional (Primer Digital Ltd.) nevű program segítségével végeztük és az IDT (Integrated DNA Technologies) cégnél szintetizáltattuk. A kísérletsorozat során génenként biztosítékként külső-belső primerekkel dolgozunk a konverzió során használt primerek a belsőek míg a PCR során használt a külső ezzel is növelve a specificitást. A primerek 18-22 bp hosszúságúak az általuk felamplifikált DNS hossz pedig nagyjából 55-120 bp.

Reverz transzkripció:

A reverz transzkripciót (RT) az AyV összes (70) génjére tervezett szálspecifikus primerekkel, azaz a primerpár mindkét tagjával (forward és reverz), külön-külön elvégeztünk. Annak érdekében használtuk a szálspecifikus primereket, hogy a szensz-antiszensz szálat el tudjuk később különíteni. Úgynevezett „külső felviteli” kontrollként a sertés (*Sus scrofa domestica*) 28S rRNS-ére tervezett primerpár használatával is végeztünk reverz transzkripciót. Az RNS mintáink DNS

mentességének bizonyítása érdekében úgynevezett noRT kontroll reakciókat végeztünk: reverz transzkripció SuperScript III enzim hozzáadása nélkül.

Az ismert optikai denzitású totál RNS-ekből 0,07 µg-ot használtunk fel az RT során. A reakcióelegy tartalmazott:

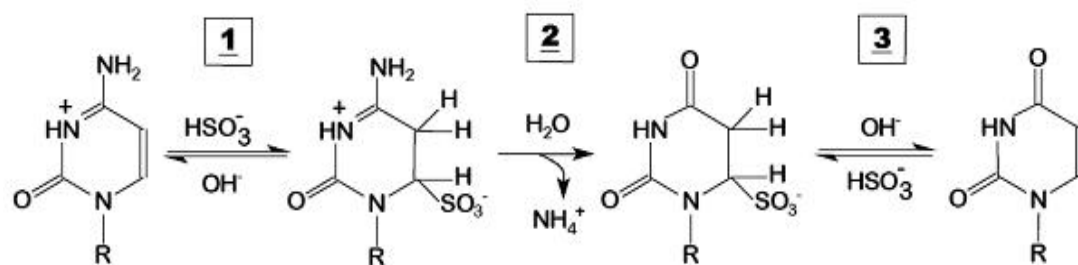
- 1 µl dNTP mix (10 mM-os),
- 1 µl forward, vagy reverz primer (10-10 mM),
- 4 µl SSIII puffer, 0,25 µl DDT,
- 1 µl SSIII enzim
- RNS térfogatától függően nukleázmentes víz.

A végtérfogat 20 µl.

Az egyszálú cDNS-írás első lépéseként az RNS-t, a dNTP mixet, a primert és a vizet mértük össze, majd 5 percen keresztül 65°C-on történő denaturáció és az ezt követő jégen való inkubáció után adtuk hozzá a puffert, a DDT-t és az enzimet. A SuperScript III enzim hosszú féléletideje lehetővé tette, hogy az átírás folyamata 55°C-on történjen, melyre az AyV magas GC tartalma miatt volt szükség. Az 1 órás reakció végén a folyamatot 70°C-os inkubációval állítottuk le. A cDNS-eket nukleáz-mentes vízzel 10-szeresére hígítottuk és -20°C-on tároltuk.

cDNS konverzió:

A cDNS konverziót a Qiagen által gyártott Sodium bisulfite-os módszerrel végeztük (Qiagen EpiTect Bisulfite Kits). Ez a módszer a nem metilált citozinokat alakítja át uracillá. Mivel a vírus cDNS-en nem tapasztaltunk metiláltságot, ezért ezzel a technikával át tudjuk konvertálni specifikus primerek segítségével az össz citozint uracillá. Ezt a technikát teljes cDNS konverzióra eddig egyedülként alkalmaztuk. Maga a technika azért volt számunkra kulcsfontosságú, hiszen ennek segítségével el tudtuk különíteni a szensz és antiszensz szálakat.



Citozin

Citozin-szulfonát

Uracil-szulfonát

Uracil

3.ábra Bisulfid konverzió: 1: Sulphonation; Step 2: hydrolytic deamination and Step 3: alkali-desulphonation

Magát a konverziót a meglévő Qiagen által kiadott protokoll szerint végeztük.

A reakció elegy összetétele:

- cDNS
- RNase free water
- Bisulfite mix
- DNA Protect Buffer

Végül pedig a következő kondíciók alapján megy végbe a konverzió:

Lépés	Idő	Hőmérséklet
Denaturáció	5 perc	95°C
Inkubáció	25 perc	60 °C
Denaturáció	5 perc	95 °C
Inkubáció	85 perc	60 °C
Denaturáció	5 perc	95 °C
Inkubáció	175 perc	60 °C
Várákozás	határozatlan (overnight szobahőn tartható a konvertált minta)	20 °C

1.táblázat: A génkonverzióhoz kapcsolódó kondíciók

A folyamat lezajlása után ki kell nyernünk a konvertált terméket a mixból, a kinyeréshez a Qiagen által gyártott eszközöket használtuk. Első lépésben BL puffert használunk, melyhez carrier RNS-t adunk, ami segítségével a konvertált cDNS-ek nagyobb eséllyel kötődnek ki a membránhoz (ez főként alacsony kópiaszám esetén kulcsfontosságú). Ezután centrifugálást és mosást követően (BW puffer) egy BD puffert adtunk hozzá, mely a 3. ábrán látható deszulfonálási lépésben játszik szerepet, ennek során alakul ki a kész uracil (inkubáció 15 perc 25 °C). Ezt követően újabb mosási lépés következett a BW pufferrel 2-szeri ismétléssel, majd egy 56 °C-on nyitott tetővel inkubáltuk, annak érdekében, hogy a közbeni centrifugálási lépés után megmaradt folyadék el tudjon párologni a membránról. Az EB puffer segítségével eluáltuk a konvertált cDNS-t a membránról, amely szintén a kit tartozéka.

Real-Time PCR:

A Real-Time PCR reakciókat Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Sciences) és Qiagen Rotor Gene Q (Qiagen) készülékekben végeztük. A minták detektálásához SYBRGreen (ABsolute™ QPCR SYBR® Green Mix, Thermo Scientific) interkalálódó (a duplaszálú DNS kis árkába köt), fluoreszcens festéket használtunk.

A reakciókat 20 µl végtérfogatra mértük össze:

- 7 µl cDNS (10x hígítású)
- 10 µl SYBR Green Mix
- 1,5 µl forward primer (2mM)
- 1,5 µl reverz primer (2mM)

A qRT-PCR ciklusokat 35-szörös ismételtsben futtattuk, a 4-4 párhuzamost mindig egyszerre. A folyamat során sokszor van rá esély, hogy fals terméket detektálunk, legyen az primer dimer formájában vagy akár virális DNS.

Lépés	Idő	Hőmérséklet	Ciklus
Elődenaturáció	15 perc	95°C	1
Denaturáció	22 mp	94°C	3
Annealing	6mp	60°C	
Extenzió és detekció	6mp	72C	

2. táblázat: A real-time PCR során alkalmazott kondíciók

Primer analízis:

A kvantitatív Real-Time PCR reakciók előtt minden tervezett primerpárt az alábbi tesztnek vetettük alá: 20 µl végtérfogatú reakcióelegyet állítottunk össze, mely a következő összetevőket tartalmazta: 1,5-1,5 µl (2-2 µl) forward és reverz primer, 10 µl ABSolute qPCR SYBRGreen Mix és 7 µl vírus DNS (Ka törzs).

A qRT-PCR reakciók végén melting-point analízist végeztünk, s így meghatároztuk az adott primerpár által felamplifikált termék olvadáspontját, illetve bizonyosságot szerezhettünk arról, hogy adott körülmények között milyen hatékonysággal működnek a primerek, képeznek-e primer-dimert. A dimert képző primerek esetén megpróbáltuk az RT-PCR kondíciókat (a reakció egyes lépéseinek időtartamát, illetve a hőmérsékletet) változtatni.

A Rotor-Gene (RG) 6000 software Version 1.7.28. használata révén, azoknál a primereknél, ahol az előbb említett módosítások hatására sem sikerült a primer dimert kiküszöbölni, egy, az extenzióánál és a primer-dimer olvadáspontjánál magasabb, a várt specifikus termékénél viszont alacsonyabb hőmérsékletű extra lépést (*) is beállítottunk a PCR ciklusok végére, hogy a készülék ezen a hőmérsékleten is detektáljon. Így a Real-Time PCR készülék szoftvere, az úgynevezett „Comparative

Quantitation” modul használata során, a kópiaszám-meghatározáskor a fals termékekből származó adatokat mintegy levonta a kapott összértékből, s így ezek módosították a valós, vírus RNS-ből származó eredményeket.

Szekvenálás:

A szekvenálási eljárást a Qiagen PyroMark Q24 készülékével végeztük. A szekvenálás elve a pirosekvencíáláson alapul. A szekvenálás során szálspecifikus biotinnal jelölt primert használunk, ugyanis a biotin segítségével tud az adott szál hozzákötődni egy sztreptavidines „ágy”-hoz (Streptavidin Sepharose™ High Performance, GE Healthcare). A DNS másolásakor a beépülő nukleotidról leszakad egy pirofoszfát, ez a pirofoszfát az ATP-szulfuriláz segítségével ATP-t fog eredményezni. Az ATP pedig a luciferáz enzimnek segít, hogy a Luciferin hasításával detektálható felvillanás történjen.

VHS mutáns készítése:

A *vhs* gént tartalmazó *XhoI* DNS fragmented pRL vektorba klónoztuk. Ennek a DNS szakasznak egyetlen *NruI* helye van, ezt *EcoRI* helyre cseréltük ki. LacZ expressziós kazettát használtunk riporter génként, s ezt a human cytomegalovirus promóterével (pCMV) hajtottuk meg, mely egy rendkívül erős promóter. Az így elkészült konstrukciót vad típusú AyV-vel kotranszfektáltuk, s a VHS mutáns vírusok homolog rekombinációval alakultak ki.

Relatív kópiaszám meghatározás:

Az R értékeket, azaz a relatív kópiaszámot az alábbi matematikai modellel számítottuk ki:

$$R = \frac{(E_{sample\ max})^{Ct_{sample\ max}}}{(E_{sample})^{Ct_{sample}}} : \frac{(E_{ref\ max})^{Ct_{ref\ max}}}{(E_{ref})^{Ct_{ref}}}$$

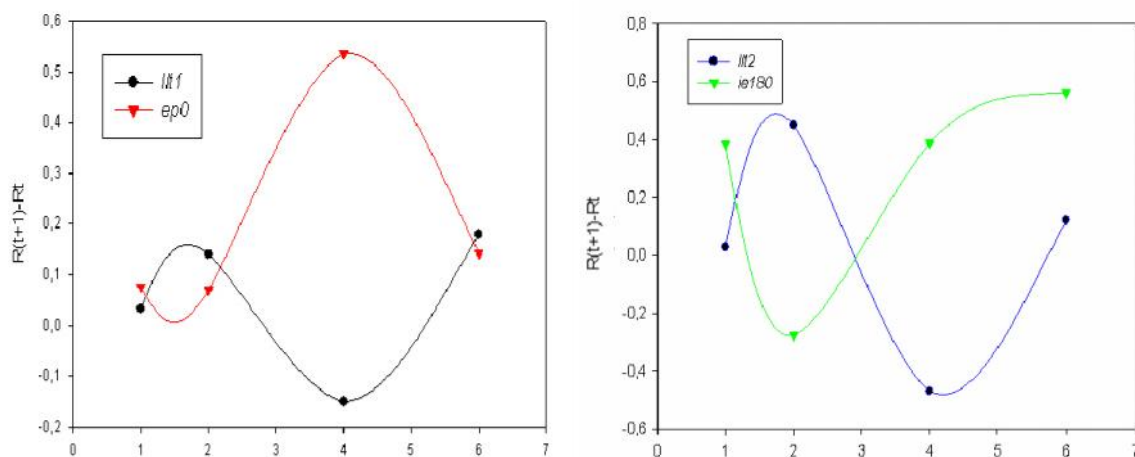
Az R relatív expressziós arány, vagy relatív kópiaszám; az E egy-egy PCR ciklus amplifikációs hatékonysága; a Ct a küszöbfluoreszcencia; a minta az adott vizsgált gént jelenti, míg a ref a 28S rRNS, mint referencia génre vonatkozó értéke.

Eredmények:

Kísérleteink során sikerült az AyV mind a 70 génjének a kinetikáját megvizsgálni a Real-Time RT PCR érzékenysége, valamint az általunk kidolgozott matematikai modell segítségével. Megállapítottuk, hogy a különböző kinetikai osztályokba tartozó gének közé nem húzható egy éles határ, folyamatos átmenetet képeznek és az IE, E és L osztályokba való sorolás egy durva leegyszerűsítés. A Pearson féle korrelációs koefficiens segítségével a géneket 10 különböző osztályba soroltuk.

A teljes genomot vizsgálva összgenom szintű expressziót találtunk mindkét DNS szálra. Az AyV minden génjénél detektáltunk kisebb-nagyobb mértékű antiszensz expressziót. Kimutattuk, hogy egyes genomi régiókban az mRNS szintet is meghaladó antiszensz termék detektálható (1. Számú függelék).

Megfigyeltük azonban, hogy az LLT1 és az LLT2 antiszenszek (vagyis az AST és LAT gének) és a velük komplementer mRNS-ek (*ep0* és a *ie180*) dinamikája inverz lefutású (4. ábra).



4.Ábra Az LLT- és a hozzájuk tartozó mRNS expressziós görbéje

A VHS mutáns segítségével, ahol egy erős CMV promótert tartalmazó konstrukciót állítottunk elő, megfigyeltük, hogy a kiütött génnel szemben lévő konvergens gének antiszensz expressziója jelentősen megnőtt (*ul40*, *ul39*, *ul38*). Ezt a jelenséget a gének túlírása (read-trough) okozza, mely lefolyását és szerepét a későbbiekben tárgyaljuk.

Mindennek kimutatása egyrészt kvantitatív módon qPCR-rel történt. Az esetleges hibák kiküszöbölése érdekében azonban cDNS konverziót alkalmaztunk. A cDNS konverzió tudomásunk szerint egy újítás, még nem alkalmazta senki. A technika azért volt fontos számunkra, hogy kiküszöböljünk a reverz-transzkripció során esetlegesen előforduló aspecifikus, fals terméket. Ilyen fals termék lehet például fals primingből származó termék, amikor is az RT során az mRNS-hez kötődne be az antiszenszre specifikus primer, mely így cDNS-t képezne, amely adott körülmények között, a real-time PCR során akár a várt specifikus terméket is felszaporíthatná. Valamint kiküszöböl olyan hibákat is amikor self priming következtében szintén aspecifikus eredetű, ám végül specifikusnak tűnő terméket detektálnánk. Az RNS konverzióval azt az esetleges folyamatot is kiküszöbölhetjük, amikor a reverz transzkriptáz bár first strand cDNS a specifikuma, mégis megírna a második szálát.

Arról, pedig, hogy a detektált termék tényleg valós, egy szekvenálási lépést alkalmaztunk a módszereknél leírt módon. Az eddig szekvenált géneknél (*ul50* és *ep0*) megerősítést kaptunk a termék valóságáról (lásd 2. Függelék).

Azért e két génnel kezdtük a konvertálás-szekvenálás protokollt, mert elsőként egy olyan génre volt szükség, melynek antiszensz partnere már korábbról ismert (*ep0* és LAT), hogy ezzel magát a módszert validáljuk. Következő lépésben egy olyan gént választottunk (*ul50*), melyről magas antiszensz expressziót detektáltunk a real-time PCR-res kísérleteink során.

Ezen eredmények tudatában néhány érdekes szabályozó modellt állítottunk fel:

TIN (Transcription Interference Network)

A Transzkripciós Interferencia Hálózatok hipotézis megpróbál magyarázattal szolgálni a tandem gének gyakori előfordulására a génklaszterekben és az egész genomra kiterjedő antiszensz RNS aktivitásra a különböző rendszertani csoportokban. A TIN hipotézis szerint a

szomszédos gének transzkripciója során történő átfedések különböző módjai, melyek eredményeként a transzkripciós komplexek ütköznek az átfedő szakaszokon, fontos szabályozó szerepet töltenek be, a két gén ez által egymás inhibitorává válik a transzkripció szintjén. A TIN hipotézis előre vetíti egy új, egész genomra kiterjedő és kulcsfontosságú génszabályozási mechanizmust eukarióta sejtekben és vírusokban. Az egymáshoz közel elhelyezkedő, szomszédos gének tehát strukturális és funkcionális egységeket alkotnak. Ezekben a modulokban található gének különböző módokon fednek át, a konvergensek a 3', míg a divergensek az 5' végükkel. A valós átfedések a leíró részekben elég ritkák a konvergens gének esetében, azonban kínálkozik egy másik lehetőség is. A transzkripciós termináció pontatlansága miatt egyes esetekben a komplex továbbírja az mRNS-t, ami hasonló ütközéshez vezet, mintha a gének átfedőek lennének. A folyamat így gyakorlatilag a transzkripciós apparátus versengésén alapul. Így koordinálja a szomszédos, és közeli lokuszokon elhelyezkedő gének transzkripcióját. Ez jóval egyszerűbb módját teszi lehetővé a szomszédos (és gyakran rokon gének) szabályozását, mint ha a transzkripciós faktorok tennék. A TIN hipotézis két alapvető modellel szolgál.

Waterfall model (Vízesés modell)

A funkcionálisan kapcsolt gének tandem elrendeződésben helyezkednek el a DNS mentén a különféle szervezetekben. Ezen gének többsége a génduplikáció útján keletkezett, azonban ez a konzervált szerkezet hosszú evolúciós időskálán ment keresztül és ez némi magyarázatot kíván. A TIN hipotézis Waterfall modellje a transzkripcionális interferencián alapszik, mely a tandem átfedő gének között figyelhető meg. Ebből következik, hogy az upstream elhelyezkedő gének inhibitorai lesznek a downstream elhelyezkedő gének expressziójának a nem terminált transzkripción keresztül. A herpeszvírusoknál ez a folyamat az ICP27 protein által szabályozott, mely segít felismerni az RNS polimeráz II-nek a gyenge polyA szignálokat [25]. Eredményként egy transzkripciós túlírást kapunk. Paralel elhelyezkedő gének hosszú policisztrionos mRNS-eket generálnak közös 3' végekkel (ún. koterminalis transzkriptokról van szó). A PRV legtöbb tandem géncsoportja hasonló transzkripciós kinetikával rendelkezik [26]. A tandem géneknél a transzkripciós komplexek

ütköznek, aminek eredményeként a transzkripcióban az upstream gének gátolják a downstream gének expresszióját azáltal, hogy az upstream gének inhibitorai a downstream gének transzkripciós preiniciációs faktorainak. Az early gének kifejeződése hatékonyan blokkolja a downstream gének transzkripcióját. Amikor azonban megszűnik az upstream gének blokkoló hatása, akkor downstream gének kinetikailag eltolódva fejeződnek ki. Egy olyan upstream gén, amely későn fejeződik ki, terminálja a korai downstream gén kifejeződését.

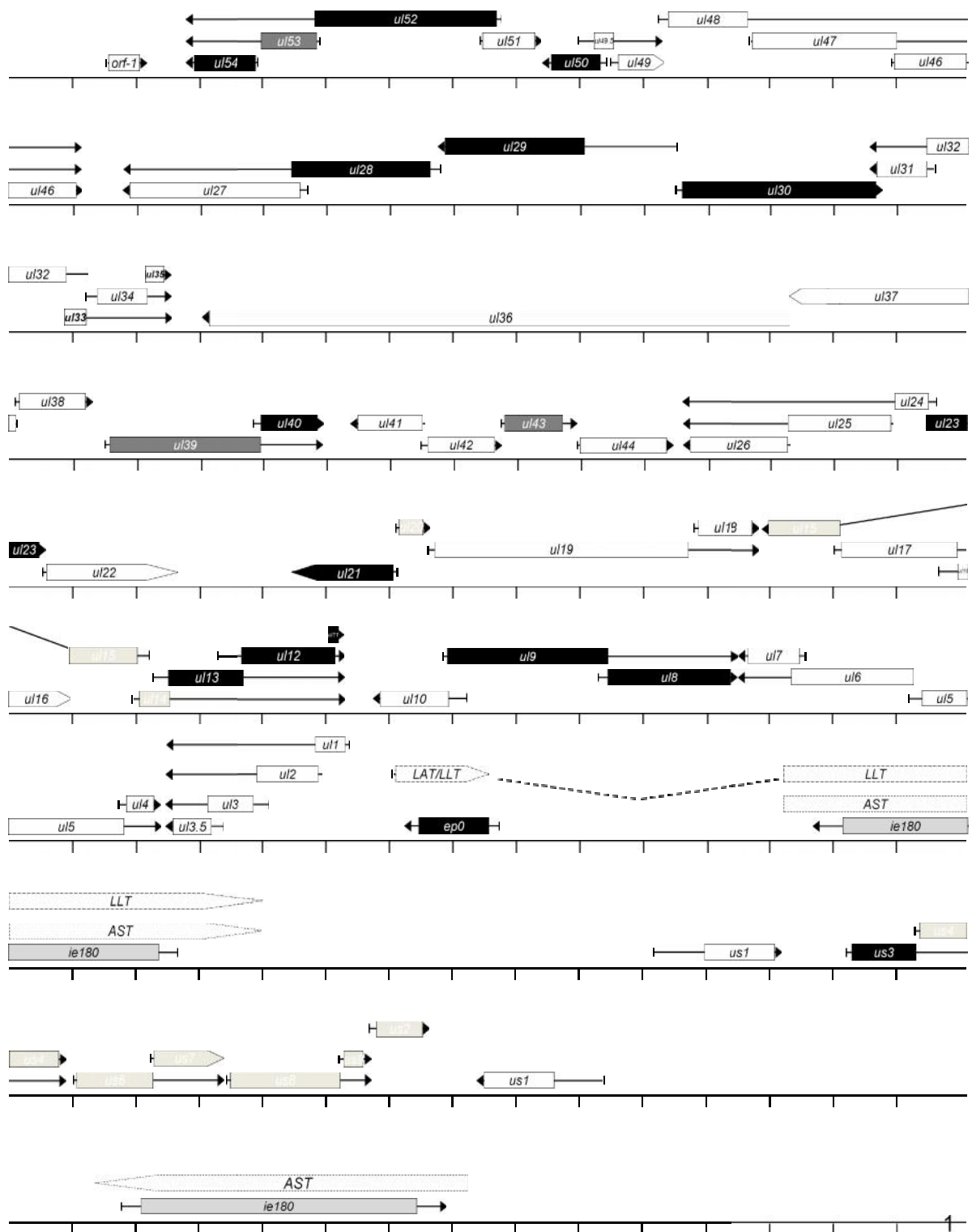
SeeSaw model (Libikóka modell)

A TIN-hipotézis libikóka modellje egyfajta kölcsönös hatást feltételez az egymással szomszédos gének expressziójának szabályozásában. A libikóka-mechanizmus alapja a két vagy több egymással átfedő konvergens vagy divergens állású gén transzkripciója során bekövetkező ütközés az RNS-polimeráz molekulák között.

Divergensen átfedő gének

Egymáshoz képest divergens állású gének gyakran átfednek és képeznek transzkriptumokat 5' átfedő régiókkal [27]. Az AyV génjei közül 11 gén pár fed át a következőképpen 5'-5' UTR (nem transzlálódó régió) átfedés van az *ul41-ul42* gén pár, 5'-UTR – ORF átfedés van az *ul37-ul38* gén párok és ORF-ORF átfedés további 7 gén pár között (közülük 4 két nukleotidban fed át az AUG startkodonban). A vírus két divergens gén párja közös TATA-boxon osztozik [28]. A libikóka modell alapján az egyik gén transzkripciója gátolja a vele divergensen átfedő gén átíródását azáltal, hogy megakadályozza a transzkripciós iniciációs complex összeszerelődését és/vagy lelöki az RNS-polimeráz molekulát a templátról. A virális replikáció egy későbbi fázisában az átírás iránya megváltozhat, az transzkripciós faktorok aktivitásának változása miatt. Így a korábban elnyomott gén fog átíródni, és az fogja gátolni a szemben lévő gént (innen jött a libikóka név). Ez a folyamat a “győztes mindent visz” elv alapján működik, ahol is a győztes az a gén, amelyiknek eleve erősebb a transzkripciós aktivitása. Vizsgálódásaink alapján a 9 divergens átfedésből 4 kései (L) gének között (*ul5-ul6*, *ul32-ul33*, *ul37-ul38* és *ul41-ul42*) található, egy van a korai/kései (E/L) (*ul14-15*) és 4 a korai (E) és kései (L) gének között (*ul9-ul10*, *ul23-ul24*, *ul49,5-ul50* és *ul51-ul50*). Korai gének között nem található divergens átfedés [26] (5.ábra). Bár a gének átfedése a

genom tömörítését szolgálja azáltal, hogy így kevesebb nukleinsavból áll a genom, úgy véljük, az átfedések szerepe még az is, hogy a génszabályozás egy új szintjét teszi lehetővé, a transzkripciós interferenciát. A libikóka modellből következik, hogy a divergens átfedő gének különböző kinetikai osztályokba (vagy alosztályokba, finomabb időbeli felbontással vizsgálva) tartoznak.



5. Ábra: A teljes PRV genom

Konvergensen átfedő protein-kódoló gének

Az ellentétes orientációjú gének átfedését már több szervezetben is leírták, mint például élesztőben [29], *C. elegans*-ban [30] és az Aujeszky-féle vírusban [31] is. A konvergens génekről a 3' UTR-ben átfedő mRNS-ek képződnek. Konvergens ORF-ORF átfedésből ugyanakkor nagyon keveset fedeztek fel eddig, valószínűleg a kötött kodonhasználat miatt az evolúciónak kevesebb lehetősége volt a kódoló régióban ilyen szerkezeteket kialakítani. Úgy tartják, hogy a konvergens AyV gének nem fednek át egymással. Az egyetlen igazi konvergens átfedő génpár az *ul30* és az *ul31*, transzkriptumaiknak közös a 3' vége (175 nukleotid átfedés, amelyből 75 nukleotid az ORF-ben fed át). Nyilvánvalóan a két gént író polimerázok ütköznek egymással az átfedő régiókban, ha az expressziójuk időben nem különül el egymástól. A libikóka modell értelmezése szerint a transzkripció interferenciájának alapvető szerepe van az átfedő gének átíródásának időbeli szétválasztásában. Ez úgy valósul meg, hogy az RNS-polimeráz molekulák lelökik egymást a templát génről vagy úgy, hogy a szemközti polimeráz molekula fizikailag meggátolja a transzkripció apparátus összeállását. Ez a folyamat egy olyan automatizmust ad, amellyel a jobban kifejeződő gén elnyomja a vele szemben lévő, kisebb aktivitású gént. A transzkripció irányának megváltozását a transzkripció faktorok aktivitásának megváltozása okozhatja.

A kiterjesztett Libikóka modell

A TIN-hipotézis az alább következő forgatókönyvet javasolja a herpeszvírus replikáció szabályozására. A génmodul prototípusainkban két egymással szemben elhelyezkedő tandem génklaszter kölcsönhatásait írtuk le. Minden tandem génklaszter különböző kinetikai osztályba tartozó géneket tartalmaz, amelyekkel szemben különböző kinetikai osztályba tartozó gének állnak. Jóllehet a valódi génmodulok eltérően épülhetnek fel: a AyV transzkripció kaszkádjának első lépése az ie180 mRNS képződése, amihez nincs szükség *de novo* virális proteinszintézisre. Ezen transzaktivátor többek között az AST és LLT RNS-gének a libikóka modellben bemutatott szabályozása alatt áll, valamint saját protein terméke auto-feedback révén visszahat rá [26]. A következő lépés során az ie180 transzaktivátor néhány

egyéb faktorral együtt beindítja a korai gének átíródását. A vírus infekció ezen fázisában az upstream E gének gátolják a downstream E gének kifejeződését a vízesés modell szerint és a L génekét a libikóka modell szerint. Továbbá ezek az upstream E gének gátolják még a divergens elhelyezkedésű, különböző (al)osztályba tartozó gének expresszióját is. Az *ie180* és az *ep0* kódolják a két legfontosabb transzaktivátorát a vírusnak. Ezért ezek a gének és antiszensz génpárjaik bonyolultabb génregulációs mechanizmust igényelnek, ez a magyarázata a LAT, LLT és AST saját promóterére. Ezekkel ellentétben az összes többi asRNS a libikóka modell alapján szabályozódva, a szemben levő gén promóteréről íródik át read-through mechanizmussal. Ezek után az ICP27 fehérje felismeri az upstream gén terminációs szignálját, ezzel lehetővé teszi a downstream E gének leíródását a promótereikről. Ezt követően a génexpresszió korai fázisból átcsap késeibe, amelyben az ICP27 fehérjének továbbra is fontos szerepe, hogy felismerje a polyA-szignálokat a 3'-terminálisokon, ezáltal csökkentve a konvergens read-through-t az E génekről. A továbbiakban az RNS-polimeráz már nem fogja olyan hatékonyan felismerni a polyA-szignálokat a L gének 3' terminálisánál és megindul a read-through a L gének felől az E gének felé. Más szóval a polyA-szignálokat az ICP27 és egyéb fehérjék eltérő hatékonysággal ismerhetik fel, ezzel időben egymás után kapcsolgatják ki és be a géneket. Más vírusfehérjék, mint például a vhs és az ep0 szintén fontos szerepet játszhatnak a kinetikai váltásban, feltételezhetően az *ie180* transzaktivátor expressziójának és aktivitásának a befolyásolásával [32] és [33]. A váltást követően a L gének transzkripcióját az *ie180* és egyéb tényezők együttesen indítják be, és a fent részletezett módon read-through gátolja az E gének expresszióját. Alapvetően, a transzkripció iránya akár többször is megfordulhat a következő konvergens egymásba ágyazott gene cluster-ek között: E1L1-L2E2. Először az E1 gátolja a tandem L1 és a konvergens L2 és E2 gének átíródását, majd az E2 gátolja a másik három gént, míg a következő lépésben a L1 gátolja az L2 és E2 géneket, végül a L2 a L1 és E1 géneket (az utóbbi két folyamatban az E1 és az E2 nem aktív, transzkripció iniciáció hiányában). A vírus génexpresszió kaszkádszerű eseményeit az RNS-polimerázok a parallel és antiparallel átfedő génekben történő ütközéseivel magyarázzuk, innen jött a "kiterjesztett Libikóka modell" elnevezés. A szomszédos génmodulok egymás transzkripcióját szabályozó read-through-ja túlnyúlhat a két génmodul határain. Az így keletkező hosszú RNS-

eket nehéz detektálni a hagyományos rövid szekvenciákra kidolgozott technikákkal, mint pl. a Northern blot.

Összefoglalás

A génműködés szabályozása alapvető minden biológiai rendszer, élő szervezet normál működésében. A reguláció főként transzkripció (DNS átírás) szintjén valósul meg, melyben az úgynevezett nem-kódoló antiszensz (as)RNS-ek alapvető szerepet játszanak. Az asRNS-ek szerepének vizsgálatához modell „szervezet”-ként egy neurotróp herpeszvírust, az Aujeszky-féle vírust (AyV) használtuk. Szálspecifikus primerekkel elvégzett reverz transzkripciót (RT) követően real-time PCR-ral vizsgáltuk az összes vírusgén (70) kifejeződését, valamint meghatároztuk, hogy melyik kinetikai osztályba (azonnali korai; korai; kései) tartoznak. Eredményeink szerint az ún. egymásba ágyazott (nested) gének azonos, az egymással szembeni orientációjú (konvergens) gének ellenkező kinetikai osztályokba tartoznak. A specifikus RT primerek alkalmazása lehetővé tette, a mindkét DNS szálról való transzkripció, így az mRNS-ektől elkülönítve, (as)RNS-ek analízisét is. Kidolgoztunk egy új, a két komplementer RNS szálát elkülönítő módszert, mellyel az eddig ismert technikák minden hibája kiküszöbölhető. Antiszensz expressziót detektáltunk gyakorlatilag az AyV összes génjénél. Megállapítottuk, hogy két transzaktivátor gén (*ie180*, *ep0*), valamint az ugyanazon génlokuszokból leíródo as RNS-ek (AST, LAT) expressziós profilja egymáshoz képest ellentétes, inverz. Kimutattuk, hogy bizonyos genomi régiókban magas, az mRNS-ek szintjét is meghaladó mértékű as-RNS képződik. Homológ rekombinációval létrehoztunk egy „knock-out” vírust: kiütöttünk egy fontos szereppel bíró vírusgént (*vhs*), s a mutáns vírusnál azt tapasztaltuk, hogy a *vhs*-sel szembeni elhelyezkedésű gének transzkripciójának mértéke csökken, ugyanakkor az ugyanazon DNS régióról képződő as-RNS-eké jelentős mértékben nő. Ez a folyamat a beépített erős promóter (phCMV) read-through hatására. Eredményeink, valamint szakirodalmi adatok alapján felállítottuk egy hipotézist, elnevezésünk szerint a Transzkripciós Interferencia Hálózatot (TIN: Transcriptional Interference Network), ami egy teljesen új génregulációs szintet jelent, azt magyarázza, hogy az antiszensz transzkriptumok hogyan hatnak az egymáshoz közeli gének expressziójára. Habár projektünkhöz, a genom

mérete miatt egy vírust használtunk, az alapelvek érvényesek lehetnek bármely élő rendszernél.

Referenciák:

1. Aujeszky A.
A contagious disease, not readily distinguishable from rabies, with unknown origin.
(in Hungarian). Veterinarius, 1902. 25: 387-396.
2. Fuchs W., C. Ehrlich, B. G. Klupp, and T. C. Mettenleiter.
Characterization of the replication origin (Ori(S)) and adjoining parts of the inverted repeat sequences of the pseudorabies virus genome.
J. Gen. Virol. 2000. 81:1539-1543
3. P. Bertone, V. Stolc, T.E. Royce, J.S. Rozowsky, A.E. Urban, X. Zhu, et al.
Global identification of human transcribed sequences with genome tiling arrays
Science, 306 (2004), pp. 2242–2246
4. E. Birney, J.A. Stamatoyannopoulos, A. Dutta, R. Guigo, T.R. Gingeras, E.H. Margulies, et al. **Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project**
Nature, 447(2007), pp. 799-816
5. J. Cheng, P. Kapranov, J. Drenkow, S. Dike, S. Brubaker, S. Patel, J. Long et al.
Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution
Science, 308 (2005), pp. 1149–1154
6. P. Kapranov, J. Cheng, S. Dike, D.A. Nix, R. Duttagupta, A.T. Willingham et al.
RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription
Science, 316 (2007), pp. 1484–1488
7. J.S. Mattick
RNA regulation: A new genetics?
Nat Rev Genet, 5 (2004), pp. 316–323

8. K. Struhl
Transcriptional noise and the fidelity of initiation by RNA polymerase II
Nat Struct Mol Biol, 14 (2007), pp. 103–105

9. M. Ebisuya, T. Yamamoto, M. Nakajima, E. Nishida
Ripples from neighbouring transcription
Nat Cell Biol, 10 (2008), pp. 1106–1113

10. J. Mattick
Non-coding RNAs and eukaryotic evolution – a personal view
BMC Biology, 8 (2010), pp. 67

11. Y.Y. Li, L. Qin, Z.M. Guo, L. Liu, H. Xu, P. Hao et al.
In silico discovery of human natural antisense transcripts
BMC Bioinformatics, 7 (2006), pp. 18

12. R.W. Carthew
Gene regulation by MicroRNAs
Curr Opin Genet Dev, 16 (2006), pp. 203–208

13. D.P. Bartel
MicroRNAs: target recognition and regulatory functions
Cell, 136 (2) (2009), pp. 215-233

14. B.A. Janowski, K. Kaihatsu, K.E. Huffman, J.C. Schwartz, R. Ram, D. Hardy et al.
Inhibiting transcription of chromosomal DNA with antigene peptide nucleic acids
Nat Chem Biol, 1 (2005), pp. 210-215

15. S. Napoli, C. Pastori, C.M. Magistri, G.M. Carbone, C.V. Catapano
Promoterspecific transcriptional interference and c-myc gene silencing by siRNAs in human cells
EMBO J, 28 (2009), pp. 1708-1719

16. Jacquemont B, and Roizman B.
RNA synthesis in cells infected with herpes simplex virus. X. Properties of viral symmetric transcripts and of double-stranded RNA prepared from them.
J Virol. 1975 April; 15(4): 707-713

17. Lisa E. Pomeranz, Ashley E. Reynolds, and Christoph J. Hengartner
Molecular Biology of Pseudorabies Virus
Impact on Neurovirology and Veterinary Medicine Microbiol. Mol. Biol.(2005) Rev, 69: 462 - 500.

18. Ryan Hagglund and Bernard Roizman,
Role of ICP0 in the Strategy of Conquest of the Host Cell by Herpes Simplex Virus 1
(2004) J. Virol., 78: 2169 - 2178.

19. Barbara G. Klupp, Christoph J. Hengartner, Thomas C. Mettenleiter, and Lynn W. Enquist,
Complete, Annotated Sequence of the Pseudorabies Virus Genome,
J. Virol., 78: 424 - 440.

20. Stevens JG, Wagner EK, Devi-Rao GB, Cook ML, Feldman LT.
RNA complementary to a herpes virus gene mRNA is prominent in latently infected neurons.
Science 1987 (235): 1056–1059

21. Spivack JG, Fraser NW.
Expression of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) latency-associated transcripts in the trigeminal Ganglia of mice during acute infection and reactivation of latent infection.
J Virol 1988 (62): 1479–1485.

22. Souazé F, Ntodou-Thomé A, Tran CY, Rostène W, Forgez P.
Quantitative RT-PCR: limits and accuracy.
Biotechniques. 1996 Aug;21(2):280-5.

23. Boldogkői Z, Reichart A, Tóth IE, Sík A, Erdélyi F et al:
Construction of recombinant pseudorabies viruses optimized for labeling and neurochemical characterization of neural circuitry.

- Mol Brain Res 2002, 109 (1-2): 105-118.
24. Zhang G, Raghavan B, Kotur M, Cheatham J, Sedmak D, Cook C, Waldman J, and Trgovcich J.
Antisense Transcription in the Human Cytomegalovirus Transcriptome.
 J. Virology, October 2007 81(20) 11267-11281
 25. F. McGregor, A. Phelan, J. Dunlop, J.B. Clements F. McGregor, A. Phelan, J. Dunlop, J.B. Clements
Regulation of herpes simplex virus poly(A) site usage and the action of immediate-early protein IE63 in the early-late switch
 J Virol, 70(1996), pp. 1931–1940
 26. D. Tombácz, J.S. Tóth, P. Petrovski, Z. Boldogkői
Whole-genome analysis of pseudorabies virus gene expression by real-time quantitative RT-PCR assay
 BMC Genomics, 10 (2009), pp. 491
 27. W. Wei, V. Pelechano, A.I. Jarvelin, L.M. Steinmetz
Functional consequences of bidirectional promoters
 Trends Genet, 27 (2011), pp. 267-276
 28. R. Gu, Z. Zhang, J.N. DeCervo, G.G. Carmichael
Gene regulation by antisense overlap of polyadenylation signals
 RNA, 15 (6) (2009), pp. 1154-1163
 29. J.A. Peterson, A.M. Myers
Functional analysis of mRNA 3'end formation signals in the convergent and overlapping transcription units of the S. cerevisiae genes RHO1 and MRP2
 Nucleic Acids Res, 21 (23) (1993), pp. 5500-5508
 30. N. Osato N, Y. Suzuki, K. Ikeo, T. Gojobori
Transcriptional interferences in cis natural antisense transcripts of humans and mice
 Genetics, 176 (2) (2007), pp. 1299-306
 31. M.L. Szpara, Y.R. Tafuri, L. Parsons, S.R. Shamim, K.J. Verstrepen, M. Legendre
A wide extent of inter-strain diversity in virulent and vaccine strains of alphaherpesviruses
 PLoS Pathog, 7 (10) (2011), pp. E1002282

32. D. Tombácz D, J.S. Tóth, Z. Boldogkői
Deletion of the virion host shut: off gene of pseudorabies virus results in selective upregulation of the expression of early viral genes in the late stage of infection
Genomics, 98 (1) (2011), pp. 15-25
33. D. Tombácz, J.S. Tóth, Z. Boldogkői
Effects of deletion of the early protein 0 gene of pseudorabies virus on the overall viral gene expression
Gene, 493 (2) (2012), pp. 235-242

Köszönetnyilvánítás:

Köszönöm Dr. Boldogkői Zsoltnak, csoportunk vezetőjének a lehetőséget, hogy a csoport munkájában részt vehettem, a szakmai irányítást az elméleti munkában való segítségét.

Köszönettel tartozom Dr. Tombácz Dórának mint az elméleti, mint a gyakorlati munka során nyújtott segítségéért, valamint a dolgozat megírásában nyújtott fáradozásaiért.

Köszönet Balázs Zsoltnak és Kiss Tamásnak a munka során való együttműködésükért, valamint a dolgozat megírásában nyújtott segítségükért.

Köszönet illeti az intézet összes dolgozóját akik munkájukkal hozzájárultak a kísérletek helyes, rendbeni lefutásához.

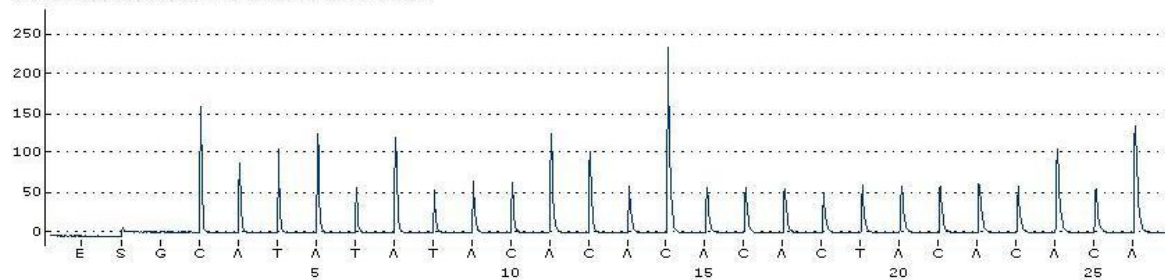
Végül, de nem utolsósorban köszönöm Dr. Mink Mátyásnak a konzulesni munka elvégzését, valamint, hogy bármikor segítségemre volt.

Függelék:

Gene	Time	mRNSs (R érték)	AS-RNSs (R érték)	mRNS/AS-RNS
ep0	8 h	4,08	4,31	0,95
	12 h	1,76	4,4	0,4
	18 h	1,59	3,51	0,45
ul6	12 h	1,33	1,6	0,83
	18 h	0,9	3,01	0,3
	24 h	1,05	1,97	0,53
ul15	12 h	0,88	2,15	0,4
	18 h	0,62	2,79	0,22
	24 h	0,78	2,77	0,28
ul22	18 h	0,29	0,68	0,42
	24 h	0,51	0,98	0,52
ul30	4 h	0,55	0,65	0,84
	6 h	0,88	1,77	0,5
	8 h	0,68	1,91	0,35
	12 h	1,07	3,15	0,34
	18 h	1,2	2,8	0,43
	24 h	1,93	3,81	0,5
ul32	1 h	0,08	0,11	0,72
ul41	8 h	0,95	1,7	0,55
	12 h	2,04	4,31	0,47
	18 h	1,15	4,1	0,28
	24 h	2,29	2,46	0,93
ul51	6 h	1,21	2,16	0,56
	18 h	3,96	4,92	0,8
	24 h	3,84	4,16	0,92
ul52	6 h	1,11	1,19	0,93
	8 h	1,5	2,67	0,56
	12 h	3,53	4,92	0,71

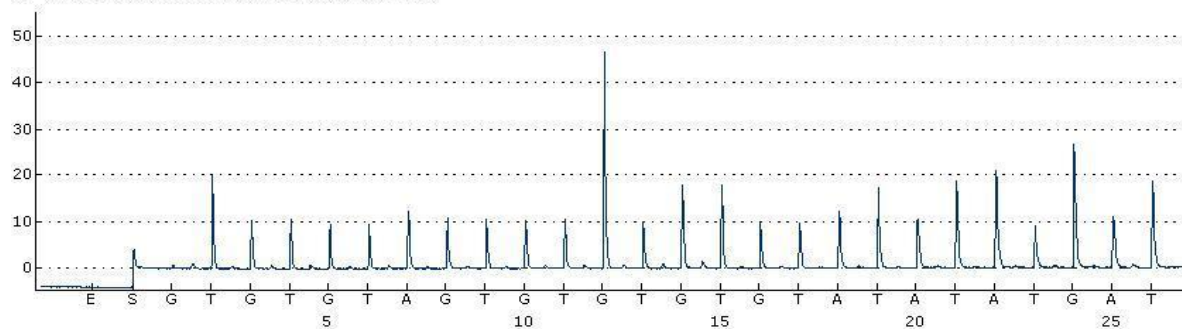
1. Függelék : a PRV gének R értékei és az antiszesz partnereik, amelyek magasabban expresszáldtak mind az mRNS.

A5: CCCATTAAATAATACAACCCACCCCACTACACAACAA



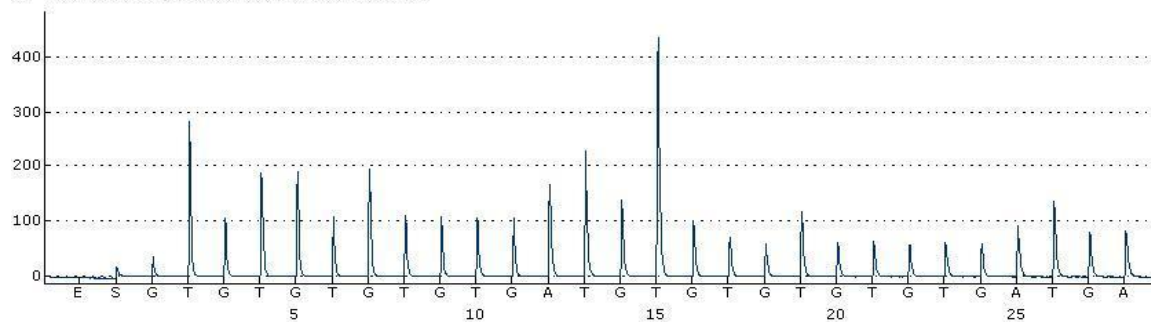
2.1 Függelék Ul50 gén antiszensz konvertált szál forward biotinos primerrel

A6: TTGTGTAGTGTGGGGTGGTTGTATTATTAAATGGGATT



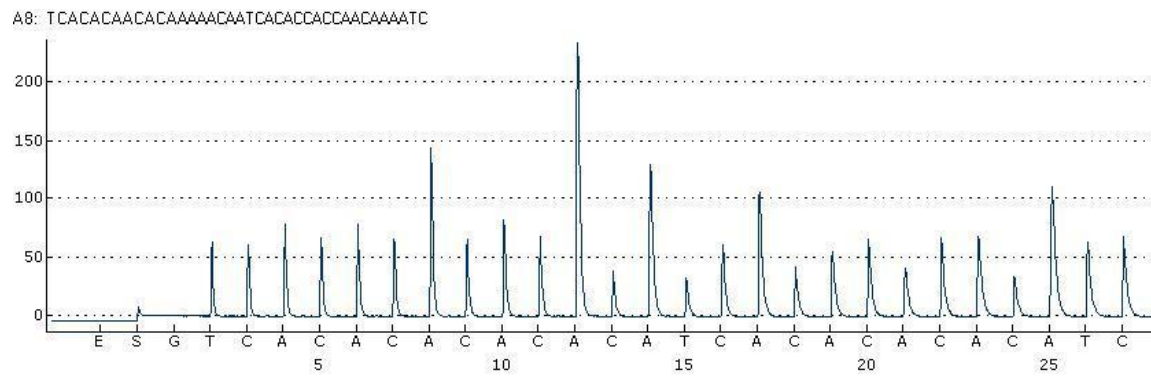
2.2 függelék Ul50 gén antiszensz konvertált szál reverz biotinos primerrel

A7: TTTGTTGGTGGTGTGATTGTTTTTGTGTTGTGTGATGA



2.3

függelék Ul50 gén szensz konvertált szál forward biotinos primerrel



2.4 függelék Ul50 gén szensz konvertált szál reverz biotinos primer

Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

A kísérletsorozatba az antiszensz RNS-ek vizsgálatánál kapcsolódtam be a csoport munkájába. Ezek detektálását és analizisét végeztem. Főként ezen technikákat részleteztem a dolgozatomban is. Az ehhez kapcsolódó elméleti és gyakorlati munkában részt vettem, melyek alapul szolgáltak a pályamunkában leírt hipotéziseknek.