

XXXI. OTDK Biológia szekció

Solid szekvenálással kapott nyúl mikroRNS szekvenciák validálása

Készítette: Németh Kinga

Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar
Biológiai Intézet, Biológia BSc III.

Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont

Témavezető: Dr. Gócza Elen

Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont

Budapest

2012

1. Tartalomjegyzék

1.	Tartalomjegyzék.....	2
2.	Bevezetés.....	3
3.	Irodalmi áttekintés.....	5
3.1.	A mikroRNS-ek	5
3.1.1.	A mikroRNS-ek felfedezése és szerepe.....	5
3.1.2.	A mikroRNS-ek bioszintézise	6
3.1.3.	A mikroRNS-ek konzervativitása.....	7
3.1.4.	A mikroRNS-ek és a rák.....	7
3.1.5.	A mikroRNS-ek és az őssejtek	8
3.2.	A nyúl (<i>Oryctolagus cuniculus</i>), mint betegségmodell	9
3.3.	A Solid szekvenálás	10
3.4.	Real-time PCR	11
4.	Célkitűzések	13
5.	Anyag és módszer	14
5.1.	Solid szekvenálás	14
5.2.	Felhasznált adatbázisok	14
5.3.	RNS preparátum készítése	14
5.4.	RNS izolálás és koncentráció mérés	15
5.5.	Reverz transzkripció	15
5.6.	Real-time PCR analízis	16
5.7.	Relatív expresszió számítások	17
6.	Eredmények és értékelésük	18
6.1.	A Solid szekvenálással kapott eredmények	18
6.2.	A kvantitatív real-time PCR analízis eredményei	21
6.3.	A két módszer eredményeinek összehasonlítása	23
6.4.	Az eredmények értékelése	25
7.	Összefoglalás.....	27
8.	Summary	28
9.	Irodalomjegyzék.....	29
10.	Köszönetnyilvánítás	38
11.	Mellékletek.....	I

2. Bevezetés

A korábbi meggyőződésekkel ellentétben, miszerint a genom nagy részét alkotó, nem kódoló szekvenciák funkció nélküli, felesleges szakaszok („junk DNA”), egyre több kutatás állítja, hogy a fehérjét nem kódoló géneknek is igen fontos szerepük van a biológiai tulajdonságok megnyilvánulásában. Ezt bizonyítja a legújabb nagyszabású vállalkozás, az ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project eredménye is, melynek keretében a humán genom funkcionális analízise során kiderült, hogy a korábbi 1 %-os becsléssel ellentétben, a genom minimum 80 %-a bír valamilyen aktív biológiai funkcióval (The ENCODE Project Consortium, 2011).

A nem kódoló gének csoportjába tartoznak az 1993-ban felfedezett (Lee et al., 1993) mikroRNS-ek is, melyek a ma ismert kis RNS-ek legnépesebb csoportját alkotják.

A mikroRNS-ek (miRNS-ek) olyan kb. 22 nukleotid hosszú, fehérjét nem kódoló, egyszálú RNS molekulák, amelyek alapvető szabályozó funkciók érzékeny beállításában vesznek részt (Bartel, 2004). Szabályozó szerepüket a gének poszttranszkripcionális módosítása során fejtik ki azáltal, hogy az mRNA 3' végén található nem transzlálódó régióhoz (Untranslated Region, UTR) kötődnek, és ott a transzlációt gátolják, vagy az mRNA degradációját okozzák (Lim et al., 2005).

Számos miRNS-t írtak már le emberben, egérben, és más fajokban, nyúlban azonban még egyet sem (www.mirbase.org). Régóta ismertek őssejt-specifikus miRNS-ek is, melyeknek fontos szerepük van a pluripotencia fenntartásában, illetve a differenciálódás gátlásában.

Munkám során nyúl őssejt-specifikus miRNS-ek azonosítását végeztem. Amennyiben sikerülne olyan miRNS-eket találni, melyek segítségével képesek lennének a sejtekben fenntartani a pluripotens, differenciálatlan állapotot, ivarsejt kiméra nyulak létrehozására alkalmas őssejt vonalakat kaphatnánk.

Ennek első lépéseként azt szeretnénk volna tesztelni, hogy a Solid szekvenálás során kapott read számok (találatszámok) mennyire korrelálnak a real-time PCR analízis során megállapított expressziós szintekkel. A megszekvenált egér és nyúl mintákban humán és egér miRNS-ek homológjait kerestük, majd ezek közül néhányat kiválasztva real-time PCR analízissel vizsgáltuk, hogy az egér és nyúl fibroblasztban, valamint a 13 és fél napos nyúl embrióban hasonló mintázatot kapunk-e, mint a szekvenciák vizsgálatakor. Amennyiben sikerülne összefüggést találni a két módszer között, akkor a szekvencia analízissel kapott adatokból közvetlenül megbecsülhetnénk az egyes miRNS-ek expresszióját. Ezzel a

módszerrel lehetőség nyílik nyúl-specifikus miRNS-ek azonosítására is. Míg egy PCR analízis során csak (legalább részben) ismert szekvenciákra lehet primereket tervezni, addig egy ilyen módszerrel azonosíthatóvá válnak addig ismeretlen, teljesen új szekvenciák is.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A mikroRNS-ek

3.1.1. A mikroRNS-ek felfedezése és szerepe

Az első mikroRNS-t (miRNS) Victor Ambros és munkatársai, Rosalind Lee és Rhonda Feinbaum fedezték fel *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) lin-4 génjének vizsgálata során, amely a féreg lárvális fejlődési idejét szabályozza. Észrevették, hogy bár a lin-4 nem kódol szabályozó fehérjét, néhány kis RNS molekula szintjét emeli (Lee et al., 1993). A szekvencia analízis során rájöttek, hogy egy kb. 60 nukleotid hosszú, hajtú-szerű (stem loop) molekula egyik karjáról lehasadó rész többé-kevésbé komplementer a lin-14-ről átíródó mRNS 3' UTR részével, valamint ide bekötődni képes, és ezáltal gátolja a transzlációt (Wightman et al., 1991, 1993).

Több év kellett ahhoz, hogy egy újabb miRNS-t, a let-7 miRNS-t, felfedezzék, szintén *C. elegans*-ban. A let-7 a lin-4-hez hasonlóan fejti ki a hatását, csak más fejlődési állapotban (Reinhart et al., 2000; Slack et al., 2000). A let-7 RNS-t, és génjének homológjait, hamarosan a humán és a *Drosophila** genomban is azonosították, valamint 11 másik állatfajban is megtalálták (Pasquinelli et al., 2000).

Azóta számos növényi és állati miRNS funkcióját vizsgálták. Bizonyítottan igen fontos szerepük van az állati sejtosztódás, sejthalál, sejt differenciálódás, és a zsír-anyagcsere szabályozásában (Brennecke et al., 2003; Xu et al., 2003; Ambros, 2004; Bartel, 2004), növényekben pedig a levél és a virág kialakulásának szabályozásában (Reinhart et al., 2002; Aukerman and Sakai, 2003; Chen, 2003; Emery et al., 2003; Palatnik et al., 2003). Kimutattak fejlődési állapotra jellemző miRNS expressziós mintázatokat is (Krichevsky et al., 2003; Mineno et al., 2006).

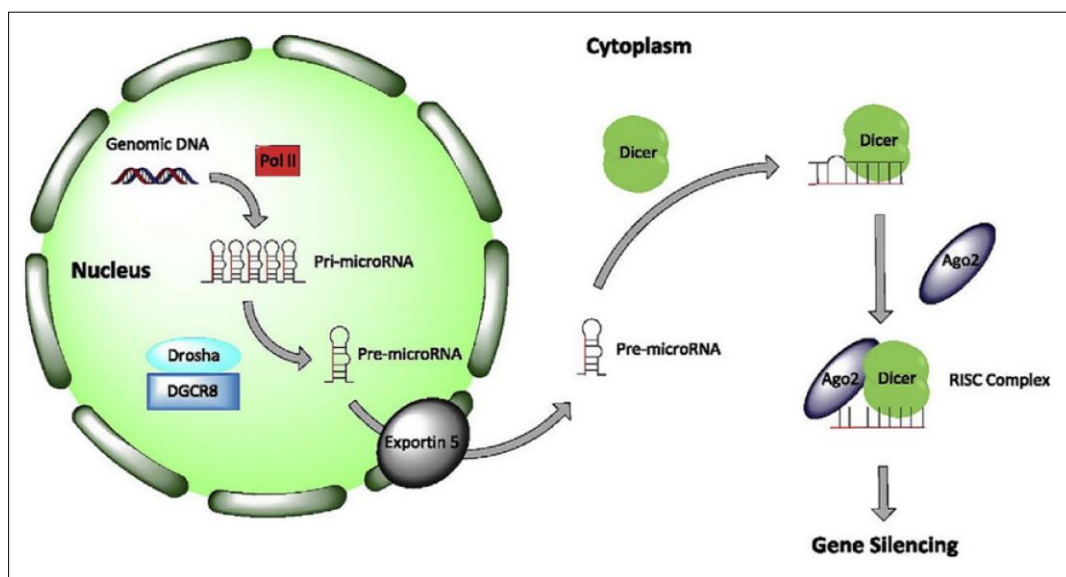
Újabb tanulmányok szerint a miRNS-eknek szerepük lehet a testi sejtek visszaprogramozásában is (Judson et al., 2009; Lakshmipathy et al., 2010; Anokye-Danso et al., 2011; Li et al., 2011; Miyoshi et al., 2011; Subramanyam et al., 2011). Az első, szomatikus sejtekből visszaprogramozással létrehozott pluripotens sejteket (induced pluripotent stem cells, iPSCs) négy faktor (Yamanaka faktorok) felhasználásával hozták létre

* A közismert genetikai modellállatot, a *Drosophila melanogaster*-t, azaz az ecetmuslicát, nem csak a biológiával foglalkozók, hanem a legtöbb ember jól ismeri. A legújabb genetikai kutatások alapján a *Sophophora* genusba (korábban subgenus) sorolták át (ICZN, 2010). Mivel a legtöbb helyen, a közérthetőség kedvéért, a régi nevet alkalmazzák, mi is ezt a terminológiát követjük, de megjegyezzük, hogy a ma hivatalos név a *Sophophora melanogaster*.

(Takahasi and Yamanaka, 2006). Azóta számos kutatás irányult arra, hogy különböző felnőtt sejtekből visszaprogramozással pluripotens sejteket kapjunk (Maherali et al., 2007; Takahasi et al., 2007a, 2007b; Yu et al., 2007; Wernig et al., 2007; Aoi et al., 2008; Nakagawa et al., 2008; Park et al., 2008). Shinya Yamanaka ezen felfedezéséért 2012-ben Orvosi-élettani Nobel-díjat kapott (Yamanaka, 2012). A legújabb kutatások szerint egér sejtek visszaprogramozása elvégezhető lenne a korábban használt faktorok nélkül, miRNS-ek felhasználásával (Anoyke-Danso et al., 2011).

3.1.2. A mikroRNS-ek bioszintézise

A miRNS-ek bioszintézisének első lépéseként, az RNS polimeráz II. enzim segítségével, a nucleusban történik meg a transzkripció. Ennek eredményeként egy hosszú, több kanyarulatból álló molekula jön létre, a primer-miRNS (pri-miRNS), melyből a DGCR8 kofaktorrall rendelkező Drosha endoribonukleáz képes egy kb. 70 nukleotid hosszúságú hurok (stem loop) kihasítására, ez a prekursor-miRNS (pre-miRNS), amely az Exportin5 segítségével jut a citoplazmába. Itt a TRBP kofaktorrall rendelkező Dicer ribonukleáz a pre-miRNS egyik karjáról kihasítja a kb. 22 nukleotid hosszúságú, érett miRNS-t. Ez, az Argonaute család egyik tagjával, valamint a Dicer-rel együtt egy RISC nevű komplexet (RNA Inducing Silencing Complex) alkotva képes az mRNS 3' végén lévő nem transzlálódó régióhoz (Untranslated Region, UTR) kapcsolódni (Lee et al., 2002; Cullen, 2004; Tomari et al., 2005). A folyamatot az alábbi ábra (1. ábra) mutatja.



1. ábra A miRNS-ek bioszintézise (Kuo et al., 2012).

3.1.3. A mikroRNS-ek konzervativitása

A miRNS-ek, szekvenciájukat tekintve, igen konzervatívak, vagyis az evolúció során nagyon lassan változnak. Egyes becslések szerint, nukleotid sorrendjükben 100 millió évente történik egy szubsztitúció (Peterson et al., 2009). Emiatt sok egyforma, vagy nagyon hasonló szekvenciájú miRNS található egyrészt, olyan közeli rokonok genomjában, mint pl. a *Caenorhabditis elegans*, és a *C. briggsae*, de ugyan ez elmondható az egér (*Mus musculus*) és az ember (*Homo sapiens*) esetében, sőt, jóval távolabbi rokonok között is megfigyelhető (Ambros et al., 2003; Aravin et al., 2003; Lagos-Quintana et al., 2003; Lim et al., 2003a, 2003b). Így pl. a *C. elegans* miRNS génjeinek kb. egy harmadának homológjai megtalálhatóak a humán genomban (Lim et al., 2003b). A távolabbi rokonok esetében megfigyelhető, hogy egy-egy géncsalád több, vagy kevesebb taggal rendelkezik, így pl. a let-7 géncsaládnak *C. elegans*-ban 4, emberben legalább 15, míg *Drosophilában* mindössze egy tagja van (Lim et al., 2003b; Lai et al., 2003; Pasquinelli et al., 2000; Aravin et al., 2003). Ez a szekvenciális konzervativitás, feltehetően, a nukleotid-sorrendjükkel összefüggő feladatukkal magyarázható.

Mivel a miRNS-ek nagyon ritkán vesznek el a genomból (Peterson et al., 2009), nagyon értékes filogenetikai markernek számítanak. Megoldást jelenthetnek olyan filogenetikai problémákra, mint pl. az Arthropoda taxon belső rokonsági kapcsolatainak felderítése (Caravas et al., 2010).

3.1.4. A mikroRNS-ek és a rák

Régóta tudjuk, hogy a miRNS-eknek elengedhetetlen szerepük van a korai egyedfejlődésben, valamint a normális életműködések szabályozásában (Grishok et al., 2001; Ketting et al., 2001; Laurent, 2008). Ennek következtében különböző betegségek is kapcsolatba hozhatóak a miRNS-ek abnormalis működésével, melyeket összefoglalva a miR2Disease Base online adatbázisban (www.mir2disease.org) is megtalálhatunk (Jiang et al., 2009).

Számos miRNS-t hoztak kapcsolatba rákos megbetegedésekkel is, melyeket „oncomir”-eknek nevezünk (Hammond, 2006). Elsőként a miR-21-ről mutatták ki, hogy szerepe lehet különböző szervek, mint az agy (Chan et al., 2005), mell (Iorio et al., 2005), hasnyálmirigy, prosztata, tüdő (Volinia et al., 2006), méhnyak (Lui et al., 2007), máj (Meng et al., 2007), petefészek (Iorio et al., 2007), pajzsmirigy (Tetzlaff et al., 2007), vastagbél

(Asangani et al., 2008), és a nyelőcső (Hu et al., 2011) daganatos megbetegedéseinek kialakulásában.

A miRNS-ek onkogén tulajdonsága feltehetően azzal magyarázható, hogy a kromoszómák fragilis részein helyezkednek el, ahol gyakoribb a mutációk kialakulása, és ezek felhalmozódása vezethet rákos megbetegedésekhez (Calin et al., 2004).

Humán rákos megbetegedéssel először 2002-ben hoztak kapcsolatba miRNS-eket (Calin et al., 2002), 2008 óta pedig az emberi szérumból is képesek kimutatni a miRNS-ek expressziós szintjét (Chen et al., 2008), aminek nagyon nagy jelentősége van a daganatos megbetegedések korai diagnosztizálásában. Leírtak ugyanis egyes rákos megbetegedésekre specifikusan jellemző miRNS mintázatot (Lu et al., 2005), amely egyrészt, a nehezen diagnosztizálható tumorok jellegének meghatározásához nyújt segítséget, másrészt információt adhat a páciens kezelésre adandó reakciójáról, és a túlélési valószínűségről is (Vösa et al., 2011).

Ezen túlmenően, megfigyelték, hogy egyes miRNS-eknek tumor szupresszor tulajdonsága van, ilyen például a let-7 miRNS család, amelynek tagjai onkogén targettekhez kapcsolódva, gátolják azok expresszióját, így fejtik ki tumor szupresszor hatásukat (Lee and Dutta, 2007).

3.1.5. A mikroRNS-ek és az őssejtek

Az őssejtek különlegessége első sorban, az aszimmetrikus osztódásuknak köszönhető önmegújító képességükben rejlik. Az őssejtek osztódásakor a létrejövő két leánysejt közül az egyik ugyan olyan őssejt, mint amiből létrejött, a másik pedig egy már differenciáltabb fejlődési állapotban lévő sejt. Az embrionális őssejteket a blasztociszta állapotú embrió embriócsomójából (inner cell mass, ICM) nyerhetjük (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Ezek pluripotens sejtek, vagyis mindhárom embrionális csíralemez (ekto-, endo-, és mezoderma) sejtjei létrejöhetnek belőlük, de az extraembrionális szövetek kialakítására már nem képesek.

Az embrionális őssejtek régóta állnak az érdeklődés középpontjában, hiszen speciális tulajdonságaiknak köszönhetően igen ígéretes szerepük lehet a regeneratív orvoslásban, egyelőre azonban igen keveset tudunk róluk, így a téma vizsgálata inkább az alapkutatások, mintsem a klinikai felhasználás tárgykörébe tartozik.

Viszonylag régóta ismert, hogy a miRNS-eknek fontos szerepük van a pluripotencia fenntartásában, illetve a sejtek differenciálódásának beindításában, amit első sorban az

úgynevezett pluripotencia gének (pl. Oct4, Sox2, Nanog) poszttranszkripcionális szabályozásával érnek el. Elsőként a miR-290-295 klaszter tagjairól mutatták ki, hogy az egér embriókban már két sejtes fejlődési állapotban, igen erősen expresszálódnak, majd a fejlődés későbbi szakaszában expressziójuk csökken (Houbaviy et al., 2003; Suh et al., 2004). Létrehoztak olyan knockout (génkiütött) egereket, melyekben a miRNS érés folyamata nem megfelelően zajlott, és figyelték ezek fejlődését. Azt tapasztalták, hogy az ilyen egerek, melyekben a miRNS-ek nem megfelelően működtek, abnormálisan fejlődtek, és ezen keresztül igazolták, hogy a miRNS-eknek a sejt differenciálódás során is elengedhetetlen szerepük van (Kanellopoulou et al., 2005; Murchison et al., 2005; Wang et al., 2007). Bár ennek a komplex mechanizmusnak még nem minden részlete tisztázott, a miR-134 miRNS-ről pl. kimutatták, hogy az őssejtek ektodermális irányba való differenciálódásáért felelős, és ezt a hatást a Nanog és az LRH1 transzlációjának gátlásával éri el (Tay et al., 2008).

A miRNS-ek sejt differenciálódással kapcsolatos szerepe legjobban talán úgy vizsgálható, ha feltérképezzük, hogy mely miRNS-ek jellemzőek az egyes sejt típusokra és fejlődési állapotokra, és hogy ezek expressziós szintje hogyan változik az egyedfejlődés során. Elvégezhető továbbá a miRNS-ek funkcionális analízise, amely során in vitro túlexpresszáltatjuk, illetve gátoljuk az egyes miRNS-eket, és figyeljük, hogy ennek milyen hatása van más gének expressziójára, és az egyedfejlődés menetére.

3.2. A nyúl, mint betegség modell

Az utóbbi időben a humán betegségek vizsgálatának egyik legnépszerűbb alanya a nyúl (*Oryctolagus cuniculus*), mivel a korai embriófejlődése, és az őssejtek tulajdonságai sokkal jobban hasonlítanak az emberéhez, mint az egér (*Mus musculus*) esetében (Fischer et al., 2012). Régóta szolgál olyan humán betegségek modellezésére, mint az atherosclerosis (érelmeszesedés), osteoarthritis (másképpen arthritis, degeneratív ízületi gyulladás), tuberkulózis (tüdőgümőkór), az Alzheimer kór, vagy a diabétesz (Narayanaswamy et al., 2000; Lin et al., 2007; Winiarska et al., 2008; Woodruff-Pak, 2008; Ramin et al., 2010; Zahn et al., 2010; Kang and Grossniklaus, 2011; Thieme et al., 2012).

Ahhoz, hogy egyes betegségeket modell állatokon tudjunk vizsgálni, elengedhetetlenül szükséges, hogy képesek legyünk az állat tulajdonságainak célzott befolyásolására. Ehhez olyan nyúl őssejt vonalra (ES sejt vonal) lenne szükség, melynek segítségével ivarsejt kiméra állatokat is létre lehet hozni. Ezen sejt vonalból származó sejteket felhasználva, célzott genetikai módosítás lenne végezhető.

A kiméra készítésnek jelenleg két módja ismert: a mikroinjektálás és az aggregáltatás. Az előbbi esetben blasztociszta állapotú embrió belsejébe injektálunk a sejtvonalból származó, genetikailag módosított, pluripotens sejteket. Ennél jóval egyszerűbben kivitelezhető a másik módszer, amikor nyolc sejt embrióval aggregáltatjuk a sejtvonalból származó, genetikailag módosított, pluripotens sejteket. A beültetett őssejtek integrálódnak az embriócsomóba, és a születendő utód minden sejtje tartalmazni fogja a transzgént, beleértve az ivarsejteket is (Bösze and Gócza, 2005).

Az első, élve született, igazoltan ES sejt kiméra nyulakat 2010-ben hozták létre, ám ezek ivarsejtjei között nem volt a transzgénikus ES sejtekből származó ivarsejt, tehát utódaikra nem tudták átörökíteni az új tulajdonságot (Zakhartchenko et al., 2011).

Az orvostudomány területén egyre nagyobb igény mutatkozik célzott genetikai módosítást hordozó nyulak előállítására. Ehhez szükség lenne megfelelő pluripotens nyúl őssejt vonalra, amely segítségével olyan kiméra nyulak hozhatóak létre, melyek ivarsejtjeibe is képes integrálódni a transzgén, ezáltal lehetővé téve az új tulajdonság örökíthetőségét.

3.3. A Solid szekvenálás

Az első szekvenálási technikákat az 1970-es években fejlesztették ki. 1977-ben publikálták először a Maxam-Gilbert (Maxam and Gilbert, 1977), és a Sanger-módszert (Sanger et al., 1977) is, melyek a termékek elektroforetikus szeparálásán alapulnak. Ezeknek aztán számos továbbfejlesztett változatát használták, és használják ma is.

Az utóbbi években elterjedt *új-generációs* szekvenálási technikák („Next-generation sequencing”, NGS) mind nanotechnológiát használnak, és a beépülő nukleotidokat nem utólag, hanem a beépülés pillanatában detektálják. Ezek a technológiák már sokkal kevesebb emberi munkával, sokkal gyorsabban és olcsóbban dolgoznak.

Ilyen új generációs szekvenálási technika az Applied Biosystems által kifejlesztett SOLiD™ szekvenálási módszer is (Shendure et al., 2005). A SOLiD (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection) módszer úgy működik, hogy a DNS-t 35 nukleotid hosszú fragmensekre bontja, melyekhez hozzákapcsolódnak olyan adapterek, amik képesek a fragmenseket 1 µm átmérőjű gyöngyök felületéhez kötni, és itt, az emulzióban végbemenő polimeráz láncreakció során, megsokszorozódnak. Egy gyöngy felületén mindig egyféle fragmens sokszorozódik fel. A gyöngyöket végül egy üveg felületre kötik, itt történik meg maga a szekvenálás. A többi módszertől abban különbözik, hogy nem polimeráz, hanem ligáz enzim építi az újonnan szintetizálódó szálakat, valamint, hogy nem nukleotidok, hanem

oktamer, fluoreszcensen jelölt próbák épülnek be, melyeken a színek báziskettősöket („di-base” próba) jelölnek (4 szín, 16 féle bázispár). Ez után a foszfatáz enzim az oktamer utolsó három bázisát levágja, így öt nukleotid marad beépülve, amelyből az első kettő kódolja a detektált színt. Addig ismétlik újra a ciklust, amíg a komplementer szál teljesen felépül. Amikor ez kész, leoldják a primert és a keletkezett szálát, és többször ismétlik a folyamatot, mindig egy nukleotiddal rövidebb primert alkalmazva, így eltolva történik a leolvasás, és az átfedésekből kiolvasható a szekvencia. Az, hogy ugyanaz a bázis többször olvasódik le, és az egyes ciklusoknál más szín kódolja, pontosabb leolvasást tesz lehetővé.

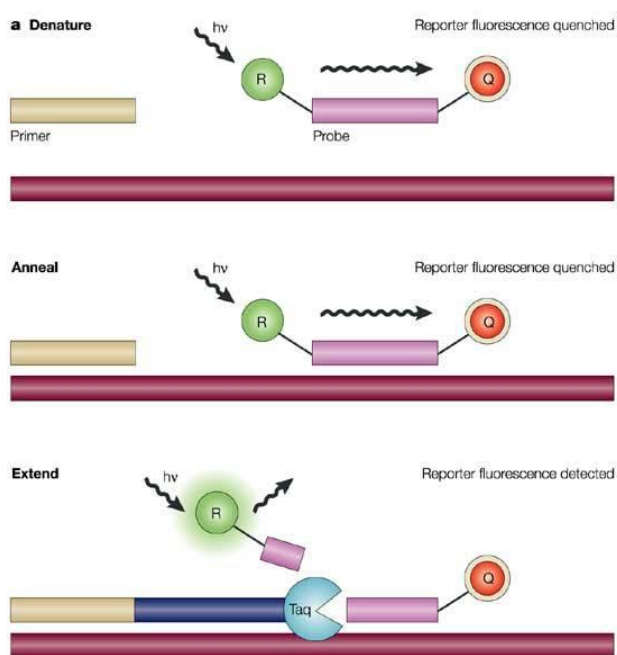
3.4. Real-time PCR

A polimeráz láncreakciót (Polymerase Chain Reaction, PCR) Kary Mullis fedezte fel 1983-ban (Mullis et al., 1983). A módszer egy specifikus DNS-szakasz enzimatiszus felszaporítását teszi lehetővé, és ma már széles körben használják a különböző tudományterületeken, nap mint nap.

Mullis rendszerében a DNS szintézist végző polimeráz enzim a magas hőmérséklet miatt lebomlott, ezért azt minden ciklusban pótolni kellett. Később megtalálták a *Thermus aquaticus* baktériumot, amely a hőforrásokban él, így enzimjei a kifejezetten magas hőmérsékletre adaptálódtak (Chien et al., 1976). Az ebből kivont polimeráz enzimet (Taq polimeráz) alkalmazva a reakció jóval hatékonyabbá vált. Később molekuláris genetikai módszerekkel optimalizálták a működését, és más hőstabil organizmusokat is találtak. Ma, több különböző polimerázból válogathatunk a piacon, és sokféle, különböző célokra optimalizált PCR elvégzésére van lehetőség.

1996-ban írták le először a kvantitatív real-time PCR-t (Heid et al., 1996). Ez a módszer lehetővé teszi a keletkező termék azonnali, fluorimetriás úton való detektálását, így nincs szükség a reakció végén gél elektroforézisre.

A real-time PCR során képződő termék detektálására leggyakrabban



SYBRGreen fluoreszcens DNS festéket (Molecular Probes), vagy TaqMan próbát (Applied Biosystems) alkalmaznak.

A Taqman próba egy olyan oligonukleotid, amely egy riporter (jelző) és egy quencher (kioltó) festékkel van jelölve, és a DNS szintézis során a templát szálhoz a komplementaritása révén kapcsolódik. A DNS polimeráz exonukleáz aktivitása révén (hibajavítás), felismeri az idegen részt, és lehasítja a quencher. Ekkor a két festék molekula eltávolodik egymástól, és ennek hatására a riporter emissziója detektálható lesz. A PCR gép minden ciklus végén gerjesztő fényt kibocsátva vizsgálja a riporter molekula emisszióját, aminek erőssége arányos a képződött termék mennyiségével. A Taqman próba működését a 2. ábra illusztrálja.

A real-time PCR analízis eredményeként C_T értékeket kapunk, ami az a ciklusszám, ahol a minden ciklus végén detektált fluoreszcens jel exponenciálisan növekedni kezd, vagyis ahol átlépi a threshold értéket (áttörési pont). A C_T értékek összehasonlításával relatív értékeket tudunk meghatározni. Általában egy belső kontroll génre, és/vagy egy referencia mintára kapott C_T értékekhez hasonlítjuk a jellemezni kívánt mintát/gént.

Abszolút koncentrációk meghatározásához kalibrációs görbék felvételére van szükség, amik az áttörési ciklusszámokat mutatják a koncentrációk logaritmusának függvényében. Ezekből olyan standard sort kell készíteni, amely az amplifikálandó nukleinsavat ismert koncentrációkban tartalmazza, így az ismeretlen mennyiségű nukleinsavak C_T értékeinek felhasználásával kiszámíthatóak a koncentrációk.

4. Célkitűzések

Jelen dolgozatom célja az alábbi kérdések megválaszolása volt:

1. Milyen mikroRNS-ek expresszálódnak a nyúl genomban?
2. Megtalálhatóak-e a humán, illetve egér mikroRNS-ek homológjai a nyúl mintákban?
3. Milyen hasonlóságok, illetve különbségek fedezhetők fel az egér és a nyúl fibroblaszt, valamint a 13 és fél napos nyúl embrió mikroRNS mintázata között?
4. Hogyan hasonlíthatóak össze a Solid szekvenálás, és a real-time PCR analízis során kapott mikroRNS mintázatok?
5. Használható-e a Solid szekvenálás mikroRNS expresszió kvantitatív becslésére?

5. Anyag és módszer

5.1. Solid szekvenálás

A szekvenálást a Bay Zoltán Közhasznú Nonprofit Kft. Növénygenomikai, Humán Biotechnológiai és Bioenergiái Intézetében (BAYGEN) végezték (ma: a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóközpontjának Genomikai Kutatócsoportja) (www.baygen.hu). A szekvenáláshoz BAYGEN G2939A gépet és Small RNA 1.2 assay-t alkalmaztak. A szekvenáltatott minták a következők voltak: 13 napos CD1 egérből és 13 és fél napos nyúlból származó fibroblaszt, szintén 13 és fél napos nyúlból származó PGC (progenitor germ cell), és embrió, egyszer passzált nyúl embrionális összejték, valamint 6 és 7 napos nyúl embrió.

Az analízishez 5 darab hat napos, 10 darab hét napos és 3 darab 13 és fél napos embriót használtunk fel.

5.2. Felhasznált adatbázisok

A miRNS szekvenciákat a miRbase (www.mirbase.org) szabadon hozzáférhető, online miRNS adatbázisból vettem (Griffiths-Jones, 2004; Griffiths-Jones et al., 2006, 2008; Kozomara and Griffith-Jones, 2011).

A teljes genomokban való keresést a BLAT (Blast-Like Alignment Tool) online szoftverrel végeztem (Kent, 2002; Dreszer et al., 2012).

5.3. RNS preparátum készítése

A real-time PCR analízishez egér és nyúl fibroblasztból, valamint 13 és fél napos nyúl embrióból nyert RNS mintákat használtunk fel.

A fibroblaszt sejtek esetében először eltávolítottuk az elhasznált tápoldatot, majd miután PBS-el mostuk a sejteket, tripszinben 37°C-on, 5 %-os CO₂ koncentráció mellett 10 percen át inkubáltuk. Ez után FM-mel (fibroblaszt médiummal) leállítottuk a tripszint és 7 percen át 4 °C-on, 1400 rpm-en centrifugáltuk. A felülúszó leszívása után a pelletet PBS-ben felfuszpendáltuk és két részre osztottuk. Ez után az előbbi módon ismét centrifugáltuk, majd a PBS leszívása után a pelletet 1ml TRIzol (SIGMA) reagensben felfuszpendáltuk, 10 percig szobahőmérsékleten tartottuk, ezt követően újra felfuszpendáltuk, majd az RNS izolálásig -70 °C-on tároltuk.

A 13 és fél napos embriókat császármetszéssel nyertük ki az anyaméhéből. A kinyert embriókat PBS oldattal mostuk, majd TRizol (SIGMA) reagensbe helyeztük. 5 perc után szuszpendáltuk az embrió szövetdarabjait tartalmazó oldatot, majd további 5 percen keresztül szobahőmérsékleten tartottuk a szuszpenziót. Ezt követően újra szuszpendáltuk az oldatot, majd az RNS izolálásig -70 °C-on tároltuk.

5.4. RNS izolálás és koncentráció mérés

A -70 °C-ról felolvasztott mintákat először kloroformmal mostuk (1 ml mintához 0,2 ml kloroformot adtunk), majd szobahőmérsékleten néhány percig állni hagytuk. Centrifugálás (4 °C, 12 rpm, 15 perc) után az RNS-t tartalmazó felülúszót külön választottuk, majd egy az egy arányban izopropanolt (REANAL) adtunk hozzá. Szobahőmérsékleten 10 percig állni hagytuk, majd újabb centrifugálás (4 °C, 12 rpm, 15 perc) után eltávolítottuk a felülúszót, az RNS-t tartalmazó pelletet pedig 1ml 75 %-os etanollal mostuk. Egy végső centrifugálás (4 °C, 7.5 rpm, 5 perc) után kaptuk meg a tiszta RNS pelletet, amit ezek után nukleáz-mentes vízben (Invitrogen) oldottunk fel.

A kapott RNS minta koncentrációját Thermo Scientific NanoDrop TM 1000 Spectrophotometer-el mértük, amely nem csak a minta koncentrációját, hanem a tisztaságát is méri. Ennek mértékét két arányszámmal adja meg. Az egyik, a 260 és a 280, a másik pedig a 260 és a 230 nm-en mért abszorbancia aránya (260/280, 260/230). RNS esetében az első értéknek 2,0 körül, a másodiknak 2,2 körül kell lennie. Ha valamelyik érték feltűnően alacsony, az azt jelenti, hogy olyan szennyeződés van benne, aminek 280 (pl. fehérje, fenol), illetve 230 nm körül magas az abszorbanciája (T009 - Technical Bulletin NanoDrop 1000 & 8000, Thermo Fisher Scientific – NanoDrop products).

Az izolált RNS-t felhasználásig -70 °C-on tároltuk.

5.5. Reverz transzkripció

A real-time PCR analízis elvégzéséhez az RNS-ről először reverz transzkripcióval cDNS-t kell szintetizálni. A cDNS írást TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit-el végeztük (Applied Biosystems).

A reverz transzkripcióhoz 15 µl-es eppendorf csövekbe 10 µl master mixet és 5 µl mintát mértünk. A minták minden esetben 5 ng/µl koncentrációjúak voltak, a master mix pedig 0,15 µl dNTP mixet, 1,00 µl Multiscribe™ RT enzimet, 1,5 µl 10 × RT Buffert, 0,19 µl

RNase inhibitort 4,16 µl nukleáz-mentes vizet, és 3,00 µl RT primert (1. táblázat) tartalmazott.

A reakcióhoz a következő TaqMan génexpressziós assay-ket alkalmaztuk (Applied Biosystems):

Assay	Kód		ID	Szekvencia
hsa-miR-302a-3p	4427975	RT/TM	000529	UAAGUGCUUCCAUGUUUUGGUGA
hsa-miR-367-3p	4427975	RT/TM	000555	AAUUGCACUUUAGCAAUGGUGA
hsa-miR-92a-3p	4427975	RT/TM	000430	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUG
hsa-let-7b-5p	4427975	RT/TM	002619	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
hsa-miR-125b-5p	4427975	RT/TM	000449	UCCCUGAGACCCUAAACUUGUGA
hsa-miR-145b-5p	4427975	RT/TM	002278	GUCCAGUUUCCCAGGAAUCCCU
hsa-miR-191-5p	4427975	RT/TM	002299	CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG

1. táblázat A reverz transzkripció és a real-time PCR analízis során használt RT illetve TM primerek adatai

A reverz transzkripcióhoz a következő PCR beállítást alkalmaztuk:

1. 16 °C 30 perc
2. 42 °C 30 perc
3. 85 °C 5 perc
4. 4 °C kivétel

Az elkészült cDNS-t felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

5.6. Real-time PCR analízis

A valós idejű kvantitatív PCR (real-time PCR) használatával lehetőségünk volt a miRNS-ek relatív expressziójának meghatározására. A real-time PCR-t Eppendorf Mastercycler® ep realplex⁴ géppel végeztük.

A reakcióhoz 15 µl-es 96 lukú twinpic plate-et alkalmaztunk, melyre lukanként 14 µl Taq Mixet és 1 µl mintát mértünk. A Taq Mix 7,5 µl Master Mix-ből (TaqMan® Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems), 0,75 µl TM primerből (TaqMan® Gene Expression Assays, Applied Biosystems) és 5,75 µl nukleáz-mentes vízből (Invitrogen) állt.

A relatív expressziók meghatározásához a GenEx Standard szoftvert (MultiD, www.multid.se) alkalmaztuk. A miRNS expressziós értékeket a miR-191 mikroRNS expressziójához normalizáltuk.

A reakcióhoz a következő PCR ciklust alkalmaztuk (a 2-3-as pont 40-szer ismételve):

1. 95 °C 10 perc
2. 95 °C 20 perc
3. 60 °C 1 óra 5 perc

5.7. Relatív expresszió számítások

A PCR futások során minden mintából, minden miRNS-re három párhuzamost futattunk, így három C_T értéket kaptunk, ahol az a jó, ha minél kisebb a szórás. A későbbi diagramokon ábrázolt relatív expressziós értékeket úgy kaptuk, hogy mindhárom paralellre kapott C_T értékből kivontuk az azonos futásban, ugyan abban a mintában a miR-191-re kapott, három paralellből számított átlagos C_T értéket, majd az így kapott három számból átlagot számoltunk (ΔC_T), végül a kettőt ennek a negatív hatványára emeltük:

$$R = 2^{-\Delta C_T}$$

$$\Delta C_T = C_{T_x} - C_{T_{miR191}}$$

vagyis:

$$R = 2^{-[C_T(X) - C_T(miR191)]}$$

6. Eredmények

6.1. Solid szekvenálással kapott eredmények

Solid szekvenálással (SOLiD™ System Small RNA Analysis) elemzett egér, illetve nyúl mintákban kerestem ismert humán és egér mikroRNS szekvenciákat, és a kapott read számokat (találatszámokat) vizsgáltam. A szekvenáltatott minták a következők voltak:

1. Egér fibroblaszt (mouse embryonic fibroblast, MEF)
2. Nyúl fibroblaszt (rabbit embryonic fibroblast, rabEF)
3. Nyúl embrionális őssejt (ES)
4. Nyúl ősvasejt (primordial germ cell, PGC)
5. 6 napos nyúl embrió (6d)
6. 7 napos nyúl embrió (7d)
7. 13 és fél napos nyúl embrió (13.5d)

A különböző fejlődési állapotok között tapasztalt expresszió-különbségekből következtethetünk arra, hogy mely miRNS-ek lehetnek őssejt-specifikusak. A nyúl őssejt kultúrák tápláló sejtrétegeként az egér fibroblaszt szolgál. Ennek elemzésével képet kaphatunk arról is, hogy milyen mértékű lehet a nyúl őssejtből nyert RNS mintában az egér fibroblasztból származó kontamináció. A szekvenálás során az egyes mintákban kapott teljes találatszámokat az alábbi táblázat (2. táblázat) és a mellékletben található diagram (I. ábra) mutatja.

Az elemzés során arra voltunk kíváncsiak, hogy pusztán a szekvenálással biztos képet kaphatunk-e arról, hogy egy-egy miRNS expresszálódik-e a mintában, vagy sem, illetve arra, hogy a kapott read számok (találatszámok) alkalmasak-e miRNS expresszió kvantitatív becslésére. A kereséshez humán és egér őssejt-specifikus miRNS-eket választottunk ki. A szekvenciákat a miRbase (www.mirbase.org) online, szabadon hozzáférhető miRNS adatbázisból vettük. A keresett miRNS-ekre kapott találatszámokat a melléklet (I. táblázat) tartalmazza.

minta neve	összes találatszám
1. MEF	397054
2. rab EF	382837
3. rab ES	408319
4. rab PGC	224596
5. rab 6d emb	104235
6. rab 7d emb	159130
7. rab 13.5d e	1136498

2. táblázat Az összes találatszám az egyes mintákban.

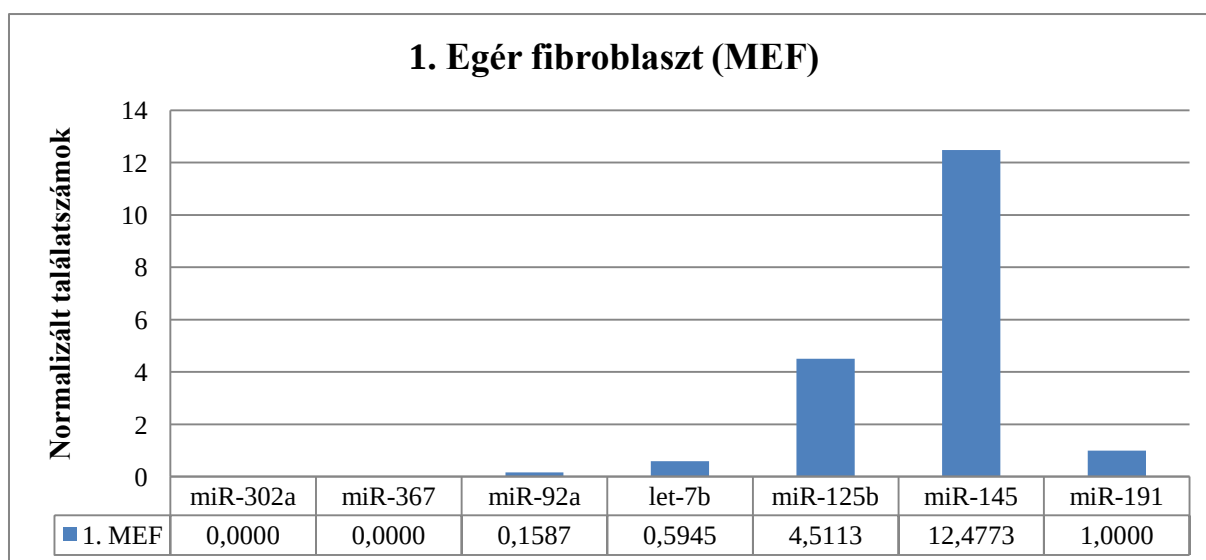
A szekvenciák validálásához igyekeztünk olyan miRNS-eket kiválasztani, amelyeknek a Solid szekvenálás során kapott read számai között viszonylag nagy különbség volt, hogy

első lépésként azt lássuk, hogy a kapott mintázatok nagyságrendileg megegyeznek-e. A validááshoz kiválasztott miRNS-ekre kapott találatsszámokat a következő táblázat (3. táblázat), a találatsszámok alapján a miRNS-ek mintánkénti megoszlását pedig az alábbi diagramok (3-6. ábra) mutatják.

Név	Szekvencia	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
		MEF	EF	ES	PGC	6d	7d	14d
miR-302a-3p	TAAGTGCTTCCATGTTTGGTGA	0	0	8	0	0	19	2
miR-367-3p	AATTGCACTTTAGCAATGGTGA	0	0	0	0	0	0	0
miR-92a-3p	TATTGCACTTGTCCCGGCCTGT	126	465	95	1441	53	415	6919
let-7b-5p	TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTT	472	124	73	8	1	29	345
miR-125b-5p	TCCCTGAGACCCTAACTTGTGA	3582	1820	696	89	9	18	13055
miR-145-5p	GTCCAGTTTTCCAGGAATCCCT	9907	2753	1466	215	29	182	5809
miR-191-5p	CAACGGAATCCCAAAGCAGCT	794	737	171	136	12	252	5342

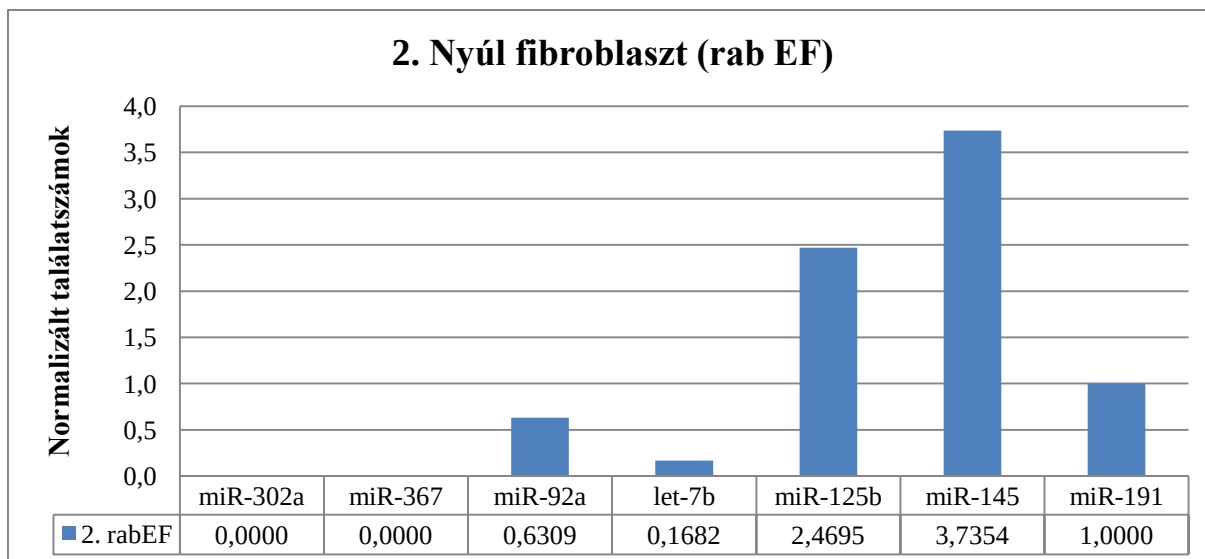
3. táblázat A kiválasztott miRNS-ekre a Solid szekvenálás során kapott pontos találatsszámok, és a keresett szekvenciák.

A relatív értékek meghatározásához minden találatsszámot az adott minta teljes találatsszámaival, valamint a mintán belüli miR-191 találatsszámaival osztottuk, mivel ezt használtuk belső kontrollként (housekeeping gene). A relatív találatsszámokat összefoglaló táblázatot a melléklet (II. táblázat) tartalmazza.



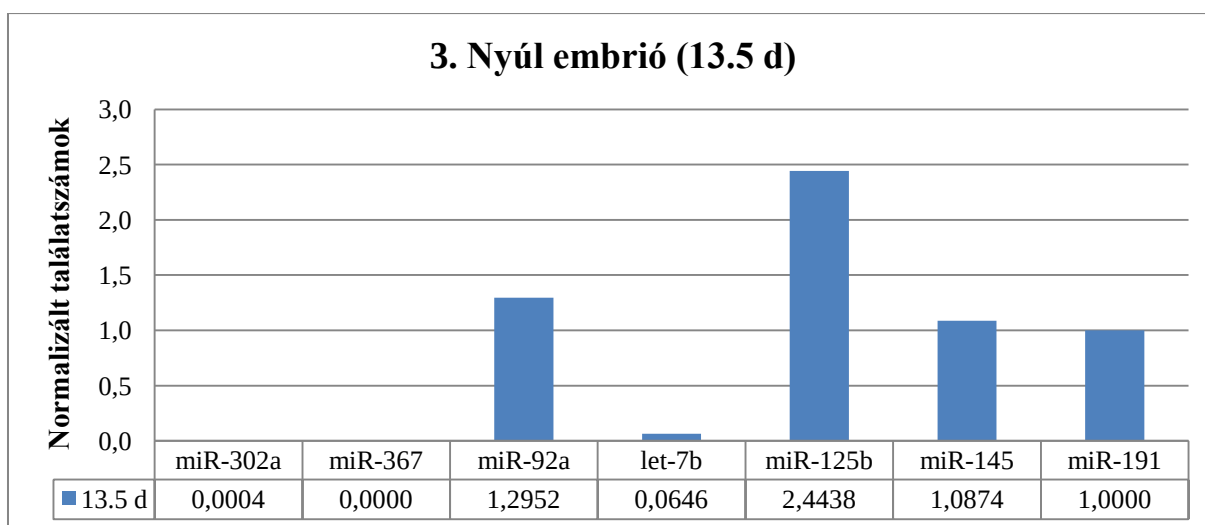
3. ábra A Solid szekvenálással kapott, a minta teljes találatsszáma és a miR-191-re normalizált találatsszámok az egér fibroblaszt mintában.

Az egér fibroblaszt mintában a szekvencia adatok alapján egyértelműen az látszik, hogy a miR-145 expressziója a legerősebb, míg a miR-302 és a miR-306 szekvenciáit egyáltalán nem találtuk meg.



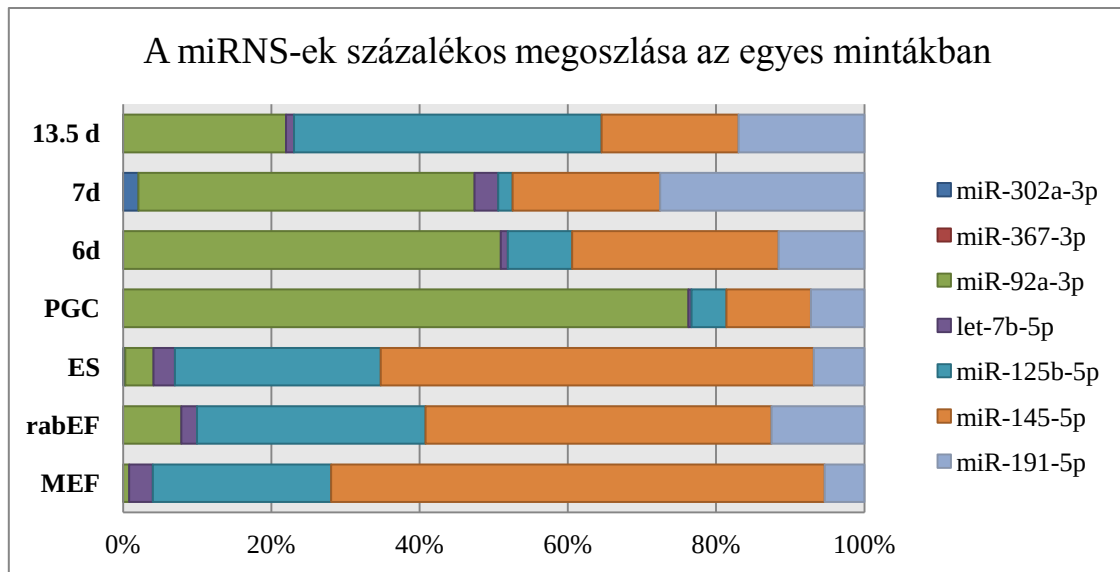
4. ábra A Solid szekvenálással kapott, a minta teljes találatsszáma és a miR-191-re normalizált találatsszámok az nyúl fibroblaszt mintában.

A szekvenálás során kapott találatsszámok alapján a nyúl fibroblaszt mintában is a miR-145 szintje volt kiugróan magas a többi miRNS-éhez viszonyítva, viszont a számadatokat összehasonlítva az egér mintához képest jóval alacsonyabb. A miR-302 és a miR-367 szekvenciáit ebben a mintában sem találtuk meg.



5. ábra A Solid szekvenálással kapott, a minta teljes találatsszáma és a miR-191-re normalizált találatsszámok a 13 és fél napos nyúl embrió mintában.

A nyúl embrió szekvencia adataiban a fibroblasztokhoz képest jelentősen eltérő mintázat mutatkozik. A miR-145 szintje nem kiugróan magas, a miR-92 találatsszáma viszont a többi miRNS-éhez képest jelentősen magasabb, mint a fibroblaszt mintákban. A miR-125 találatsszáma a nyúl fibroblasztéhoz hasonló, de ebben a mintában a miR-302a is megjelenik, bár igen alacsony relatív találatsszámmal (2/1136498).



6. ábra A miRNS-eknek a Solid szekvenálás során kapott találatszámok alapján vett százalékos megoszlása az egyes mintákban.

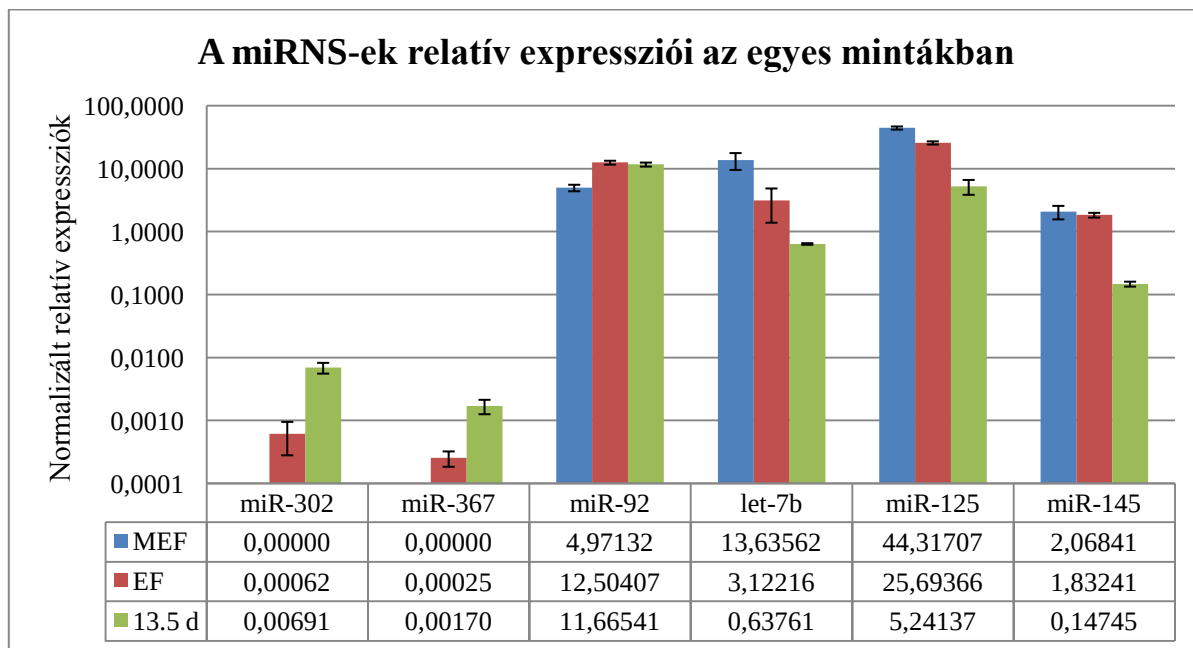
A 6. ábrán jól látható, hogy a várakozásainknak megfelelően, az egér és a nyúl fibroblaszt nagyon hasonló találatszám-arányokat mutat, bár a nyúl fibroblasztban erősebben megjelenő miR-92 egy kicsit eltolja a mintázatot. Az is látszik azonban, hogy a nyúl összejt találatszám-eloszlása is igen hasonló. Ez utóbbi, feltehetően, részben az egér fibroblasztból származó szennyeződésnek köszönhető. A miR-302a a hét napos embrióban jelent meg magasabb találatzással, míg a miR-92 első sorban PGC-specifikusnak mondható, de a korai embrióban is magas a találatzása. A miR-125 értéke a PGC és a korai embrió minták esetében alacsony, a miR-145 pedig első sorban fibroblaszt-specifikusnak tűnik. A miR-191 találatzása a hét napos embrióban a többihez képest magasabb, e miatt, amennyiben a miR191-et szeretnénk viszonyítási alapként használni, akkor a 6-7 napos embrió esetében történő analízist valamint a fibroblasztok, a 13,5 napos embrió és PGC analízisét külön csoportban kell elvégezni.

6.2. Kvantitatív real-time PCR analízis eredményei

A kvantitatív, valós idejű PCR lehetőséget ad arra, hogy a képződő termékek koncentrációját a reakció alatt folyamatosan detektáljuk. Eredményül a C_T értékeket kapjuk (az a ciklusszám, ahol a görbe átlépi a treshold értéket, vagyis az áttörési pontot), amelyek segítségével kiszámíthatjuk a belső kontroll génhez (housekeeping gene) viszonyított relatív expressziós értékeket.

Egér és nyúl fibroblaszt, valamint 13 és fél napos nyúl embrió mintában 7 miRNS expresszióját vizsgáltuk. A kapott értékeket a miR-191 expressziójához normalizáltuk. A

relatív expressziós értékeket az alábbi diagram (7. ábra) mutatja. A mintánkénti ábrázolás a mellékletben (II., III., IV. ábra) található.



7. ábra A miRNS-ek real-time PCR analízis során kapott C_T értékeiből számított relatív expressziók, a miR-191-re normalizálva, logaritmikus skálán, a standard hiba feltüntetésével. Ugyan ez a diagram normál skálával megtalálható a mellékletben (II. ábra).

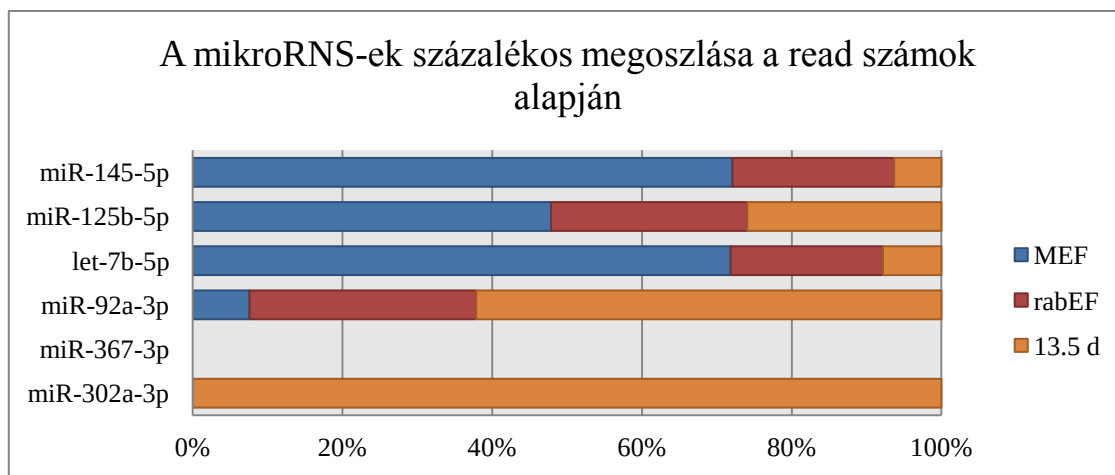
Az adatokból jól látszik, hogy a miR-302a és a miR-367 nem expresszálódott az egér fibroblasztban, és a többi mintában is igen alacsony szinten. A miR-125 expressziója, a többi miRNS-éhez képest, kiugróan magas az összes mintában, de főként az egér fibroblasztban. A miR-92, a let-7b, és a miR-125 szintje igen eltérő a két fibroblaszt mintában.

Az egyes mintákban lévő miRNS mintázatokat összehasonlítva azt mondhatjuk, hogy az egér és a nyúl fibroblaszt expressziós mintázata elég hasonló, bár ebből kilóg a miR-92, amelynek a nyúl fibroblasztban tapasztalható magas expressziója kissé eltolja a mintázatot. Ez azt jelenti, hogy az a miRNS, amelyik az egér fibroblasztban erősebben expresszálódik a többinél (pl. miR-145), az a nyúl fibroblasztban is erősebben expresszálódik, mint a többi miRNS, de nem feltétlenül ugyan annyival erősebben. A mintán belüli miRNS-eloszlás tehát hasonlóan mondható, de megjegyzendő, hogy itt olyan miRNS-eket vizsgáltunk, amelyek expressziója között viszonylag nagy különbségek voltak várhatóak. Egy finomabb összehasonlítás során, több miRNS-t nézve, ez nem biztos, hogy megállná a helyét. Megjegyzendő továbbá az is, hogy bár a mintázatok hasonlóak, az egzakt adatokat nézve, az egér fibroblaszt expressziós értékei jóval magasabbak, kivéve a miR-92 esetében, ahol viszont a nyúl fibroblasztban sokkal magasabb az expresszió. Az embrió mintát mindkét

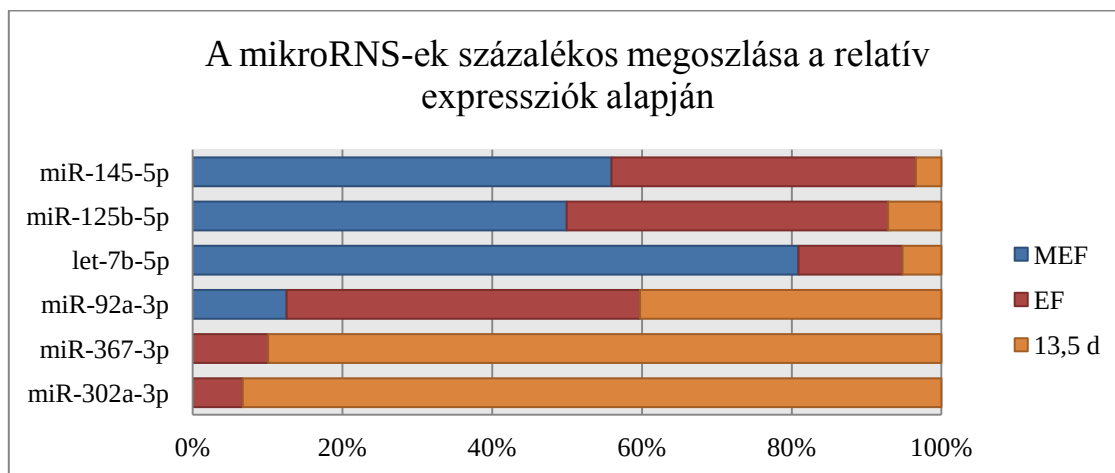
fibroblaszthoz viszonyítva ugyan ezt mondhatjuk el, de itt is kivétel a miR-92, amely a nyúl fibroblaszt és az embrió összehasonlítása során beleillik a mintázatba, de az egér fibroblasztban „túl alacsony” a szintje. Összefoglalva tehát azt mondhatjuk, hogy a mintázatok között felfedezhetőek hasonlóságok, de a tényleges adatokat nézve az expressziós különbségek nagyon nagyok.

6.3. A két módszer eredményeinek összehasonlítása

Végül a két módszer eredményeinek összevetése következett. Az alábbi összehasonlító diagramon a miRNS-ek százalékos megoszlását láthatjuk az egyes mintákban (8. és 9. ábra).



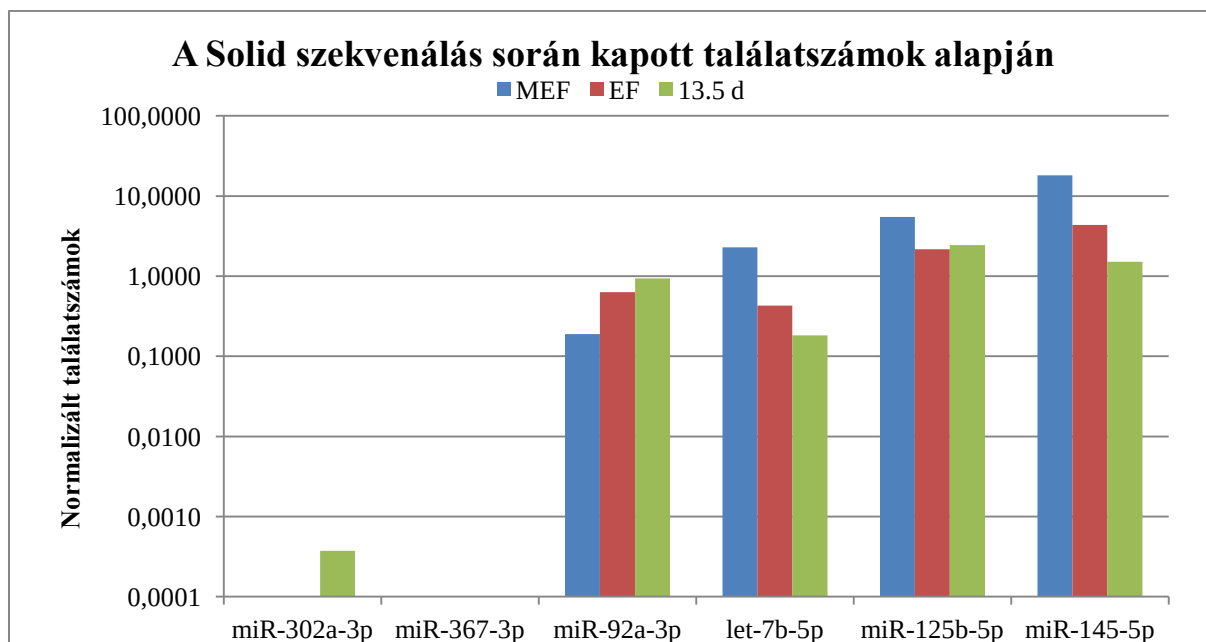
8. ábra A miRNS-ek százalékos megoszlása az egyes minták között a Solid szekvenálás adatai alapján.



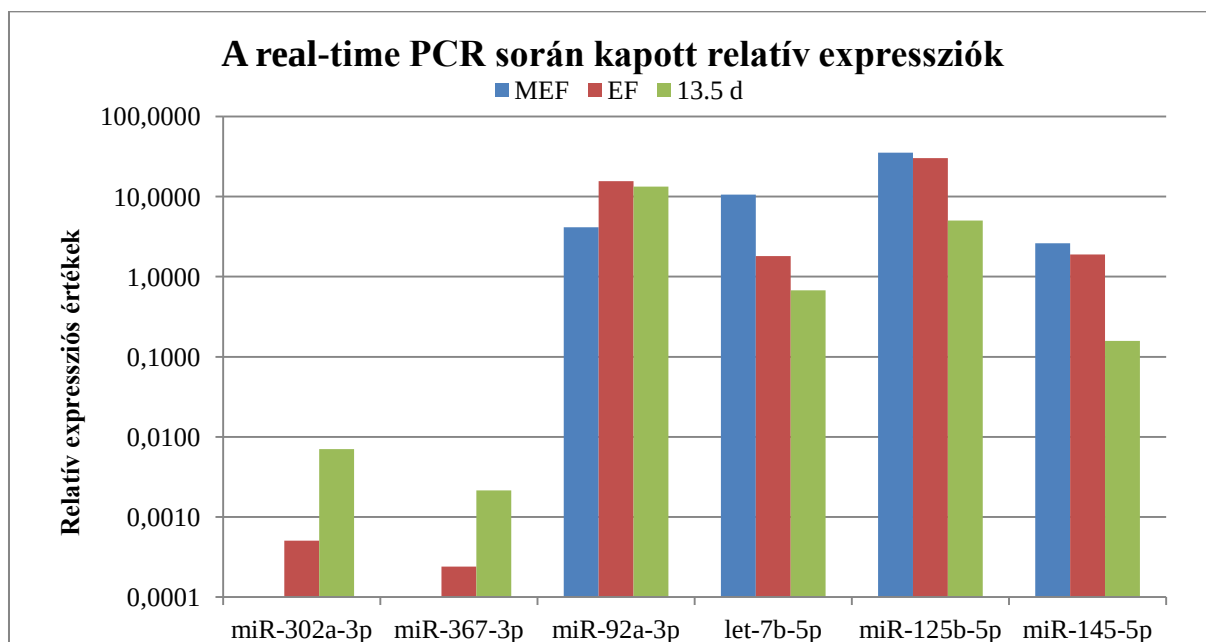
9. ábra A miRNS-ek százalékos megoszlása az egyes minták között a real-time PCR analízis alapján.

Ha összehasonlítjuk a két módszerrel kapott mintákon belüli miRNS-arányokat, akkor azt mondhatjuk, hogy a két kapott mintázat elég hasonló. Látható azonban az is, hogy a real-time PCR analízis során a nyúl fibroblaszt és embrió mintában kimutatható volt a miR-367 és a miR-302 jelenléte, míg a szekvencia adatokban e két miRNS közül csak a miR-302 fordult elő, és az is csak az embrióban, nagyon kicsi találatsszámmal. Más kutatókkal konzultálva

kiderült, hogy ők is tapasztalták, hogy a Solid szekvenálás nem képes kimutatni bizonyos miRNS-ek jelenlétét, de irodalmi adat erről egyelőre nem áll rendelkezésre, a jelenség oka nem ismert. Az alábbi diagramokon (10. és 11. ábra) ugyan ezen adatokat hasonlítjuk össze, csak nem a százalékos megoszlás, hanem az eredeti, normalizált értékek alapján.



10. ábra A Solid szekvenálás során kapott, miR-191-re normalizált találatszámok mintánkénti eloszlása, logaritmikus skálán.



11. ábra A real-time PCR analízis során kapott, miR-191-re normalizált expressziós értékek mintánkénti eloszlása, logaritmikus skálán.

A 10-es és 11-es ábrán jól megfigyelhető, hogy míg a let-7b és a miR-145 mintázata, a két módszert összevetve hasonló, addig a miR-92 és a miR-125 esetén az embrióban a

szekvenálással indokolatlanul nagy találatszámot kaptunk. Bár a let-7b és a miR-145 esetében a két módszer során kapott expressziós mintázatok összehasonlíthatóak, meg kell jegyezni, hogy a számszerűsített adatokat nézve, a nagyságrendi arányok igen eltérőek. Ugyan ezt mondhatjuk el, ha egy-egy mintán belül a miRNS-ek egymáshoz viszonyított arányát nézzük, és akkor is, ha egy-egy miRNS minták közti eloszlását vizsgáljuk.

6.4. Az eredmények értékelése

Jelen dolgozatomban első sorban arra kerestük a választ, hogy a Solid szekvenálással nyert adatok alapján végezhetünk-e miRNS-expresszió becslést, illetve, hogy ez a szekvenálási technika mennyire képes kimutatni az egyes miRNS-ek expresszáldását, vagy annak hiányát. Ehhez humán és egér miRNS-ek szekvenciáit kerestük az egér és nyúl mintákban, arra is keresve a választ, hogy megtalálhatóak-e a humán és egér miRNS-ek homológjai a nyúl mintákban, valamint, hogy ezek szekvenciája mennyire hasonlít, vagy tér el a referencia fajokétól. Kíváncsiak voltunk továbbá arra is, hogy milyen hasonlóságok, illetve különbségek fedezhetőek fel az egér, és a nyúl fibroblaszt, valamint a 13 és fél napos nyúl embrió miRNS-mintázata között.

A szekvencia analízis során számos humán és egér miRNS homológját sikerült azonosítanunk a nyúl mintákban, melyeket azután a nyúl genomban is megtaláltunk. Egyes esetekben a humán, illetve az egér szekvenciától bizonyos mértékben eltérő, nyúl-specifikus szekvenciákat találtunk.

A real-time PCR analízissel végzett, minták közti miRNS mintázat összehasonlítás során azt tapasztaltuk, hogy különösen a nyúl fibroblaszt és az embrió mintázata között fedezhetőek fel hasonlóságok, ám a tényleges expressziós értékek között nagyságrendi különbségek vannak. A szekvencia adatokat, és a real-time PCR analízis során kapott eredményeket összevetve, azt mondhatjuk, hogy a Solid szekvenálással kapott adatok nagy vonalakban mutatják az egyes miRNS-ek jelenlétét, és eloszlását, de előfordul, hogy egyes miRNS-ek jelenlétét, eddig ismeretlen okokból, nem képes kimutatni, és pontos expresszió becslésre sem alkalmas. Bár a pontos arányokat, és mintázatot nem határozhatunk meg vele, arra alkalmas, hogy azt mondhassuk, hogy egy miRNS „erősen expresszáldódik”, vagy „nagyon gyengén expresszáldódik” a mintában. Így, a mintát nagy vonalakban feltérképezve, láthatjuk, hogy mely miRNS-eket mely mintákban érdemes tovább vizsgálni.

Mindemellett a Solid szekvenálás nagyon jól alkalmazható arra, hogy új, faj-, vagy szövet-specifikus miRNS-eket azonosíthassunk.

Feltételezéseink szerint, a két módszer pontosabb összehasonlítását tenné lehetővé az RNAzol reagensbe felvett RNS preparátumok használata. Ebben az esetben az izolálás során külön választhatjuk a miRNS frakciót. Így, az eddigi mintáinkkal ellentétben, ahol a real-time PCR reakcióhoz teljes RNS-ről írt cDNS-t alkalmaztunk, ezeknek az új RNS mintáknak az analízise során, lehetővé válna a teljes miRNS koncentrációhoz viszonyítani az egyes gének expressziós szintjét. Ugyan ezt az összehasonlítást megtehetjük a Solid szekvencia adatokkal is, hiszen ott is tudjuk, hogy az összes read számból mennyi lehet a miRNS. Így talán közelebb hozhatnánk a két módszer eredményeit egymáshoz

A további vizsgálatok során tervezzük ezen felül több minta bevonását a real-time PCR analízisbe, mint pl. a 6 és 7 napos nyúl embrió, és a nyúl PGC (ősivarsejt), amelyekről a szekvencia adatok már a rendelkezésünkre állnak. Szeretnénk továbbá több miRNS-t is megvizsgálni, és összehasonlítani a szekvencia adatokat, a PCR-rel kapott expressziós szintekkel, és mintázatokkal. E mellett szeretnénk minél több, első sorban a feltehetően őssejt-specifikus, miRNS funkcionális analízisét elvégezni. Ez a különböző mintákban a miRNS-ek in vitro túlexpresszáltatására és gátlására történő változások vizsgálatát jelenti.

7. Összefoglalás

Az elmúlt évtizedek kutatásai során derült fény a mikroRNS-ek (miRNS) létezésére, és az általuk betöltött fontos génregulációs mechanizmusokra. A miRNS-ek olyan 21-26 nukleotid hosszú, fehérjét nem kódoló, egyszálú RNS molekulák, amelyek alapvető szabályozó funkciók érzékeny beállításában vesznek részt. Szabályozó szerepüket a gének poszttranszkripcionális módosítása során fejtik ki azáltal, hogy az mRNS 3' végén található nem transzlálódó régióhoz (UTR, Untranslated Region) kötődnek és ott a transzlációt gátolják, vagy az mRNS degradációját okozzák. A miRbase adatbázisban több mint 1000 humán (*Homo sapiens*), és több mint 800 egér (*Mus musculus*) miRNS szerepel, egyelőre azonban nem közöltek nyúl (*Oryctolagus cuniculus*) miRNS szekvenciákat. Számos kutatás irányul egyes sejttípusokra, vagy megbetegedésekre specifikusan jellemző miRNS expressziós mintázatok meghatározására.

Jelen dolgozatom célja annak a hipotézisnek a tesztelése volt, hogy a Solid szekvenálás során kapott találatszámok miRNS expresszió becslésre alkalmasak, valamint egy olyan módszer kidolgozása, amellyel a Solid szekvenálás során kapott adatok összehasonlíthatóak a real-time PCR analízis során kapott eredményekkel. Solid szekvenálással kapott egér és nyúl fibroblaszt, valamint 13 és fél napos nyúl embrió minták szekvencia adataiban kerestük már leírt, humán és egér mikroRNS-ek homológjait. Ezek után egér és nyúl fibroblasztból, valamint 13 és fél napos nyúl embrióból izolált RNS mintákban real-time PCR analízissel vizsgáltuk különböző mikroRNS-ek jelenlétét és expressziós szintjét. Végül összehasonlítottuk a két módszerrel kapott adatokat.

Eredményeink alapján azt mondhatjuk, hogy a Solid szekvenálás során kapott találatszámok egy az egyben nem hasonlíthatóak össze a real-time PCR analízis során kapott relatív expressziós értékekkel, pontos génexpressziós mintázat általuk nem írható le. Bár egyes esetekben nagyságrendi becslést végezhetünk, ezek megbízhatósága igen kicsi, pontos arányok meghatározására pedig egyáltalán nem alkalmas.

Feltételezéseink szerint pontosabb összehasonlítást tenne lehetővé az RNAzol reagensbe felvett RNS preparátumok használata, amelynél az izolálás során külön választhatjuk a miRNS frakciót. Ezeknek a mintáknak az analízise során, lehetővé válna a teljes miRNS koncentrációhoz viszonyítani az egyes gének expressziós szintjét. Ugyan ezt az összehasonlítást megtehetjük a Solid szekvencia adatokkal is, hiszen ott is tudjuk, hogy az összes találatzámból mennyi lehet a miRNS. Így talán közelebb hozhatnánk a két módszer eredményeit egymáshoz, és fel tudnánk állítani egy összehasonlítási skálát.

8. Summary

Over the past few decades microRNAs (miRNA) have emerged as important regulators of gene expression networks. Since then, numerous studies tried to identify miRNAs and analyse their function. It is proven, that they have important regulatory roles in proliferation, apoptosis, cell differentiation, and link to numerous types of cancer specific miRNA expression patterns are known.

MiRNAs are 21-26 nucleotide long, non-coding, single stranded RNAs, which have an important role in the sensitive adjustment of basic functions by posttranscriptional gene regulation. They target sites are in the three prime untranslated regions (3' UTR) of messengerRNA (mRNA), where they repress the translation or cleavage the mRNA.

According to data of miRbase, more than 1000 human (*Homo sapiens*) and more than 800 mouse (*Mus musculus*) miRNAs are known, but not any yet in rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). Numerous studies try to identify specific gene expression patterns of specific cell types, or cancers.

In this study we would like to test the hypothesis according to which the number of reads, what we get by Solid sequencing, could be used to estimate the gene expression level. Moreover, we would like to devise a method to compare the data of Solid sequencing with the results of real-time PCR analysis. With this object we searched known human and mouse miRNA sequences in sequenced mouse fibroblast, rabbit fibroblast and 13.5-day-old rabbit embryo. After that, we isolated RNA from mouse and rabbit fibroblasts, and rabbit 13.5-day-old embryo, than analysed it by real-time PCR to identify some of the searched miRNAs.

As a result of comparison, it could be established that the read numbers of Solid sequencing cannot be directly compared to the relative expression levels of real-time PCR analysis. Although in some cases we could estimate the order of magnitude, these are not really reliable, and we could not identify exact scales or expression patterns.

We suppose it could be possible to perform more exact comparison, if we used RNazol Reagent for RNA isolation. It let us to isolate separately the miRNA fraction, and we could use cDNA for the real-time PCR from miRNA fraction. In this case it could be possible to compare each miRNA's expression to the all miRNA expression level. It could be done the same analysis with the read numbers of Solid sequencing, because we know the number of the total miRNA reads. So, we could make more exact comparison between the two methods.

9. Irodalomjegyzék

- Ambros V, Lee RC, Lavanway A, Williams PT, Jewell D. (2003). MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr. Biol.* 13, 807–818.
- Ambros V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature* 431, 350–355.
- Anokye-Danso F, Trivedi CM, Jühr D, Gupta M, Cui Z, Tian Y, Zhang Y, Yang W, Gruber PJ, Epstein JA and Morrissey EE. (2011). Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 8, 376–388.
- Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, Chiba T, Yamanaka S. (2008). Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 321(5889), 641.
- Aravin AA, Lagos-Quintana M, Yalcin A, Zavolan M, Marks D, Snyder B, Gaasterland T, Meyer J, Tuschl T. (2003). The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev. Cell* 5, 337–350.
- Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S, Allgayer H. (2008). MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor *Pdcd4* and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* 27 (15), 2128–36. doi:10.1038/sj.onc.1210856. PMID 17968323.
- Aukerman MJ, and Sakai H. (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its *APETALA2*-like target genes. *Plant Cell* 10, 10.
- Bartel DP. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–297.
- Bősze Zs, Gócsa E. (2005). Transzgénikus haszonállatok előállításának lehetőségei és céljai. in *Heszky L., Fésüs L., Hornok L (szerk.) Mezőgazdasági Biotechnológia*. Agroiinform Kiadó, Magyarország, 2005, ISBN: 963 502 8377. pp. 264–286.
- Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, and Cohen SM. (2003). Bantam encodes a developmentally regulated mi-croRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell* 113, 25–36.
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes *miR15* and *miR16* at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 15524–15529.

- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 2999–3004.
- Caravas J, Friedrich M. (2010). Of mites and millipedes: Recent progress in resolving the base of the arthropod tree. *BioEssays* 32 (6), 488–95. doi:10.1002/bies.201000005. PMID 20486135.
- Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. (2005). MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 65 (14), 6029–33. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0137. PMID 16024602.
- Chen X. (2003). A MicroRNA as a Translational Repressor of APET-ALA2 in Arabidopsis Flower Development. *Science* 303, 2022.
- Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY. (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 18, 997–1006.
- Chien A, Edgar DB, and Trela JM. (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol.* 127 (3), 1550–1557.
- Cullen BR. (2004). Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol. Cell* 16, 861-865.
- Dreszer TR, Karolchik D, Zweig AS, Hinrichs AS, Raney BJ, Kuhn RM, Meyer LR, Wong M, Sloan CA, Rosenbloom KR, Roe G, Rhead B, Pohl A, Malladi VS, Li CH, Learned K, Kirkup V, Hsu F, Harte RA, Guruvadoo L, Goldman M, Giardine BM, Fujita PA, Diekhans M, Cline MS, Clawson H, Barber GP, Haussler D, Kent WJ. (2012). The UCSC Genome Browser database: extensions and updates 2011. *Nucleic Acids Res.* 40 (Database issue), D918-23.
- Emery JF, Floyd SK, Alvarez J, Eshed Y, Hawker NP, Izhaki A, Baum SF, and Bowman JL. (2003). Radial patterning of arabidopsis shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. *Curr. Biol.* 13, 1768-1774.
- Evans MJ and Kaufman MH. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Fischer B, Chavatte-Palmer P, Viebahn C, Navarrete Santos A, Duranthon V. (2012). Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction* 144, 1-10.

- Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *NAR* 34(Database Issue), D140-D144.
- Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. (2008). miRBase: tools for microRNA genomics. *NAR* 36(Database Issue), D154-D158.
- Griffiths-Jones S. (2004). The microRNA Registry. *NAR* 32(Database Issue), D109-D111.
- Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie, DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106, 23–34.
- Hammond SM. (2006). RNAi, microRNAs, and human disease. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 58, Suppl 1: s63–8. doi:10.1007/s00280-006-0318-2. PMID 17093929.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6, 986-994 doi: 10.1101/gr.6.10.986.
- Houbaviy H.B, Murray MF Sharp PA. (2003). Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev. Cell* 5, 351–358.
- Hu Y, Correa AM, Hoque A, Guan B, Ye F, Huang J, Swisher SG, Wu TT, Ajani JA, Xu XC. (2011). Prognostic significance of differentially expressed miRNAs in esophageal cancer. *Int. J. Cancer* 128 (1), 132–43. doi:10.1002/ijc.25330. PMC 2937084. PMID 20309880.
- ICZN. (2010). Opinion 2245 (Case 3407). *Drosophila* Fallén, 1823 (Insecta, Diptera): *Drosophila funebris* Fabricius, 1787 is maintained as the type species. *Bulletin of Zoological Nomenclature.* 67 (1), 106-115.
- Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM. (2005). MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* 65 (16), 7065–70. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1783. PMID 16103053.
- Iorio MV, Visone R, Di Leva G, Donati V, Petrocca F, Casalini P, Taccioli C, Volinia S, Liu CG, Alder H, Calin GA, Ménard S, Croce CM. (2007). MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res.* 67 (18), 8699–707. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1936. PMID 17875710.
- Jiang Q, Wang Y, Hao Y, Juan L, Teng M, Zhang X, Li M, Wang G, Liu Y. (2009). miR2Disease: a manually curated database for microRNA deregulation in human disease.

- Nucleic Acids Research. 37 (Database issue), D98–104. doi:10.1093/nar/gkn714. PMC 2686559. PMID 18927107.
- Judson RL, Babiarz JE, Venere M, Bluelloch R. (2009). Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat Biotechnol* 27, 459–461.
- Kanellopoulou C, Muljo SA, Kung AL, Ganesan S, Drapkin R, Jenuwein T, Livingston DM, Rajewsky K. (2005). Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev.* 19, 489–501.
- Kang SJ and Grossniklaus HE. (2011). Rabbit model of retinoblastoma. *J Biomed Biotechnol* 394730.
- Kent WJ. (2002). BLAT - the BLAST-like alignment tool. *Genome Res.* 4, 656–64.
- Ketting RF, Fischer SEJ, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RHA. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* 15, 2654–2659.
- Koch WH. (2004). Technology platforms for pharmacogenomic diagnostic assays. *Nature Reviews Drug Discovery* 3, 749–761 doi:10.1038/nrd1496.
- Kozomara A and Griffiths-Jones S. (2011). miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *NAR* 39(Database Issue), D152–D157.
- Krichevsky AM, King KS, Donahue CP, Khrapko K, Kosik KS. (2003). A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *RNA* 9, 1274–1281.
- Kuo CH, Deng JH, Deng Q, Ying SY. (2012). A novel role of miR-302/367 in reprogramming. *Biochem Biophys Res Commun.* 417(1), 11–6.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A, Tuschl T. (2003). New microRNAs from mouse and human. *RNA* 9, 175–179.
- Lai EC, Tomancak P, Williams RW, Rubin GM. (2003). Computational identification of *Drosophila* microRNA genes. *Genome Biol* 4:R42, 1–20.
- Lakshmipathy U, Davila J, Hart RP. (2010). MiRNA in pluripotent stem cells. *Regenerative Medicine* 4, 545–555.
- Laurent LC. (2008). MicroRNAs in embryonic stem cells and early embryonic development. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 2181–2188.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854.
- Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 21, 4663–4670.

- Lee YS and Dutta A. (2007). The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev.* 21, 1025–1030.
- Li Z, Yang CS, Nakashima K Rana TM. (2011) Small RNA mediated regulation of iPS cell generation. *EMBO J* 30, 823-834.
- Lim LP, Glasner ME, Yekta S, Burge CB, Bartel DP. (2003a). Vertebrate microRNA genes *Science* 299, 1540.
- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS and Johnson JM. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433, 769-773.
- Lim LP, Lau NC, Weinstein EG, Abdelhakim A, Yekta S, Rhoades MW, Burge CB, Bartel DP. (2003b). The microRNAs of *Caenorhabditis elegans* *Genes Dev.* 17, 991–1008.
- Lin GP, Jiang T, Hu XB, Qiao XH Tuo QH. (2007). Effect of *Siraitia grosvenorii* polysaccharide on glucose and lipid of diabetic rabbits induced by feeding high fat/high sucrose chow. *Exp Diabetes Res* 67435.
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435, 834–838.
- Lui WO, Pourmand N, Patterson BK, Fire A. (2007). Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer. *Cancer Res.* 67 (13), 6031–43. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0561. PMID 17616659.
- Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, Stadtfeld M, Yachechko R, Tchieu J, Jaenisch R, Plath K, Hochedlinger K. (2007). Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell stem cell* 1(1), 55–70.
- Martin GR. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 7634-7638.
- Maxam AM and Gilbert W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Biotechnology* 24, 99-103.
- Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. (2007). MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 133 (2), 647–58. doi:10.1053/j.gastro.2007.05.022. PMID 17681183.
- Mineno J, Okamoto S, Ando T, Sato M, Chono H, Izu H, Takayama M, Asada K, Mirochnitchenko O, Inouye M Kaoto I. (2006). The expression profile of microRNAs in mouse embryos. *Nucleic Acids Res* 34, 1765-1771.

- Miyoshi N, Ishii H, Nagano H, Haraguchi N, Dewi DL, Kano Y, Nishikawa S, Tanemura M, Mimori K, Tanaka F, Saito T, Nishimura J, Takemasa I, Mizushima T, Ikeda M, Yamamoto H, Sekimoto M, Doki Y, Mori M. (2011). Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell* 8, 633-638.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51, 263–73.
- Murchison EP, Partridge JF, Tam OH, Cheloufi S, Hannon GJ. (2005). Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 12135–12140.
- Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without myc from mouse and human fibroblasts. *Nature biotechnology* 26(1), 101–106.
- Narayanaswamy M, Wright KC, Kandarpa K. (2000). Animal models for atherosclerosis, restenosis, and endovascular graft research. *J Vasc Interv Radiol* 11, 5-17.
- Palatnik JF, Allen E, Wu X, Schommer C, Schwab R, Carrington JC, Weigel D. (2003). Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* 425, 257–263.
- Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ. (2008). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451(7175), 141–146.
- Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. (2000). Conservation across animal phylogeny of the sequence and temporal regulation of the 21 nucleotide let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408, 86–89.
- Peterson K, Dietrich M, McPeck M. (2009). MicroRNAs and metazoan macroevolution: insights into canalization, complexity, and the Cambrian explosion. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 31 (7), 736–747.
- Ramin N, Thieme R, Fischer S, Schindler M, Schmidt T, Fischer B, Navarrete Santos A. (2010). Maternal diabetes impairs gastrulation and insulin and IGF-I receptor expression in rabbit blastocysts. *Endocrinology* 151, 4158-4167.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403 (6772), 901–906. Bibcode 2000Natur.403.901R. doi:10.1038/35002607. PMID 10706289.

- Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes Dev* 16, 1616-1626.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74 (12), 5463–5467.
- Shendure J, Porreca GJ, Reppas NB, Lin X, McCutcheon JP, Rosenbaum AM, Wang MD, Zhang K, Mitra RD, Church GM. Accurate Multiplex Polony Sequencing of an Evolved Bacterial Genome. *Science* 309, 1728-1732. doi:10.1126/science.1117389 PubMed: 16081699
- Slack FJ, Basson M, Liu Z, Ambros V, Horvitz HR, Ruvkun G. (2000). The lin-41 RBCC gene acts in the C. Elegans heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Molecular Cell* 5 (4), 659–669. doi:10.1016/S1097-2765(00)80245-2. PMID 10882102.
- Subramanyam D, Lamouille S, Judson RL, Liu JY, Bucay N, Derynck R and Blelloch R. (2011). Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 29, 443-448.
- Suh MR, Lee Y, Kim JY, Kim SK, Moon SH, Lee JY, Cha KY, Chung HM, Yoon HS, Moon SY, Kim VN, Kim KS. (2004). Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev. Biol.* 270, 488 – 498.
- Takahashi K and Yamanaka S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S. (2007a). Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nature protocols.* 2(12), 3081–3089.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. (2007b). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131(5), 861–872.
- Tetzlaff MT, Liu A, Xu X, et al. (2007). Differential expression of miRNAs in papillary thyroid carcinoma compared to multinodular goiter using formalin fixed paraffin embedded tissues. *Endocr. Pathol.* 18 (3), 163–73. doi:10.1007/s12022-007-0023-7. PMID 18058265.
- The ENCODE Project Consortium. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489, 57–74.
- Thieme R, Ramin N, Fischer S, Puschel B, Fischer B Navarrete Santos A. (2012). Gastrulation in rabbit blastocysts depends on insulin and insulin-like-growth-factor 1. *Mol Cell Endocrinol* 348, 112-119.

- Tomari Y, and Zamore PD. (2005). MicroRNA biogenesis: drosha can't cut it without a partner. *Curr. Biol.* 15, R61–R64.
- Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (7), 2257–61. doi:10.1073/pnas.0510565103. PMC 1413718. PMID 16461460.
- Võsa U, Vooder T, Kolde R, Fischer K, Välk K, Tõnisson N, Roosipuu R, Vilo J, Metspalu A, Annilo T. (2011). Identification of miR-374a as a prognostic marker for survival in patients with early-stage nonsmall cell lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 50 (1), 812–22. doi:10.1002/gcc.20902. PMID 21748820.
- Wang Y, Medvid R, Melton C, Jaenisch R, Blelloch R. (2007). DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat. Genet.* 39, 380–385.
- Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, Bernstein BE, Jaenisch R. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent es-cell-like state. *Nature* 448(7151), 318–324.
- Wightman B, Burglin TR, Gatto J, Arasu P, Ruvkun G. (1991). Negative regulatory sequences in the lin-14 3-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development. *Genes Dev.* 5, 1813–1824.
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates tempo-ral pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855–862.
- Winiarska K, Malinska D, Szymanski K, Dudziak M, Bryla J. (2008). Lipoic acid ameliorates oxidative stress and renal injury in alloxan diabetic rabbits. *Biochimie* 90, 450-459.
- Woodruff-Pak DS. (2008). Animal models of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *J Alzheimers Dis* 15, 507-521.
- Xu P, Vernooy SY, Guo M, Hay BA. (2003). The *Drosophila* microRNA mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr. Biol.* 13, 790–795.
- Yamanaka S. - Nobel Lecture. (2012). Nobelprize.org.
- Yu Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318(5858), 1917-20.
- Zahn G, Volk K, Lewis GP, Vossmeier D, Stragies R, Heier JS, Daniel PE, Jr., Adamis AP, Chapin EA, Fisher SK, Holz FG, Löffler KU and Knolle J. (2010). Assessment of the

integrin $\alpha 5 \beta 1$ antagonist JSM6427 in proliferative vitreoretinopathy using in vitro assays and a rabbit model of retinal detachment. Invest Ophthalmol Vis Sci 51, 1028-1035.

Zakhartchenko V, Flisikowska T, Li S, Richter T, Wieland H, Durkovic M, Rottmann O, Kessler B, Gungor T, Brem G, Kind A, Wolf E, Schnieke A. (2011). Cell-mediated transgenesis in rabbits: chimeric and nuclear transfer animals. Biol Reprod 84, 229-237.

10. Köszönetnyilvánítás

Első sorban köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Gócza Elennek, a laboratóriumi munka elsajátításában, és az elméleti háttér megalapozásában nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért, és végtelen türelméért.

Köszönöm továbbá Bontovics Babettnek és Pouneh Maraghechinek, akik a módszerek elsajátításában voltak a segítségemre.

12. Mellékletek

I. táblázat A keresett miRNS-ekre kapott találatszámok az egyes mintákban.

Név	miRNS Szekvencia	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	Fajok
		MEF	EF	ES	PGC	6d	7d	14d	
miR-302b-5p	ACUUAACAUGGAGGUGCUUUC	0	0	0	0	0	0	0	-
miR-302b-3p	UAAGUGCUUCCAUGUUUUAGUCG	0	0	3	0	4	25	4	hsa, mmu
miR-302c-5p	UUUAACAUGGGGGUACCUGCUG	0	0	0	0	0	0	0	-
miR-302c-3p	UAAGUGCUUCCAUGUUUCAGUGG	0	0	0	0	0	0	0	-
miR-302a-5p	ACUUAACGUGGAUGUACUUGCU	0	0	0	0	0	3	0	hsa
miR-302a-3p	UAAGUGCUUCCAUGUUUUGGUGA	0	0	8	0	0	19	2	hsa, mmu
miR-302d-5p	ACUUAACAUGGAGGCACUUGC	0	0	0	0	0	0	0	-
miR-302d-3p	UAAGUGCUUCCAUGUUUGAGUGU	0	0	3	0	0	32	5	hsa, mmu
miR-367-5p	ACUGUUGCUGAAUAUGCAACUCU	0	0	0	0	0	0	0	-
miR-367-3p	AAUUGCACUUUAGCAAUGGUGA	0	0	0	0	0	0	0	-
miR-290-5p	ACUCAAACCGUGGGGGCACUUU	1	1	2	9	160	4841	9	mmu
miR-291a-5p	CAUCAAAGUGGAGGCCUCUCU	0	0	0	0	0	0	0	-
miR-291a-3p	AAAGUGCUUCCACUUUGUGUGC	0	0	0	0	0	0	0	-
miR-292-5p	ACUCAAACUGGGGGCUCUUUUG	0	0	0	0	0	0	0	-
miR-292-3p	AGUGCCGCCAGGGUUUGAGUGU	0	0	0	0	46	309	0	mmu
miR-293-5p	ACUCAAACUGUGUGACAUUUUG	0	0	0	0	0	0	0	-
miR-294-3p	AAAGUGCUUCCCUUUUGUGUGU	0	0	0	1	19	405	1	mmu
miR-295-3p	AAAGUGCUACUACUUUUGAGUCU	0	0	0	0	0	0	0	-
miR-17-3p	ACUGCAGUGAAGGCACUUGUAG	0	0	0	3	0	0	98	hsa, mmu
miR-17-5p	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	49	184	10	78	5	65	7583	hsa, mmu
miR-18a-3p	ACUGCCCUAAGUGCUCUUCUGG	0	4	0	1	0	0	38	hsa
miR-18a-5p	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAG	14	58	0	31	2	5	1049	hsa, mmu
miR-19a-3p	UGUGCAAAUCUAUGCAAAACUGA	0	6	0	17	2	0	56	hsa, mmu
miR-19a-5p	AGUUUUGCAUAGUUGCACUACA	0	0	0	0	0	0	0	-

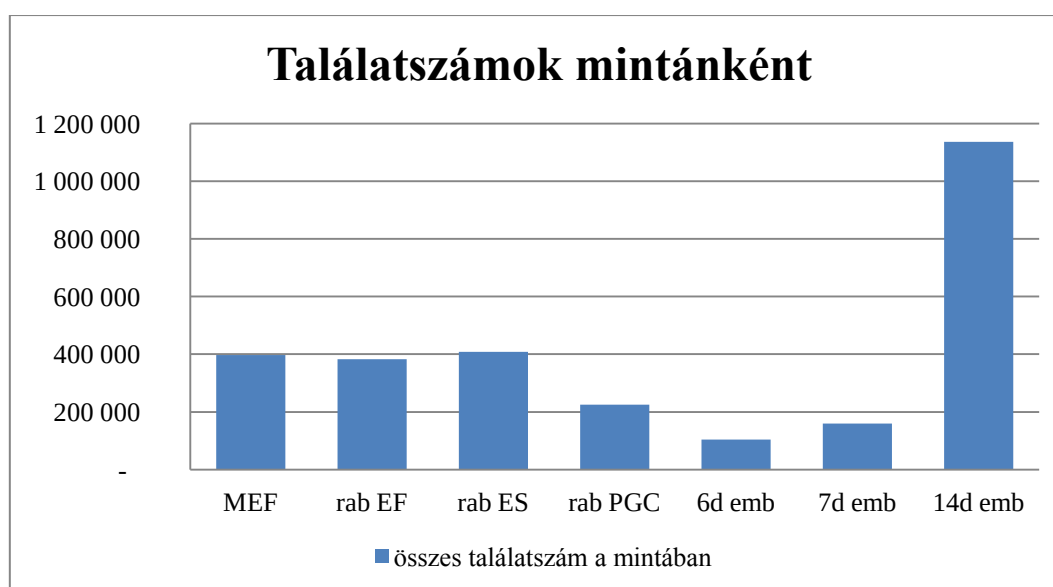
Név	miRNS Szekvencia	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	Fajok
		MEF	EF	ES	PGC	6d	7d	14d	
miR-19b-1-5p	AGUUUUGCAGGUUUGCAUCCAGC	0	1	0	0	0	1	31	hsa, mmu
miR-19b-3p	UGUGCAAAUCCAUGCAAAACUGA	19	45	5	38	8	17	1583	hsa, mmu
miR-20a-3p	ACUGCAUUAUGAGCACUUAAG	0	0	0	0	0	0	0	-
miR-20a-5p	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG	2	47	0	53	4	10	1738	hsa, mmu
miR-92a-3p	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU	126	465	95	1441	53	415	6919	hsa
miR-92a-1-5p	AGGUUGGGAUUUGUCGCAAUGCU	0	0	0	0	0	0	0	-
miR-512-I-5p	ACUCAGCCUUGGGGGCACUUCC	1	0	0	0	19	587	3	ocu
miR-512-II-5p	ACUCAGCCCUGGGGGCACUUCC	0	0	0	0	32	1104	0	ocu
miR-512-3p	AAGUGCCGUCAAGGUUGAGCUU	0	0	0	0	7	145	0	ocu
miR-498	UUUCAAGCUGGGGGGUGUUUUU	0	1	0	2	30	28	0	ocu
miR-520e	AAAGUGCUUCCUUUUUGAGUGU	0	0	0	0	0	37	0	ocu
let-7a-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	76	72	19	1	2	4	234	hsa, mmu
let-7b-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU	472	124	73	8	1	29	345	hsa, mmu
let-7c-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	116	12	17	3	0	2	123	hsa, mmu
let-7e-5p	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU	12	29	4	3	0	0	197	hsa, mmu
miR-1	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU	0	0	0	0	0	0	58	hsa, mmu
miR-103a-3p	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	747	786	71	114	12	107	18267	hsa, mmu
miR-125b-5p	UCCCUGAGACCCUAAUUGUGA	3582	1820	696	89	9	18	13055	hsa, mmu
miR-134-5p	UGUGACUGGUUGACCAGAGGGG	20	0	2	0	0	0	0	hsa, mmu
miR-142-3p	UGUAGUGUUCCUACUUUAUGGA	0	0	0	0	0	0	0	-
miR-143-3p	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC	308	95	112	5	1	8	544	hsa, mmu
miR-145-5p	GUCCAGUUUCCCAGGAAUCCCU	9907	2753	1466	215	29	182	5809	hsa, mmu
miR-191-3p	GCUGCACUUGGAUUUCGUUCCC	1	0	0	0	0	0	0	mmu
miR-191-5p	CAACGGAAUCCCAAAGCAGCU	794	737	171	136	12	252	5342	ocu
miR-200c-3p	UAAUACUGCCGGGUAAUGAUGGA	0	0	0	0	0	0	49	hsa, mmu
miR-20a-5p	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG	2	63	0	53	4	10	1738	hsa, mmu

Név	miRNS Szekvencia	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	Fajok
		MEF	EF	ES	PGC	6d	7d	14d	
miR-2137	GCCGGCGGGAGCCCCAGGGAG	1	0	0	0	0	0	0	mmu
miR-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	913	1064	238	14	1	19	901	hsa, mmu
miR-320-3p	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGA	210	190	109	151	16	42	772	hsa, mmu
miR-34c-5p	AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUGC	40	3	0	0	0	0	17	hsa, mmu
miR-370-3p	GCCUGCUGGGGUGGAACCUGGU	41	24	0	3	0	2	94	hsa, mmu
miR-375-3p	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA	0	0	0	0	0	0	8	hsa, mmu
miR-379-5p	UGGUAGACUAUGGAACGUAGG	34	38	4	0	0	0	172	hsa, mmu
miR-380-5p	AUGGUUGACCAUAGAACAUGCG	0	0	1	0	0	0	0	hsa, mmu
miR-382-5p	GAAGUUGUUCGUGGUGGAUUCG	124	55	10	1	0	0	149	hsa, mmu
miR-410-3p	AAUAUAACACAGAUGGCCUGU	3	20	0	0	0	0	106	hsa, mmu
miR-423-3p	AGCUCGGUCUGAGGCCCCUCAGU	73	99	11	69	0	10	401	hsa, mmu
miR-467c-5p	UAAGUGCGUGCAUGUAUAUGUG	0	0	0	0	0	0	0	-
miR-542-3p	UGUGACAGAUUGAUAACUGAAA	3	7	0	3	0	0	46	hsa, mmu
miR-672-5p	UGAGGUUGGUGUACUGUGUGUGA	0	8	0	2	0	0	82	mmu
miR-690	AAAGGCUAGGCUCACAACCAAA	0	0	0	0	0	0	0	-
miR-708-5p	AAGGAGCUUACAAUCUAGCUGGG	10	8	3	12	0	0	526	hsa, mmu
miR-92b-3p	UAUUGCACUCGUCCCGGCCUCC	10	10	8	106	8	8	706	hsa, mmu
miR-93-5p	CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG	47	90	11	36	1	27	3636	hsa, mmu
miR-99a-5p	AACCCGUAGAUCCGAUCUUGUG	915	442	84	106	0	17	11640	hsa, mmu
miR-99b-5p	CACCCGUAGAACCGACCUUGCG	346	110	65	18	0	0	815	hsa, mmu

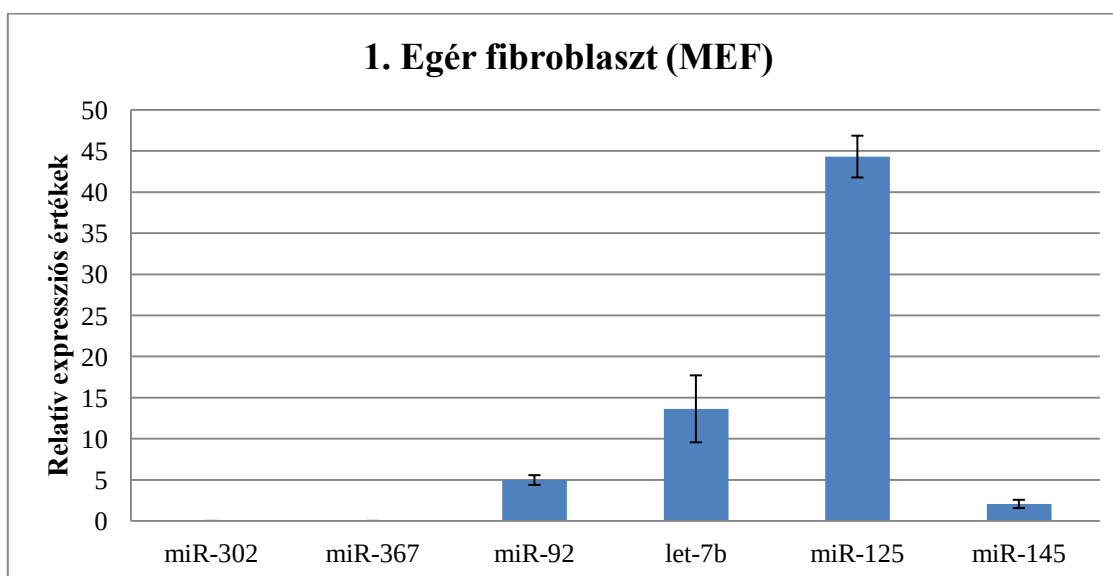
A táblázat az egyes mintákban a keresett mikroRNS szekvenciákra kapott read számokat mutatja, valamint azt, hogy melyik faj ismert szekvenciáját vettük alapul a kereséskor (hsa: *Homo sapiens*, mmu: *Mus musculus*, ocu: *Oryctolagus cuniculus*). Azokban az esetekben jelöltük meg a nyulat, mint a szekvencia forrását, amikor a talált mikroRNS bizonyos mértékben eltért mindkét referencia faj szekvenciájától, de valószínűsíthetően ugyan arról a mikroRNS-ről van szó. Ezekben az esetekben a Solid szekvenálással kapott nyúl szekvenciát adtuk meg.

miRNS neve	MEF	rabEF	13.5 d
miR-302a-3p	0,0000	0,0000	0,0004
miR-367-3p	0,0000	0,0000	0,0000
miR-92a-3p	0,1587	0,6309	1,2952
let-7b-5p	0,5945	0,1682	0,0646
miR-125b-5p	4,5113	2,4695	2,4438
miR-145-5p	12,4773	3,7354	1,0874

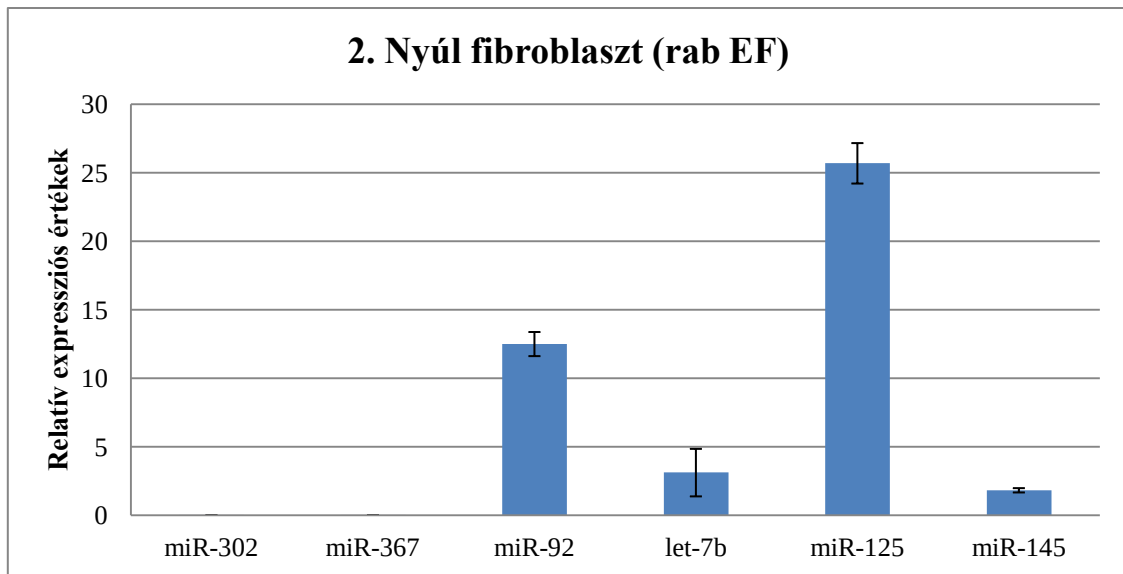
II. táblázat A Solid szekvenálás során a kiválasztott miRNS-ekre kapott találatszámok a teljes találatszámokra, és a miR-191-re normalizálva.



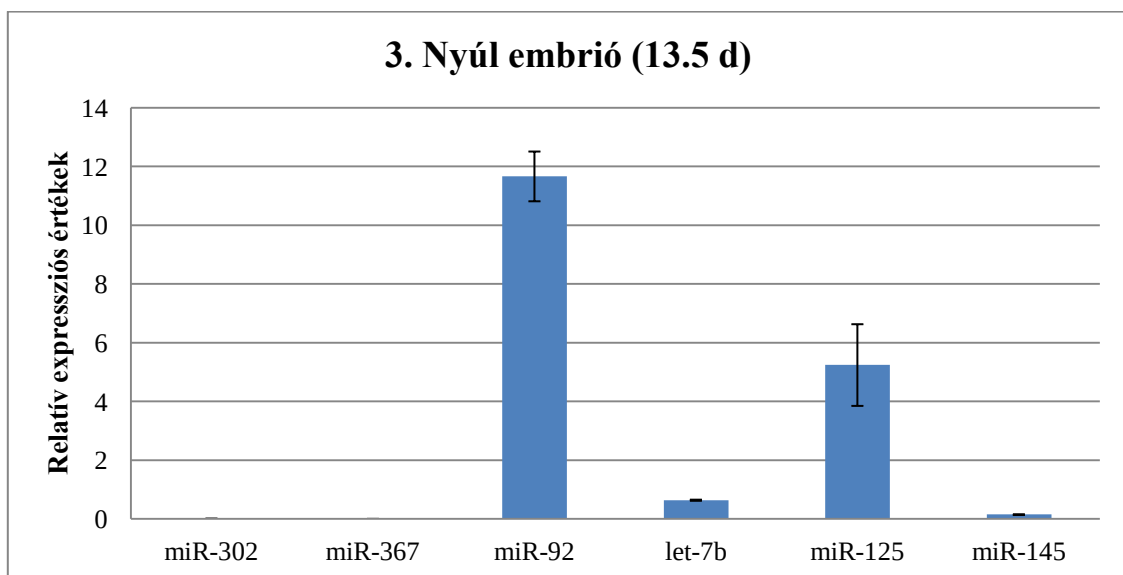
I. ábra A Solid szekvenálás során kapott összes találatszám az egyes mintákban.



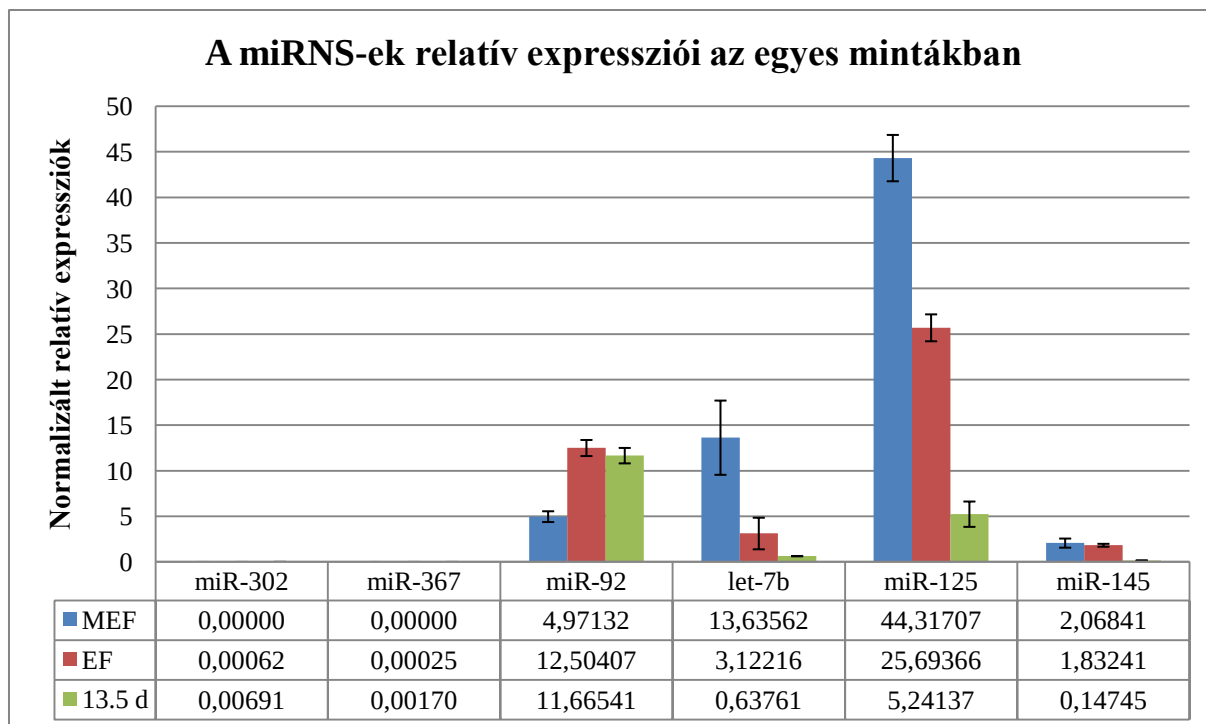
II. ábra A miRNS-ek real-time PCR analízis során kapott C_T értékeiből számított relatív expressziók, a miR-191-re normalizálva, a standard hiba feltüntetésével az egér fibroblaszt mintában.



III. ábra A miRNS-ek real-time PCR analízis során kapott C_T értékeiből számított relatív expressziók, a miR-191-re normalizálva, a standard hiba feltüntetésével a nyúl fibroblaszt mintában.



IV. ábra A miRNS-ek real-time PCR analízis során kapott C_T értékeiből számított relatív expressziók, a miR-191-re normalizálva, a standard hiba feltüntetésével a nyúl embrió mintában.



V. ábra A miRNS-ek real-time PCR analízis során kapott C_T értékeiből számított relatív expressziók, a miR-191-re normalizálva, normál skálán, a standard hiba feltüntetésével. Megjegyzendő, hogy a skála miatt a nagyon kicsi értékek nem látszanak rendesen.