



Pázmány Péter Katolikus Egyetem

Információs Technológiai és Bionikai Kar

Orvosi Biotechnológia MSc

**Anyai plazma mikroRNS-ek felhasználásának vizsgálata a
veleszületett szívfejlődési rendellenességek kimutatásában**

Biró Orsolya Brigitta, 2014.

Témavezető: Dr. Nagy Bálint

Belső konzulens: Dr. Gáspári Zoltán



Nyilatkozat

Alulírott Biró Orsolya Brigitta, a Pázmány Péter Katolikus Egyetem Információs Technológiai és Bionikai Karának hallgatója kijelentem, hogy ezt a diplomatervet meg nem engedett segítség nélkül, saját magam készítettem, és a diplomatervben csak a megadott forrásokat használtam fel. Minden olyan részt, melyet szó szerint, vagy azonos értelemben, de átfogalmazva más forrásból átvettem, egyértelműen a forrás megadásával megjelöltem. Ezt a diplomatervet más szakon még nem nyújtottam be.

2014.12.16., Budapest

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	7
1 TARTALMI ÖSSZEFOGLALÓ	9
2 BEVEZETÉS	11
3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS	12
3.1 Veszélyeztetett szívfejlődési rendellenességek	12
3.2 Prenatális diagnosztika	15
3.2.1 Prenatális diagnosztikai módszerek	15
3.2.2 A veszélyeztetett szívfejlődési rendellenességek szűrése	16
3.3 mikroRNS-ek	16
3.3.1 A mikroRNS-ek általános jellemzői	16
3.3.2 A mikroRNS-ek biogenezise és hatásmechanizmusa	17
3.3.3 A mikroRNS-ek nevezéktana	18
3.3.4 A mikroRNS-ek szerepe a szívfejlődésben	18
3.3.5 A keringésben fellelhető mikroRNS-ek	19
3.3.6 A mikroRNS-ek általános vizsgálómódszere: Real-time PCR	20
4 CÉLKITŰZÉSEK	23
5 BETEGEK ÉS MÓDSZEREK	24
5.1 Betegek	24
5.1.1 Anyai plazma vizsgálatok	24
5.1.2 Magzati szívszövet vizsgálatok	25
5.2 Módszerek	26
5.2.1 Mintagyűjtés	26
5.2.1.1 Vérvétel és plazmaelválasztás	26
5.2.1.2 Magzati szívszövet gyűjtés	26
5.2.2 miRNS extrakció	26
5.2.2.1 miRNS extrakció anyai plazmából	26
5.2.2.2 miRNS izolálás magzati szívszövetből	28
5.2.3 Össz-miRNS koncentráció meghatározás	30
5.2.4 A <i>let-7c</i> miRNS expressziós vizsgálata	31
5.2.4.1 <i>let-7c</i> expressziós vizsgálat anyai plazma mintákban	31
5.2.4.2 <i>let-7c</i> expressziós vizsgálat magzati szívszövet mintákban	33
5.2.5 miRNS PCR Array vizsgálat	35
5.2.6 Bioinformatikai analízis	41
5.2.7 Statisztika	41
6 EREDMÉNYEK	42
6.1 Össz-miRNS koncentrációk	42
6.2 A <i>let-7c</i> miRNS expressziós vizsgálatának eredményei	42
6.2.1 A <i>let-7c</i> expressziója anyai plazma mintákban	42
6.2.2 A <i>let-7c</i> expressziója magzati szívszövet mintákban	44
6.3 A miRNS PCR Array vizsgálat eredményei	44
6.4 A bioinformatikai analízis eredményei	48
7 ÉRTÉKELÉS	50
8 ÖSSZEFOGLALÁS	53
9 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	54
10 IRODALOMJEGYZÉK	55
11 MELLÉKLETEK	57

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ASD: Atrial Septum Defect, Pitvari sövénydefektus
AVSD: Atrioventricular Septum Defect, Pitvar-kamrai sövénydefektus
AMI: Akut Myocardialis Infarctus
beta-hCG: beta human chorionic gonadotropin
BMI: Body Mass Index, test-tömeg index
cDNA: complementary DNA, komplementer DNS
cff-DNA: cell free fetal DNA, szabad magzati DNS
CoA: Coarctatio aortae
CH: Cardialis hypertrophia
CM: Cardiomyopathia
CVS: Chorionic Villus Sample, chorionboholy-mintavétel
DCM: Dilatált cardiomyopathia
DORV: Double Outlet Right Ventricle, Kettős kiáramlású jobb kamra
EDTA: Ethylenediamine Tetraacetic Acid, etilén-diamin-tetraecetsav
FC: Fold Change, expressziós szint változás
GO: Gene Ontology
hiPSC: human induced Pluripotent Stem Cells, humán eredetű indukált pluripotens őssejtek
HLHS: Hypoplastic Left Heart Syndrome, Hypoplasticus balszívfél szindróma
HRHS: Hypoplastic Right Heart Syndrome, Hypoplasticus jobbszívfél szindróma
MI: Myocardialis Infarctus
miRISC: miRNA-induced silencing complex
mRNS: messenger RNS
miRNS: mikroRNS
miRTC: miRNA Reverse Transcription Control
NGS: Next Generation Sequencing, újgenerációs szekvenálás
PA: Pulmonaris Atresia
PAPP-A: Pregnancy Associated Plasma Protein A
PCR: Polymerase Chain Reaction, polimeráz láncreakció
PDA: Patent Ductus Arteriosus, Ductus Botalli persistens
PPC: Positive PCR Control
pre-miRNS: prekursor miRNS
pri-miRNS: elsődleges (primary) miRNS átirat forma
PS: Pulmonaris Stenosis
RISC: RNA-induced silencing complex, RNS-indukált csendesítő komplex

RT-PCR: Real-Time Polymerase Chain Reaction, valós idejű polimeráz láncreakció
SOLiD: Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection
TGA: Transposition Of Great Arteries, Nagy erek transzpozíciója
TOF: Tetralogy Of Fallot, Fallot tetralógia
TRBP: Tar RNA Binding Protein
UVH: Univentricular Heart, Egykamrás szív
VSD: Ventricular Septum Defect, Kamrai sövénydefektus
VSzR: Veleszületett Szívfejlődési Rendellenesség
3' UTR: 3' Untranslated Region, 3' nem transzlálódó régió

1 TARTALMI ÖSSZEFOGLALÓ

Háttér:

A veleszületett szívfejlődési rendellenességek a leggyakoribb születési defektusokhoz tartoznak. Súlyosságuktól és korrigálhatóságuktól nagyban függ a gyermek várható élettartama, ezért fontos a terhesség alatti felismerés. Egyre nagyobb az igény olyan biomarkerekre, amelyek segítségével megbízhatóan kimutatható a betegség. Ígéretes megoldást kínálnak az anyai keringésben fellelhető magzati eredetű miRNS-ek, melyek több, a szívfejlődés folyamatában résztvevő gén expresszióját is szabályozzák.

Célkitűzések:

A kutatás során célkitűzésünk volt a miRNS-ek szerepének tanulmányozása a szívfejlődési rendellenességekben; a *let-7c* miRNS expressziós vizsgálata anyai plazma mintákban és kóros magzati szívszövetben; további potenciális miRNS biomarkerek keresése a veleszületett szívfejlődési rendellenesség non-invazív prenatalis kimutatására.

Betegek és módszerek:

Az anyai plazma vizsgálatok elvégzéséhez 38 egészséges, valamint 41 olyan várandóستól gyűjtöttünk perifériás vérmintát, akiknek a magzata szívfejlődési rendellenességet mutatott. A kóros terhességek között intrauterin karyotipizálással 12 db aneuploidát igazoltunk. A vérmintákból elválasztottuk a plazmát, majd abból miRNS-t izoláltunk (*Machery-Nagel GmbH*). Spektrofotométer segítségével meghatároztuk az össz-miRNS koncentrációt (*Thermo Fischer Scientific Inc.*). A *let-7c* miRNS expressziós vizsgálatához 28 (14 beteg és 14 kontroll) várandós mintáját választottuk ki. A miRNS mintákból cDNS-t szintetizáltunk, majd kvantitatív RT-PCR módszer segítségével meghatároztuk a *let-7c* miRNS koncentrációját (*Qiagen GmbH*, *Exiqon A/S*). A mérések során az *u6* snRNS-t alkalmaztuk kontrollként.

A második vizsgálathoz a beteg csoportból 22, a kontroll csoportból 12 anyai plazma mintát használtunk fel. A különböző szív- és kromoszóma-rendellenességeknek megfelelően 5 beteg és 2 korosztály szerint megkülönböztetett normál miRNS pool-t készítettünk. Az így kapott mintákon miRNS PCR Array analízist végeztünk, a szív-és érrendszeri betegségekre specifikus panel felhasználásával (*Qiagen GmbH*). Bioinformatikai adatbázisok és miRNS-target predikciós programok segítségével kielemeztük a kapott eredményeket.

A magzati szívszövet vizsgálatok elvégzéséhez fetopathológiai feldolgozások során 7 db kóros és 2 db egészséges szívszövet-mintát gyűjtöttünk. A mintákból miRNS izolálást végeztük (*Machery-Nagel GmbH*), majd az anyai plazma vizsgálatokhoz hasonló módon meghatároztuk a *let-7c* miRNS koncentrációját (*Roche Ltd*, *Exiqon A/S*).

1 ABSTRACT

Background:

Congenital heart defects (CHD) are the most common fetal malformations. In certain cases of fetal cardiac and other structural anomalies, early prenatal diagnosis may be helpful or even life saving. Biomarkers research could be one of the keys in early prenatal diagnosis. The miRNAs are short, non-coding RNA molecules that play important role in regulation of eukaryotic gene expression. MiRNAs which contribute to heart development and can be found in maternal circulation are promising new biomarkers for congenital heart disease.

Purpose:

In this study, our aim was to investigate the role of miRNAs in congenital heart disease; analyze the *let-7c* miRNA expression in maternal plasma and diseased fetal heart samples; find new biomarkers for congenital heart defects in non-invasive prenatal diagnostics.

Patients and methods:

Peripheral blood samples were collected from 79 pregnant women; in 38 cases the fetus had CHD, in 41 control cases CHD was not diagnosed. We diagnosed 12 aneuploidies among the affected cases by cytogenetic analysis. Total-miRNA was extracted from the plasma samples (*Machery-Nagel GmbH*), the quantity of the total free nucleic acid was measured using UV-VIS spectrometry (*Thermo Fischer Scientific Inc.*). We performed the *let-7c* expression analysis on 14 diseased and 14 control cases. Total-miRNA samples were reverse-transcribed, than RT-PCR was performed on the cDNA templates (*Qiagen GmbH*, *Exiqon A/S*). U6 snRNA was used as control.

MiRNA PCR Array analysis was carried out on 22 affected and 12 normal samples, by using cardiovascular disease specific panel (*Qiagen GmbH*). The miRNA samples were pooled considering heart- and chromosomal abnormalities. Bioinformatic analysis was performed on the miRNAs, which showed significant difference between the control and the CHD samples and had aberrant expression in cardiovascular diseases. We investigated the possible role of the miRNAs in congenital heart disease.

We have collected 7 diseased and 2 healthy fetal heart samples for *let-7c* expression analysis to confirm the miRNA's importance in pathogenesis of CHD. Total-miRNA was isolated from the left ventricles (*Machery-Nagel GmbH*), than we performed cDNA synthesis and RT-PCR the same way in case of the plasma samples (*Roche Ltd.*, *Exiqon A/S*).

2 BEVEZETÉS

2013 januárja óta végzek tudományos diákkörös munkásságot a Semmelweis Egyetem I.sz. Szülészeti- és Nőgyógyászati Klinika Genetikai Laboratóriumában. Kutatási témám a mikroRNS-ek vizsgálata szívfejlődési rendellenességet mutató magzatok anyai plazma mintáiból. A diplomatervben tárgyalt vizsgálatok egy részét a Seconda Università di Napoli (SUN) Facoltà de Medicine e Chirurgia, Nápoly orvosi egyetemével közreműködve végeztük el. Az olasz kutatócsoport a miRNS-ek szívfejlődésben játszott szerepét részletesen tanulmányozta, amellyel kapcsolatban 2014 elején cikkük is megjelent „Cardiomyogenesis is controlled by the *mir-99a/let-7c* cluster and epigenetic modifications” címmel a Stem Cell Research folyóiratban.

A veleszületett szívfejlődési rendellenességek a leggyakoribb születési defektusokhoz tartoznak és vezető okai a gyermekkori elhalálozásnak. A betegséggel sújtott újszülöttek több mint felének kritikus az állapota és legtöbbször sebészeti beavatkozásra van szükségük. A rendellenesség súlyosságától és sebészeti korrigálhatóságától nagymértékben függ a gyermek várható élettartama, ezért fontos a terhesség alatti felismerés. Az idejében detektált szívfejlődési rendellenesség lehetővé teszi az esetleges életmentő kezelések elvégzését, illetve megalapozza a társuló kórképekre való szűrést is.

A betegség prenatális diagnosztikája magzati echokardiográfia alapján történik. A vizsgálat nem tartozik a rutin szűrőmódszerek közé, továbbá megbízhatósága függ az anyai súlytól, az ultrahang berendezés minőségétől és a vizsgáló szakképzettségétől is. Ebből kifolyólag nagy az igény az olyan biomarkerekre, amelyeket a magzati szívultrahanggal kombinálva növelhető a vizsgálat diagnosztikus értéke.

Ígéretes megoldást kínálnak az anyai keringésben fellelhető magzati eredetű szabad nukleinsavak, melyek fő forrása a méhlepény trophoblastsejtjeinek apoptózisa. Ezek a sejtek a terhesség alatt folyamatos kapcsolatban állnak az anyai keringéssel, és genetikai állományuk megegyezik a magzatéval. A szabad nukleinsavak egyszerű vérvétellel hozzáférhetőek, tehát vizsgálatuk nem jelent a magzatra nézve veszélyt.

A mikroRNS-ek olyan rövid, fehérjét nem kódoló RNS molekulák, melyek fontos szerepet töltenek be az eukarióta gének poszttranszkripció szabályozásában. Azok a miRNS-ek, amelyek a terhesség ideje alatt expresszálódnak a placentában, nagy valószínűséggel kimutathatóak az anyai keringésben. Számos olyan található közöttük, amely a részt vesz a szívfejlődés folyamatának szabályozásában, ezáltal összefüggésbe hozható a szívfejlődési rendellenességekkel. Az ilyen tulajdonságokkal rendelkező, magzati eredetű miRNS-ek vizsgálata új lehetőségeket nyit a non-invazív molekuláris magzati diagnosztikában.

3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 Veleszületett szívfejlődési rendellenességek

A veleszületett szívfejlődési rendellenességek (VSzR) olyan anatómiai vagy funkcionális eltérések, melyek az embrionális fejlődés során alakulnak ki. A leggyakoribb születési defektusokhoz tartoznak, az élve születések körülbelül 1%-ában fordulnak elő és a perinatális elhalálozások 40%-át adják. A betegséggel sújtott újszülöttek több mint felének kritikus az állapota és legtöbbször sebészeti beavatkozásra van szükségük [1].

A VSzR kialakulásának pontos mechanizmusa nem ismert, külső tényezők és genetikai okok egyaránt hozzájárulhatnak. A kromoszóma rendellenességek, mint például a Down- és Edwards-szindróma, gyakran társulnak a szív hibás fejlődésével [2]. Génmutáció az esetek 3%-ában fordul elő, szintén többnyire valamely szindróma részeként (úgynevezett „syndromic heart disease”) (1. Táblázat). Előfordulnak domináns, recesszív és nemhez kötött öröklődésmenetet mutató formák is. A kórképek egy kisebb hányada önállóan fordul elő, ezek gyakran monogénes öröklődést mutatnak (úgynevezett „non-syndromic heart disease”) [3].

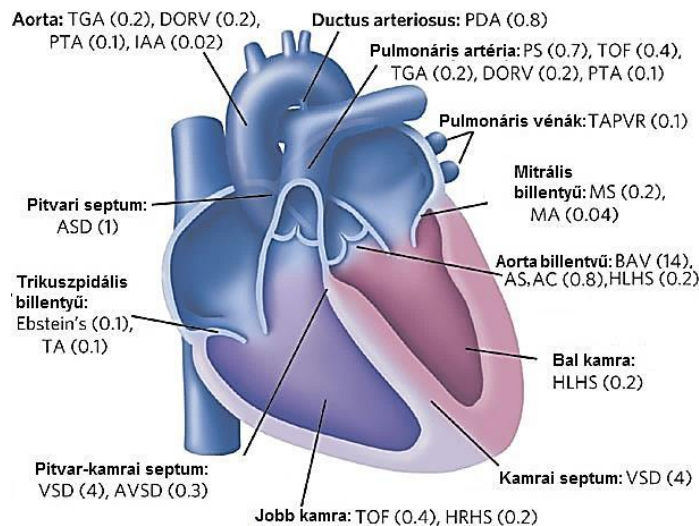
VSzR-rel társult szindróma	Genetikai ok
Számbeli kromoszóma eltérések	
Down-szindróma	ismeretlen
Edwards-szindróma	ismeretlen
Turner-szindróma	ismeretlen
Kromoszóma mikrodélációk	
Di George szindróma	22q11.2 mikrodéláció → TBX1 gén hiányzik
Williams-Beuren szindróma	ELN gén mikrodélációja
Génmutációk	
Holt-Oram szindróma	TBX5
Alagille szindróma	JAG1, NOTCH1, NOTCH2
Nooan szindróma	PTPN11, RAF1, KRAS, HRAS, BRAF, SOS1, MEK1, MEK2
CHARGE szindróma	CHD7, SEMA3E
Costello szindróma	HRAS
Marfan szindróma	Fibrillin-1
Char szindróma	TFAP2B
Ellis-can Creveld szindróma	EVC, EVC2

1. Táblázat. Szívfejlődési rendellenességgel társuló szindrómák és genetikai okaik

A külső behatásokra a magzati szív a fejlődés legintenzívebb szakaszában, a terhesség 4-6. hete között a legérzékenyebb. Ezek közé tartoznak a vírusfertőzések (például rubeola), a teratogén anyagok (például alkohol és citosztatikumok), az oxigénhiány (például anyai dohányzás) illetve az ionizáló sugárzás (például röntgen).

A fejlődési rendellenességek a szív különböző részeit érinthetik és a kis eltérésektől (minor anomáliák) a halálos kimenetelt okozó formákban is jelentkezhetnek (1. Ábra). A

defektusok mechanizmusukat tekintve három nagy kategóriára oszthatók fel: újszülöttkori cianózishoz vezető szívfejlődési rendellenességek, balszívfelet érintő szívhibák és a szívsövény (septum) képződés zavarai [4]. A cianózissal (kékes bőrszín, melyet a vér alacsony oxigénszintje okoz) járó kórképek közé tartozik többek között a Fallot-tetralógia, a pulmonaris atresia és a nagy erek transzpozíciója. A második csoportba sorolható a hypoplasias balszívfél szindróma, a mitrális és az aorta stenosis. A septum hiány kiterjedhet a pitvari, a kamrai, illetve a centrális szívsövényre is.



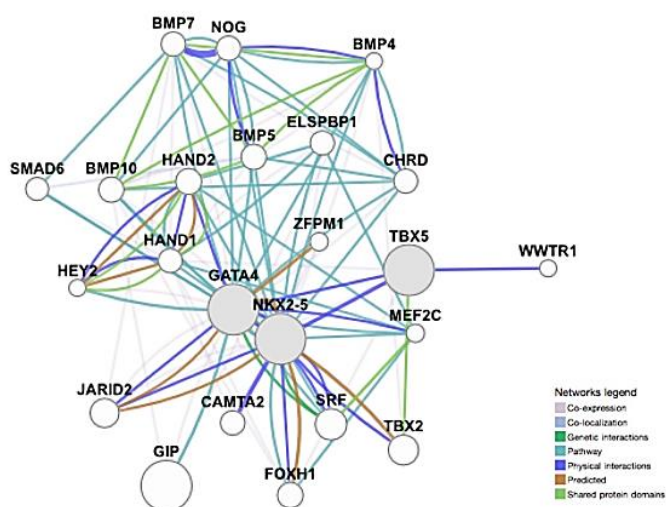
1. Ábra. Szívfejlődési rendellenesség felosztása és gyakoriságuk 1000 élveszületésben [4]

A gyakoribb szívfejlődési rendellenességek:

1. Kamrai septum defektus (VSD, Ventricular Septal Defect): A leggyakoribb szívfejlődési rendellenesség, a két kamra közötti sövényen lévő folyamatossági hiánnyal jellemezhető.
2. Pitvari septum defektus (ASD, Atrial Septal Defect): a pitvarok közötti sövény folyamatossági hiányával jellemezhető
3. Pitvar-kamrai septum defektus (AVSD, Atrio-Ventricular Septal Defect): Down szindrómásoknál leggyakrabban előforduló szívfejlődési rendellenesség
4. Pulmonaris Stenosis és Atresia (PS, PA): a tüdőverőér szűkülete, illetve teljes elzáródása
5. Ductus Botalli persistens (PDA, Patent Ductus Arteriosus): A ductus arteriosus (avagy Botallo vezeték) a születés után is nyitva marad
6. Coarctatio aortae (CoA, Coarctation of the Aorta): az aorta kezdeti szakaszának szűkülete
7. Hypoplasias balszívfél szindróma (HLHS, Hypoplastic Left Heart Syndrome): Rendkívül súlyos, összetett rendellenesség, mely a balszívfél különböző részeinek (aorta, aortabillentyű, mitralis billentyű, bal kamra, bal pitvar) esetenként eltérő mértékű fejlődési hibájával jellemezhető.

8. Fallot tetralógia (TOF, Tetralogy Of Fallot): Kombinált szívfejlődési rendellenesség, mely a kamrai sövényhiány, a megnagyobbodott jobbkamra, az úgynevezett lovaglő aorta valamint a nagyerek szűkületének együttes előfordulásával jár.

A magzati szív-és érrendszer fejlődése különböző transzkripciós faktorok irányítása alatt áll (2. Ábra), melyek a szignál transzdukciós jelátviteli rendszerek utasításait a génexpresszió szabályozásán keresztül valósítják meg [3]. Ha a hálózat valamely eleme károsodik, például mutáció által, szívfejlődési rendellenesség alakulhat ki (2. Táblázat).



2. Ábra. Szívfejlődésben szerepet játszó transzkripciós faktorok interakciós hálózata [3]

Betegség	Érintett gének
VSD	<i>NKX2-5, GATA4, CFC1, IRX4, ZIC3, TDGF1, CITED2, TBX20</i>
ASD	<i>NKX2-5, GATA4, GATA6, TBX20, CFC1, CITED2</i>
AVSD	<i>NODAL, GATA4, ACVR1, CRELD1, CFC1, LEFTY2</i>
PS	<i>ELN, JAG1</i>
TOF	<i>Nkx2-5, NODAL, CFC1, FOXH1, GATA4, FOG2, GDF1, HAND2, ALDH1A2, GATA6, TDGF1, JAG1</i>
HLHS	<i>NOTCH1, NKX2-5, GJA1, ZIC3</i>
CoA	<i>VEGF, NOTCH1, NKX2-5, LEFTY2</i>

2. Táblázat. Szívfejlődési rendellenességek és mutációk

A kongenitális szívhibák súlyosságától és sebészeti korrigálhatóságától nagymértékben függ a gyermek várható élettartama, ezért nagyon fontos a terhesség alatti felismerés. Az idejében detektált defektusok esetében megfelelő felkészüléssel javíthatók a csecsemőkorai ellátás körülményei és bizonyos esetekben adott a korai korrekciós műtétek lehetősége [5]. A szívsebészeti beavatkozásoknak köszönhetően elkerülhetőek az olyan, oxigenizációs zavar által kiváltott másodlagos következmények, mint például az idegrendszer károsodása. A műtétek sikeressége nagyban függ a megfelelő betegkiválasztástól és a sebész szakképzettségétől, ez magyarázza a gyakori komplikációkat és a nagy mortalitást [6].

3.1 Prenatális diagnosztika

3.1.1 Prenatális diagnosztikai módszerek

A prenatális diagnosztikai módszerek segítségével információt nyerhetünk az embrió, illetve a magzat egészségi állapotáról. Nemzetközi adatok szerint a csecsemőkori elhalálozások 30%-ában veleszületett rendellenességek játszanak szerepet [7]. A különböző módszerek segítségével felismerhetővé váltak olyan magzati rendellenességek, amelyek méhen belüli, esetleg korai újszülöttkori kezelést tesznek szükségessé. Gyógyíthatatlan esetekben, a hatályos törvényeknek megfelelően adott a terhesség megszakításának lehetősége is, melynek elvégzéséről a szülők saját meggyőződésük szerint dönthetnek.

A terhesség alatt végzett szűrő és diagnosztikai vizsgálatokat invazív és non-invazív csoportba sorolhatjuk. Az ultrahang-és szérummerker-tesztek segítségével kiszűrhetőek azok a veszélyeztetett várandósok, akiknél az invazív vizsgálatok elvégzése indokolt. A magzat genetikai vizsgálatához szükséges mintavételi módszerek (chorionboholy-, magzatvíz-, magzati szövet- és köldökzsinórvér-mintavétel) különböző mértékű vetéléskockázattal járnak. A magzatvíz mintavételt (amniocentézis) a 16-18. terhességi héten végzik, a beavatkozás szövődményeinek aránya 0,5% körüli [8]. Az így nyert mintát elsősorban citogenetikai vizsgálathoz alkalmazzák, melynek elvégzése átlagosan két hetet is igénybe vehet. A chorionboholy-mintavételt (CVS) a 10-12. héten hajtják végre, 1,5-2%-ban vezethet spontán vetéléshez [7,8]. Az invazív eljárásokkal nyert magzati mintákból különböző laboratóriumi módszerekkel direkt információt nyerhetünk a magzatról.

Egyre nagyobb az igény olyan diagnosztikai eljárások kifejlesztésére, melyek alkalmazása során az invazív vizsgálatok során felmerülő kockázat kiküszöbölhető. Ígéretes megoldást kínálnak az anyai keringésben fellelhető magzati eredetű szabad nukleinsavak, melyek terhesség alatt az összes szabad nukleinsav körülbelül 5%-át adják [9]. Fő forrásuk a méhlepény trophoblastsejtjeinek apoptózisa, melyek az anyai és magzati felszín közötti érintkezési határfelületet képezik. Ezek a sejtek a terhesség alatt folyamatos kapcsolatban állnak az anyai vérrel illetve szövetekkel, genetikai állományuk megegyezik a magzatéval [9]. A szabad nukleinsavak egyszerű vérvétellel hozzáférhetőek, vizsgálatuk nem jelent a magzatra nézve veszélyt, ezért non-invazívnak tekintjük. Az úgynevezett cff-DNS felhasználási lehetőségeit régóta vizsgálják, olyan esetekben alkalmazható prenatális diagnosztikai célra, amikor az anya és a magzat genetikai állományában kimutatható különbség van. Napjainkban már több alkalmazása is létezik: magzati nem (nemhez kötött betegségek szűrésére) és vércsoport meghatározás, apai allél által meghatározott örökletes betegségek és számbeli kromoszóma eltérések szűrése [10].

3.1.2 A veleszületett szívfejlődési rendellenességek szűrése

Az általános szülészeti ultrahang-szűrővizsgálat része a magzati szív négyüreges síkjának és kiáramlási pályáinak a vizsgálata. Ezzel a módszerrel a súlyos szívfejlődési rendellenességek megközelítően 40%-a detektálható [11]. A szülészeti ultrahangon kóros eltérést mutató, illetve egyéb nagy rizikójú terhességekben indokolt a részletes magzati echokardiográfiai (szívuultrahang) vizsgálat elvégzése is. A magzati okok mellett a javallat alapját képezheti még családi anamnézis (genetikai okok), anyai kórtörténet (pl. diabetes mellitus, fenilketonuria) és különböző teratogén ártalmak (például drogok, fertőzések). Bizonyos kockázati tényezők gyakrabban társulnak veleszületett szívhibával, habár az esetek döntő részénél nem mutatható ki semmilyen ismert rizikófaktor. A módszer megbízhatósága több paramétertől függ, mint például az anyai hasfal vastagsága, az ultrahang berendezés minősége és a gyermekkardiológus szakképzettsége [12]. A vizsgálatot a 18.-22. terhesség hét között végzik, amikor a szív már elért egy bizonyos érettségi szintet és a terhesség esetleges terminálása még nem ütközik jogi korlátokba [13].

Széles körűen elterjedt a nyaki redő vastagságának a mérése [14], továbbá összefüggést mutattak ki egyes, a terhesség alatt vizsgált szérumszerek (beta-hCG és PAPP-A) és a veleszületett szívhibák megjelenése között [15], de ezek nem elég specifikusak a betegségre nézve.

3.2 mikroRNS-ek

3.2.1 A mikroRNS-ek általános jellemzői

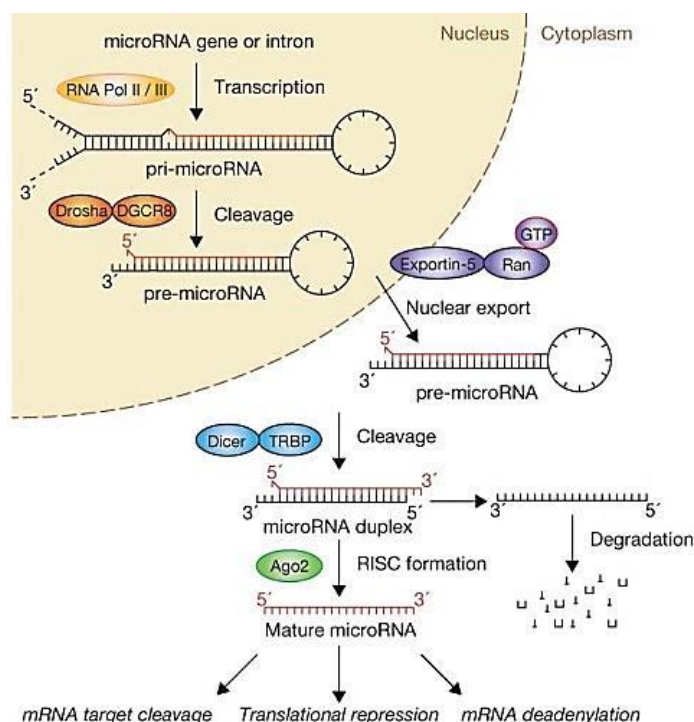
A mikroRNS-ek (miRNS) rövid 20-24 nukleotid hosszúságú, fehérjét nem kódoló RNS molekulák. Fontos szerepet töltenek be az eukarióta gének expressziójának poszttranszkripció szabályozásában, hatásukat negatív reguláció révén fejtik ki: az mRNS szekvenciák nem transzlálódó végéhez (3'UTR) kötődve gátolják annak transzlációját [16].

A miRNS 5' vége tartalmazza az mRNS szekvenciával komplementer, 7 nukleotid hosszúságú úgynevezett „seed” régiót. Egy miRNS-nek több száz különböző célgénje lehet, illetve egy adott cél-mRNS számos miRNS-kötőhelyet is tartalmazhat. Becslések szerint a humán genom több mint 1000 miRNS-t kódol, és a fehérje gének körülbelül 1/3-a miRNS-szabályozás alatt áll. A miRNS-ek expressziós mintázatára tér- és időbeli specificitás jellemző. Olyan alapvető élettani folyamatok finomhangolásában vesznek részt, mint a sejtciklus, a proliferáció, a differenciáció és a sejthalál [17].

3.2.2 A mikroRNS-ek biogenezise és hatásmechanizmusa

A miRNS-eket kódoló gének a genom intra- és intergénikus régióiban találhatóak. A legtöbb esetben a fehérjét kódoló gének intronikus szakaszain lokalizálódnak, amelyek a transzkripció során kivágódnak az mRNS előalakból. Ezek a miRNS gének a kódoló exonokkal azonos, "értelmes" DNS szálon helyezkednek el, és mivel önálló promóterrel nem rendelkeznek, ezért "gazda" génnel együtt íródnak át. A miRNS-eket kódoló gének kisebb része önálló transzkripciós egységként működik, ezek a genom nem kódoló, intergénikus régióiban találhatóak. [16]

A miRNS-ek prekursor alakja az mRNS-ektől eltérően kettős szálú, többlépéses érési folyamat során válnak egyszálúvá (3. Ábra). Transzkripciójában a II-es típusú RNS polimeráz vesz részt, amely először egy úgynevezett „hajtűprekuzort” hoz létre, a primer miRNS-t (pri-miRNS). A pri-miRNS-t még a sejtmagon belül egy III-as típusú endoribonukleáz, a DROSHA és kofaktora, a DGCR8 hasítja el. A keletkező körülbelül 70 nukleotid hosszú intermedier terméket pre-miRNS-nek nevezzünk. Ezután az Exportin-5 és kofaktora, a Ran-GTP kijuttatja a pre-miRNS-t a sejtmagból a citoplazmába, ahol egy második ribonukleáz, a DICER és kofaktora, a TRBP (Tar RNA binding protein) eltávolítja róla a terminális hurkot, egy 20-24 nukleotid hosszúságú kettős szálát eredményezve. A duplex ezután egy Argonauta fehérjével kapcsolódik, majd a cél-mRNS-sel komplementer szál („guide strand”) kiválasztódásával létrejön az effektor funkciót ellátó miRISC (miRNA-induced silencing complex) ribonukleoprotein-komplex. A másik szál („passenger strand”) a folyamat során kiválik a komplexből és degradálódik [17].



3. Ábra. A miRNS-ek érési folyamata és szabályozási mechanizmusa [18]

A miRISC komplex specifikusan kötődik az mRNS-hez, majd ennek következtében megvalósul a negatív reguláció. A poszttranszkripció gécscsökkentés ezen formájának állatokban és ember két fő hatásmechanizmusa létezik: 1) A miRNS kötődése az mRNS 3' nem transzlálódó régiójában a polyA farok deadenilációját, ezáltal szabad 3' véggel rendelkező mRNS kialakulását okozza; 2) A miRISC komplex a riboszomális 60S alegység kapcsolódásának akadályozásán keresztül gátolja a transzláció iniciációját [16,17].

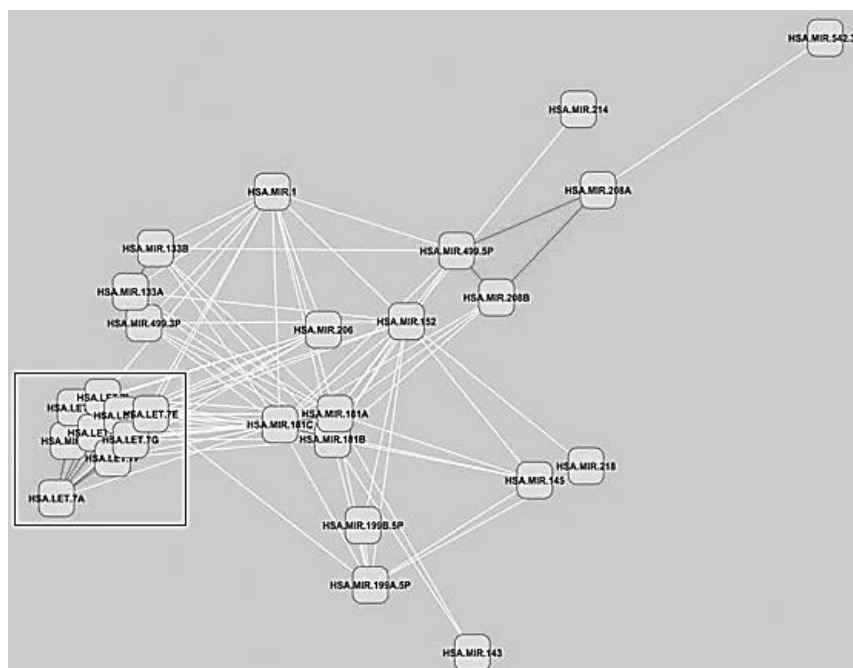
3.2.3 A mikroRNS-ek nevezéktana

A különböző fajokban jelenlévő miRNS-eket a fajra utaló egyezményes rövidítéssel jelöljük (hsa-miR-: homo sapiens, cel-miR-: C. elegans stb.). Az eltérő szekvenciájú érett miRNS-eket a "miR" előtag után sorszámokkal adjuk meg. A *let-7* miRNS család kitüntetett szerepű, mivel az elsőként felfedezett miRNS-ek között szerepel. C. elegansban a *let-7*-et kódoló gén mutációja halálos kimenetelűek, ezért kapta a "let" (lethal) előtagot. Az azonos szekvenciájú, azonban eltérő lokuszú miRNS-eket újabb sorszámozással különítjük el egymástól (például a *miR-1-1* a 20-as kromoszómán, a *miR-1-2* pedig a 18-as kromoszómán lokalizálódik). Az egy-két nukleotidban különböző miRNS-eket a számozás utáni betűkkel jelöljük (például *miR-30a*, *miR-30b*, *miR-30c* és *miR-30d*). A miRNS érési folyamat során a kettősszalú pre-miRNS-eknek általában csak az egyik szála lesz működőképes miRNS, de néha előfordul, hogy mindkettő [18]. Kétféle jelölést alkalmazhatunk ezek elkülönítésére: a kevésbé domináns szálból képződő miRNS-t nevében csillaggal jelöljük, vagy annak megfelelően, hogy az eredeti pre-miRNS melyik száláról képződik, -3p, illetve -5p jelölésekkel látjuk el.

3.2.4 A mikroRNS-ek szerepe a szívfejlődésben

Az elmúlt években számos olyan specifikus miRNS-t azonosítottak, melyek részt vesznek a szívfejlődés folyamatának szabályozásában. Ezek közé tartozik a széles körben tanulmányozott izomspecifikus *miR-1/miR-133* klaszter, melynek tagjai ellentétes hatást fejtenek ki a kardiogenezis folyamán: a *miR-1* elősegíti az epithelium sejtek szívizomsejteké váló differenciációját, míg a *miR-133* gátolja ugyanezt a folyamatot [19]. Az úgynevezett „myomiR”-ok (*miR-208a*, *miR-208b* és *miR-499*) nevüket az őket kódoló myosin génekről kapták. Olyan folyamatok finomhangolásában vesznek részt, mint a kardiális remodelling és az izomrostok myosin koncentrációjának meghatározása [20]. A szív-és érrendszerben konstitutívan expresszáldó *miR-143* és *miR-145* döntő szerepet játszik a VMSC (Vascular Smooth Muscle Cell, vaszkuláris simaizomsejtek) fenotípusának modulációjában és vascularisatio (ereződés, érképződés) folyamatának szabályozásában [21].

A *let-7* miRNS család tagjai konstitutívan expresszálódnak a szív- és érrendszer főbb sejtjeiben, beleértve a vaszkuláris simaizomsejteket, az endothel sejteket és a koszorúér simaizomsejtjeit [22]. Babiary és munkatársai 2012-ben hiPSC (human induced pluripotent stem cells) eredetű szívizomsejteken transzkriptomikai vizsgálatot végeztek, melynek eredményeül azt kapták, hogy a *let-7* miRNS család egy fontos csomópontja a cardiomyocita differenciációt szabályozó miRNS-mRNS hálózatnak (4. Ábra) [23]. A *let-7c* a 21-es kromoszóma q21.2 régiójában helyezkedik el. Coppola és munkatársai 2013-ban kísérletesen bebizonyították, hogy a *let-7c* részt vesz a cardiomyogenesis szabályozásában: célpontja egy olyan metil-transzferáz enzim (*Ezh2*), amely kulcsfontosságú, szívfejlődést szabályozó transzkripciós faktorokat csendesít (ezáltal a miRNS serkenti a folyamatot) [24]. A Down-szindróma, más néven 21-es triszómia gyakran társul szívfejlődési rendellenességgel, ezért összefüggés feltételezhető a *let-7c* megemelkedett kópiaszáma és a szívhibák megjelenése között.



4.Ábra. miRNS szabályozási hálózat a cardiomyogenesisben, bekarikázott: *let-7* miRNS család [23]

3.2.5 A keringésben fellelhető mikroRNS-ek

A humán plazmában fellelhető miRNS-ek szintje relatíve állandó és a különböző egyének között konzisztens. Stabilitásukat megőrzi olyan szélsőséges körülmények között is, mint a többszöri fagyasztási-olvasztási ciklusok, a magas, illetve alacsony pH és a hosszú tárolási idő [25]. Ezen tulajdonságainak köszönhetően, a keringő miRNS-ek potenciális biomarkerként szolgálhatnak különböző kórképek kimutatására.

Azok a miRNS-ek, amelyek a terhesség ideje alatt expresszálódnak a placentában, nagy valószínűséggel kimutathatóak az anyai keringésben [26]. Számos olyan található

közöttük, amely a részt vesz a szívfejlődés folyamatának szabályozásában, ezáltal összefüggésbe hozható a szívfejlődési rendellenességekkel [27]. Az ilyen tulajdonságokkal rendelkező, magzati eredetű miRNS-ek vizsgálata új lehetőségeket nyit a non-invazív molekuláris magzati diagnosztikában.

3.2.6 A mikroRNS-ek általános vizsgálómódszere: Real-time PCR

Hagyományos PCR

A polimeráz láncreakciót a vizsgálni kívánt nukleinsav szekvencia megsokszorozásához használjuk. A különböző mintákból izolált miRNS-ekről reverz transzkriptáz enzim segítségével cDNS-t (complementary DNS) szintetizálunk, mivel a PCR-ben működő DNS polimerázok csak DNS-templáton képesek működni. A reverz transzkriptáz egy RNS-függő DNS-polimeráz, amely az RNS templátról egy RNS/DNS hibrid molekulát állít elő. A következő lépésekben egy ribonukleáz és egy további DNS-polimeráz közreműködésével létrejön a kétszálú cDNS lánc.

Az átírás után végrehajtjuk az amplifikációt. A folyamat enzimes reakciók ismétlődésével, in vitro körülmények között megy végbe. A reakcióelegyben jelen van a templát DNS, az amplifikálandó DNS szakaszra specifikus primerek („forward” és „reverse”), a hőstabil DNS-polimeráz enzim (Taq-polimeráz), a négy dezoxiribonukleotid-trifoszfát (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) és a puffer. A reakció során a puffer biztosítja a megfelelő ionkoncentrációt, fontos alkotó eleme a Mg^{2+} ion, amely a polimeráz enzim kofaktora. A templátról képződő DNS mennyisége minden ciklus során megkétszereződik, tehát koncentrációjának növekedése exponenciális. A PCR eljárás lépései a következők:

I. rész – Inicializáció: A reakció kezdetén a DNS kettős α -hélix szerkezete felbomlik (denaturálódik) és szétválik két egyszálú DNS molekulára. A denaturációs hőmérséklet általában 92-95°C, ideje 1-5 perc.

II. rész – A célszekvencia amplifikálása

1. Denaturáció: az előző ciklusban szintetizálódott DNS láncok denaturációja, $\approx 95^\circ\text{C}$ -on.

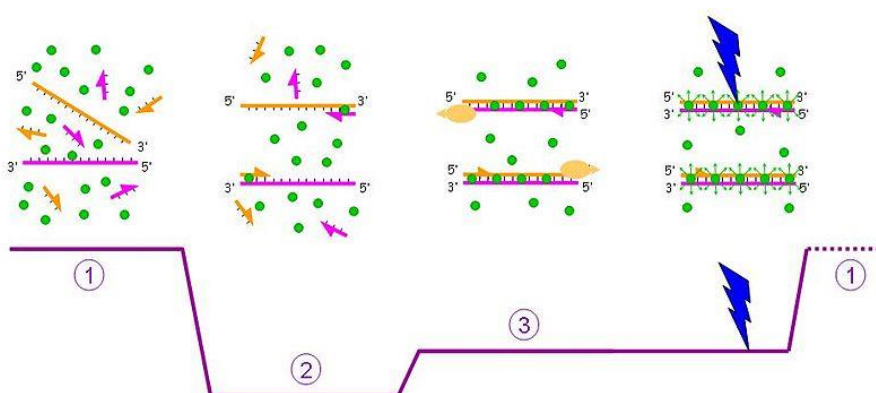
2. Annealing (kapcsolódás): A primerek bekötődnek a komplementer templát szekvenciához, a hőmérsékletet a primerek olvadáspontjának megfelelően választjuk meg 60-75°C körül.

3. Elongáció (lánc hosszabbítás): A DNS polimeráz enzim a primerektől indulva a templátnak megfelelő komplementer nukleotidokat építi be a láncba, a folyamat optimális hőfoka $\approx 72^\circ\text{C}$.

A hagyományos eljárás során a PCR termék detekciója agaróz gélelektroforézist követően etídium-bromidos jelöléssel valósul meg. Ekkor a DNS mennyisége már nincs összefüggésben a kezdeti koncentrációval, tehát a módszer segítségével arról nyerhetünk információt, hogy a templát DNS jelen van-e vizsgált mintában, vagy sem [28].

Kvantitatív Real-time PCR

A valós idejű kvantitatív PCR berendezések alkalmazásával ciklusról ciklusra nyomon követhető a DNS templát felszorzódása. A reakció során a DNS mennyiségének mérése fluoreszcens detektáláson alapul. A SYBR Green festék interkaláló molekula, amely a kettős szálú DNS-hez (dsDNA) kötődik a PCR reakcióelegyben. Bekötődve, adott monokróm fénnel indukálva fényt bocsát ki (5. Ábra). Az így létrejövő mérhető fluoreszcens jel nagysága a PCR folyamán sokszorozódó dsDNA mennyiségével arányosan növekszik. A fluoreszcencia mérése minden ciklusban végbemegy, így láthatóvá válik a reakció kinetikája (amplifikációs görbe). Az a ciklusszám (C_T), amelyenél a jel eléri a logaritmikus PCR fázist, a target DNS kiindulási mennyiségének függvénye. Ennek ismeretében lehetséges a target kiindulási mennyiségének pontos mérése.



5. Ábra SYBR Green interkaláló festék működési mechanizmusa

Az úgynevezett olvadáspont-analízist a termék azonosítására használjuk, mely a termékspecifikus T_m érték kimérésével lehetséges. Minden DNS fragmentumra jellemző az olvadáspontja (T_m), mely definíciószerűen az a hőmérséklet, melyen az adott DNS fragmens 50%-a egyszálú. Az olvadáspontot leginkább befolyásoló tényezők: a fragmens G+C tartalma, valamint hossza.

A mennyiségi meghatározás történhet abszolút vagy relatív kvantifikációval. Az abszolút kvantifikáció során egy ismert koncentrációjú, úgynevezet kalibrátor mintából hígítási sort készítünk. Meghatározzuk az egyes hígítási tagokhoz tartozó C_T értékeket, majd ábrázoljuk őket a koncentráció függvényében. Az így kapott pontokra illesztett egyenes a standard görbe, mely alapján egy ismeretlen minta C_T értékéből következtetni tudunk annak mennyiségére.

A kvantifikálás másik lehetséges módja a relatív mennyiségi meghatározás, azaz a ($\Delta\Delta C_T$ módszer). Annak az elkerülésére alkalmazzuk, hogy a különböző mintákban jelenlévő eltérő mennyiségű DNS koncentráció (például rosszul kivitelezett cDNS szintézis következtében) befolyásolja az eredményeket. A célgén amplifikációját egy referencia gén amplifikációjával hasonlítjuk össze. A referens gén általában egy háztartási gén, melynek

expressziója állandó a mintákban. Ahhoz, hogy összehasonlíthassuk a kvantifikált gén és a referens gén PCR-ének kiinduló templát DNS tartalmát, a két gén amplifikációs hatékonyságának azonosnak kell lennie. Ezen kívül minden real-time PCR futtatásban kell lennie egy kontrollnak (egy egészséges egyed DNS-e), melyet kalibrátorként szolgál. Ehhez a kalibrátorhoz viszonyítjuk a futtatás összes többi reakcióját. A végeredmény ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) a célgén génekópiáinak kalibrátorhoz viszonyított mennyiségét adja meg az ismeretlen mintában [29].

A két eljárás kombinációja a relatív standard görbe módszer, mely az abszolút és relatív kvantifikálás előnyeivel egyaránt rendelkezik. Segítségével meghatározhatjuk a vizsgált nukleinsav pontos koncentrációját, ugyanakkor a referenciához való viszonyítással kiküszöbölhetjük a minta minőségével adódó hibaforrásokat. A standard görbe segítségével mind a célgén, mind a referens gén koncentrációját meghatározzuk a mintákban. Ezután az egyes mintákban lévő vizsgált gén koncentrációját elosztjuk a referencia gén mennyiségével, ezáltal normalizáljuk a kapott eredményeket.

4 CÉLKITŰZÉSEK

A kutatás során célkitűzésünk volt a miRNS-ek szerepének tanulmányozása a szívfejlődési rendellenességekben; a *let-7c* miRNS expressziós vizsgálata anyai plazma mintákban és kóros magzati szívszövetben; további potenciális miRNS biomarkerek keresése a veleszületett szívfejlődési rendellenesség non-invazív prenatális kimutatására.

A kutatás egyes fázisaiban a feladataim a következők voltak:

I. Semmelweis Egyetem - A *let-7c* miRNS expressziós vizsgálata anyai plazma- és magzati szívszövet mintákban kvantitatív RT-PCR módszerrel:

- Az anyai plazma vizsgálatokban résztvevő várandósok adatainak (anya súlya, kora, az eddigi és a jelen terhességre vonatkozó adatok, szérum biomarkerek, magzati echokardiográfia és intrauterin karyotipizálás során felállított diagnózis stb.) összesítése;
- A magzati szívszövet vizsgálatokhoz felhasznált minták adatainak összegyűjtése (anyai kor, terhességi kor a vetéléskor, a vetélés oka, ultrahang lelet és a patológiai vizsgálat eredménye);
- Az anyáktól származó perifériás vérmintákból és a magzati szívszövetmintákból miRNS extrakció végrehajtása; majd az össz-miRNS koncentráció meghatározása spektrofotométer segítségével;
- A *let-7c* miRNS expressziós vizsgálata az anyai plazma- és magzati szívszövet mintákban kvantitatív RT-PCR módszerrel; a kapott eredmények statisztikai elemzése.

II. Seconda Università di Napoli - Szív-és érrendszeri betegségekre specifiikus, miRNS PCR Array analízis elvégzése pool-ozott anyai plazma mintákon:

- Az előzetesen összegyűjtött anyai plazma miRNS mintákból a különböző szív- és kromoszóma-rendellenességeknek megfelelően beteg és kontroll mintákból összeállított miRNS pool-ok készítése;
- Az ily módon nyert mintákon miRNS PCR Array analízis elvégzése, a szív-és érrendszeri betegségekre specifikus panel felhasználásával;
- Annak megállapítása, hogy az egyes betegcsoportokban mely miRNS-ek mutatnak fokozott vagy csökkent expressziót a normál mintákhoz képest;
- Az eredmények összevetése a különböző szív- és érrendszeri megbetegedésekben megfigyelt változásokkal, majd ez alapján a jelentősebb miRNS-ek kiválasztása;
- Bioinformatikai adatbázisok és miRNS-target predikciós programok segítségével a szignifikáns miRNS-ek elemzése, a szívfejlődési rendellenességekkel lehetséges összefüggés keresése.

5 BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

5.1 Betegek

5.1.1 Anyai plazma vizsgálatok

2013. január és 2014. május között 79 db perifériás vérmintát gyűjtöttünk a Semmelweis Egyetem I.sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikán terhesgondozásban résztvevő várandósoktól. A kutatás elvégzéséhez engedélyt kértünk a Semmelweis Egyetem Etikai bizottságától. A vizsgáló orvos szóban és írásban tájékoztatta a vizsgálat alanyait, akik ezután írásbeli beleegyező nyilatkozatot tettek a vérminták további felhasználásáról.

A beteg csoportot 41 olyan édesanya alkotta, akiknek a magzata szívfejlődési rendellenességet mutatott. A diagnózis felállítása magzati echokardiográfia alapján történt, az elvetélt terhességek esetében fetopathológiai vizsgálattal megerősítették a rendellenességek jelenlétét. A kóros esetek egy részében magzatvíz mintavétel, majd azt követően intrauterin karyotipizálás is történt, melynek segítségével kiszűrhetők a kromoszóma-rendellenességek. 12 esetben találtunk aneuploidát, ezek közül 3 db 18-as triszómia (Edwards-szindróma) és 9 db 21-es triszómia (Down-szindróma) volt. A kontroll csoportot 38 egészséges magzatot hordozó anya alkotta, akiknél a rutin szülészeti ultrahang vizsgálat során nem mutatkozott kóros eltérés.

A *let-7c* miRNS expressziós vizsgálatához 28 várandós mintáját választottuk ki. A 14 beteg eset (Mellékletek, 1. Táblázat) kijelölésénél az alábbi 4 kritériumot vettük figyelembe: 1) a magzat pozitív echokardiográfiai lelete, 2) citogenetikai vizsgálattal nem igazolódott aneuploidia, 3) a terhesség spontán fertilizációval jött létre (nem mesterséges megtermékenyítéssel), 4) nem ikerterhesség, 5) az anya kórtörténetében nem szerepel kardiovaszkuláris megbetegedés. A kontroll csoportban 14, a beteg csoporttal életkor és a vérvételkori terhességi kor alapján összehasonlítható várandós szerepelt (3. Táblázat).

A miRNS PCR Array kísérlethez a beteg csoportból 22, a kontroll csoportból 12 anyai plazma mintát használtunk fel. A minták kiválasztásánál a legfontosabb szempont az össz-miRNS koncentráció volt (min. 2 ng/μl), mivel ez befolyásoló tényező volt a vizsgálat sikerességében. A különböző szív- és kromoszóma-rendellenességeknek megfelelően 5 beteg és 2, korosztály szerint megkülönböztetett "normál" miRNS pool-t készítettünk. A triszómiás minták esetében kontrollként a 36-42 éves normál korosztályt, az egyéb szívfejlődési rendellenességek esetében a 30-35 éves korosztályt állítottuk be kontroll csoportként.

Karakterisztika	let-7c RT-PCR			miRNS PCR Array		
	VSzR(n=14)	Ktrl(n=14)	p	VSzR (n=22)	Ktrl (n=12)	p
Anya életkora (év)	32,5 (20-38)	31,5 (24-39)	0,33	33,9 (19-43)	34,6(31-39)	0,71
Terhességi kor (hét)	20,9 (15-25)	19,4 (13-33)	0,99	22,2 (15-38)	19,6 (16-30)	0,23

3. Táblázat. A vizsgálatokban résztvevő édesanyák átlagos életkora és a terhesség kora. VSzR: Vele született szívfejlődési rendellenesség, Ktrl: kontroll, p: p-érték

5.1.2 Magzati szívszövet vizsgálatok

A Semmelweis Egyetem I.sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikán végzett fetopathológiai vizsgálatok során kóros és egészséges magzati szív mintákat gyűjtöttünk. A patológiai feldolgozás célja a vetélés okának megállapítása/igazolása, a prenatálisan diagnosztizált és egyéb, előzetesen fel nem ismert fejlődési rendellenességek azonosítása.

Az esetek többségében középidős terhesség (13-24. hét) megszakítás történt, de előfordult spontán vetélés is (4. Táblázat). A vetélés indukció oka legtöbbször a prenatális szűrővizsgálatok során detektált súlyos fejlődési- és/vagy kromoszóma rendellenesség volt (21-es triszómia). Egy esetben nem kívánt terhesség miatt történt a beavatkozás.

A *let-7c* miRNS expresszióját 9 db magzati szívszövet mintában vizsgáltuk meg. A kontroll minták esetében nem volt kimutatható szívet érintő elváltozás és nem igazolódott aneuploida. A mintákat kórosnak tekintettük, ha a fetopathológiai vizsgálat során szívfejlődési rendellenességet állapítottak meg, vagy ha előzetes cytogenetikai vizsgálattal kromoszóma rendellenességet igazoltak. Ennek megfelelően a beteg mintákat különböző alcsoportokba soroltuk:

- I) "VSzR" - szívfejlődési rendellenességet mutató magzatok,
- II) "T21" - 21-es triszómiás, de a szívet tekintve kóros elváltozást nem mutató magzatok,
- III) "T21+VSzR" - szívfejlődési rendellenességgel társult 21-es triszómiás magzatok.

Kód	Típus	Anyai életkor*	Magzat kora**	Magzat neme	sp./ind.	Vetélés oka	Patológia (szív)
137	K	25	21	lány	Sp.	nem ismert	szív normál
138	T21	40	15	fiú	Ind.	21-es triszómia	szív normál
139	T21+VSzR	39	20	lány	Ind.	21-es triszómia, kóros UH	jobb kamra dilatált
140	T21	42	20	fiú	Ind.	21-es triszómia	szív normál
143	VSzR	22	23	fiú	Ind.	kóros UH	VSD
144	T21+VSzR	37	19	fiú	Ind.	21-es triszómia, kóros UH	VSD
145	VSzR	35	15	lány	Ind.	kóros UH	AVSD
147	VSzR	16	23	fiú	Ind.	kóros UH	PA
148	K	17	15	fiú	Ind.	nemkívánt terhesség	szív normál

4. Táblázat. A fetopathológiai vizsgálatok során gyűjtött magzati szív mintákhoz tartozó adatok. A patológiai adatok csak a szívre vonatkoznak. (*) Az anyai életkor évben, (**) a magzat kora hétben van megadva. UH: Ultrahang.

5.2 Módszerek

5.2.1 Mintagyűjtés

5.2.1.1 Vérvétel és plazma elválasztás

Az anyai perifériás vérmintákat zárt vérvételi rendszer segítségével vettük le. A mintákat EDTA tartalmú csövekbe gyűjtöttük, hogy megakadályozzuk a véralvadást. Az K_3 -EDTA a Ca^{2+} és Mg^{2+} ionok megkötése által fejti ki antikoaguláns hatását, továbbá gátolja az endogén nukleázok aktivitását.

A vérmintákból *Eppendorf 5810 R (Eppendorf AG, Hamburg, Németország)* típusú centrifuga segítségével elválasztottuk a plazmát. A mintákat 10 percig 2,500 rpm fordulatszámon, majd a leszívott felülúszót 10 percig 15,500 rpm fordulatszámon centrifugáltuk. Az így nyert plazmamintákat 1.5mL-es Eppendorf csövekben, $-80^{\circ}C$ -on tároltuk a további feldolgozásig.

5.2.1.2 Magzati szívszövet gyűjtés

A fetopathológiai vizsgálatok során, a magzatokon és mellékreszein (placenta, köldökszínór) részletes feldolgozás történt. A szív boncolásakor a jobb- és bal kamrából mintát vettünk (min. 30mg), melyet 1.5mL-es Eppendorf csövekben, $-80^{\circ}C$ -os fagyasztóban tároltunk a további feldolgozásig.

5.2.2 miRNS extrakció

5.2.2.1 miRNS extrakció anyai plazmából

A plazmából miRNS extrakciót végeztünk a *NucleoSpin® miRNA Plasma (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Németország)* kit felhasználásával, a gyártó leírásának megfelelően. A módszer a hagyományos szerves oldószerekkel történő izolálást kombinálja a szilikamembrán alapú oszlopos technikával, így lehetővé válik a kisméretű RNS molekulák megkötése. A plazmából származó, membránon megkötött miRNS mosási lépéseket követően centrifugálással az oszlopról eltávolítható, és közvetlenül használható további kísérletekben (6. Ábra). Az eljárás nagy előnye a hagyományos módszerekkel szemben, hogy az extrakció menete, főleg több minta esetén, gyorsabb és egyszerűbb.

A kit tartalma (a gyártó elnevezése szerint):

- Lysis Buffer MLP: 15 mL
- Protein Precipitation Buffer MPP: 5 mL
- Reaction Buffer for rDNase: 3 mL
- rDNase, RNase-free (lyophilized): 1 üvegcs
- Wash Buffer MW1: 10 mL
- Wash Buffer MW2 (Concentrate): 20 mL

- RNase-free H₂O: 5 mL
- NucleoSpin® miRNA Columns: 50 db
- Collection Tubes (1.5 mL, lid): 50 db
- Collection Tubes (2 mL, lid): 50 db
- Collection Tubes (2 mL): 50 db

Egyéb szükséges reagensek:

- 96–100 % -os etanol (C₂H₅OH)
- Izopropanol (C₃H₈O)

Előkészítés:

1. A "Wash Buffer MW2" koncentrátumhoz 80 mL ethanol adunk, majd finoman összekeverjük. Szobahőmérsékleten (18-25°C) tárolható.
2. A liofilizált "RNase-free rDNase"-hoz 3 mL "Reaction Buffer for rDNase"-t adunk. 1 percig inkubáljuk szobahőmérsékleten, majd finoman összerázzuk (nem szabad centrifugálni, mert az enzim nagyon érzékeny a mechanikai behatásokra). A következő felhasználásig -20°C-on tároljuk.

Az izolálás lépései:

1. Minta előkészítése
Egy 2 mL-es gyűjtőcsőbe 300 µl plazmamintát pipetázunk, hozzáadunk 90 µl denaturáló MLP puffert, 5 másodpercig keverjük, majd 3 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk.
2. Fehérje kicsapása
30 µl MPP puffert adunk az elegyhez, 5 másodpercig keverjük, 1 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk, majd 11,000×g-n 3 percig centrifugáljuk.
3. Felülúszó elválasztása
A felülúszót átviesszük egy új 2 ml-es gyűjtőcsőbe.
4. A nukleinsavak megkötéséhez szükséges feltételek megteremtése
400 µl izopropanolt adunk a mintához, majd 5 másodpercig keverjük.
5. DNS és RNS megkötése
A NucleoSpin® miRNA oszlopot egy 2 mL-es gyűjtőcsőbe helyezzük, a mintát az oszlopra viesszük, 2 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk, majd 11,000×g-n 30 másodpercig centrifugáljuk. A felülúszót leöntjük, majd visszahelyezzük az oszlopot a csőbe.
6. DNS emésztése
1. mosás: 700 µl mosó MW2 puffert adunk a mintához, majd 11,000×g-n 30 másodpercig centrifugáljuk. Az átszűrt folyadékot leöntjük, majd visszahelyezzük az oszlopot a csőbe.

2. mosás: 250 µl mosó MW2 puffert adunk a mintához, majd 11,000×g-n 2 percig centrifugáljuk. Az átszűrt folyadékot leöntjük, majd visszahelyezzük az oszlopot a csőbe.

DNS emésztése: 50 µl rDNÁzt pipetázunk a membránra, majd 15 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk.

7. A szilikamembrán mosása

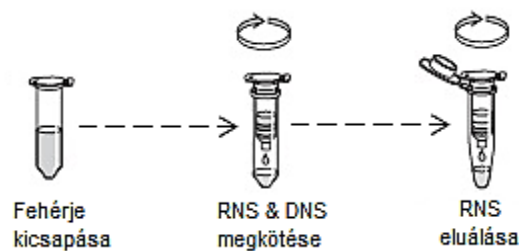
1. mosás: 100 µl mosó MW1 puffert adunk a mintához, majd 11,000×g-n 30 másodpercig centrifugáljuk. Az átszűrt folyadékot leöntjük, majd visszahelyezzük az oszlopot a csőbe.

2. mosás: 700 µl mosó MW2 puffert adunk a mintához, majd 11,000×g-n 30 másodpercig centrifugáljuk. Az átszűrt folyadékot leöntjük, majd visszahelyezzük az oszlopot a csőbe.

3. mosás: 250 µl mosó MW2 puffert adunk a mintához, majd 11,000×g-n 2 percig centrifugáljuk. Az átszűrt folyadékot leöntjük, majd visszahelyezzük az oszlopot a csőbe.

8. RNS eluálása

A NucleoSpin® miRNA oszlopot egy új 1,5 mL-es gyűjtőcsőbe helyezzük, 30 µl RNáz-mentes vizet pipetázunk a membránra, 1 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk, majd 11,000×g-n 1 percig centrifugáljuk. Az átszűrt folyadékban található az oszlopról leoldott miRNS, amelyet a további feldolgozásig -80°C-on tárolunk.



6. Ábra. A miRNS izolálás legfontosabb fontosabb lépései

5.2.2.2 miRNS extrakció szívsvövetből

A magzati szív mintákból (jobb kamra) miRNS extrakciót végeztünk a *NucleoSpin® miRNA* (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Németország) kit felhasználásával. Az izolálást a gyártó leírásának megfelelően hajtottuk végre, az "RNA purification from animal tissue and cultured cells" protokoll szerint.

A kit tartalma (a gyártó elnevezése szerint):

- Lysis Buffer MLP: 5 mL
- Protein Precipitation Buffer MP: 5 mL
- Binding Buffer MX: 15 mL
- Membrane Desalting Buffer MDB: 10 mL
- Reaction Buffer for rDNase: 3 mL
- rDNase, RNase-free (lyophilized): 1 üvegse

- Wash Buffer MW1: 10 mL
- Wash Buffer MW2 (Concentrate): 6 mL
- RNase-free H₂O: 5 mL
- NucleoSpin® miRNA Filters: 10 db
- NucleoSpin® RNA Columns: 10 db
- NucleoSpin® miRNA Columns: 10 db
- NucleoSpin® Protein Removal Columns: 10 db
- Collection Tubes (1.5 mL, lid): 10 db
- Collection Tubes (2 mL, lid): 30 db
- Collection Tubes (2 mL): 10 db

Egyéb szükséges reagensek:

- 96–100 % -os etanol (C₂H₅OH)

Előkészítés:

1. A "Wash Buffer MW2" koncentrátumhoz 24 mL ethanol adunk, majd finoman összekeverjük. Szobahőmérsékleten (18-25°C) tárolható.
2. A liofilizált "RNase-free rDNase"-hoz 3 mL "Reaction Buffer for rDNase"-t adunk. 1 percig inkubáljuk szobahőmérsékleten, majd finoman összerázzuk (nem szabad centrifugálni, mert az enzim nagyon érzékeny a mechanikai behatásokra). A következő felhasználásig -20°C-on tároljuk.

Az izolálás lépései:

1. Sejt lízis
A szövetmintát folyékony nitrogén alatt finom porrá zúzzuk. Ebből kb. 30 mg-ot egy 1.5 mL-es mikrocentrifuga csőbe helyezünk, majd 300 µl ML puffert adunk hozzá, megkeverjük és 5 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk.
2. Lizátum homogenizálása
A NucleoSpin® Filter-t egy 2 mL-es gyűjtőcsőbe helyezzük, a mintát az oszlopra visszük, majd 11,000×g-n 1 percig centrifugáljuk.
3. A DNS és hosszú RNS megkötéséhez szükséges feltételek megteremtése
A NucleoSpin® Filter-t eltávolítjuk, 150 µl ethanol adunk a mintához, 5 másodpercig keverjük, majd 5 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk.
4. DNS és hosszú RNS megkötése
A NucleoSpin® RNA oszlopot egy 2 mL-es gyűjtőcsőbe helyezzük, a mintát az oszlopra visszük, majd 14,000×g-n 1 percig centrifugáljuk.
5. Fehérje emésztése

- A NucleoSpin® RNA oszlopot eltávolítjuk, 300 µl MPP puffert adunk az elegyhez, 5 másodpercig keverjük, majd 11,000×g-n 3 percig centrifugáljuk.
6. Fehérje csapadék eltávolítása
- A NucleoSpin® Protein Removal oszlopot egy 2 mL-es gyűjtőcsőbe helyezzük, a mintát az oszlopra visszük, majd 11,000×g-n 1 percig centrifugáljuk.
7. A kis RNS megkötéséhez szükséges feltételek megteremtése
- A NucleoSpin® Protein Removal oszlopot eltávolítjuk, 800 µl MX puffert adunk a mintához, majd 5 másodpercig keverjük.
8. Kis RNS megkötése
- A NucleoSpin® miRNA oszlopot egy 2 mL-es gyűjtőcsőbe helyezzük, 725 µl mintát az oszlopra viszünk, majd 11,000×g-n 30 másodpercig centrifugáljuk. A felülúszót leöntjük, majd visszahelyezzük az oszlopot a csőbe. A maradék mintával megismételjük a műveletet.
9. A szilikamembrán mosása
1. mosás: 600 µl mosó MW1 puffert adunk a mintához, majd 11,000×g-n 30 másodpercig centrifugáljuk. Az átszűrt folyadékot leöntjük, majd visszahelyezzük az oszlopot a csőbe.
2. mosás: 700 µl mosó MW2 puffert adunk a mintához, majd 11,000×g-n 30 másodpercig centrifugáljuk. Az átszűrt folyadékot leöntjük, majd visszahelyezzük az oszlopot a csőbe.
3. mosás: 250 µl mosó MW2 puffert adunk a mintához, majd 11,000×g-n 2 percig centrifugáljuk. Az átszűrt folyadékot leöntjük, majd visszahelyezzük az oszlopot a csőbe.
10. RNS eluálása
- A NucleoSpin® miRNA oszlopot egy új 1,5 mL-es gyűjtőcsőbe helyezzük, 50 µl RNáz-mentes vizet pipetázunk a membránra, 1 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk, majd 11,000×g-n 30 másodpercig centrifugáljuk. Az átszűrt folyadékban található az oszlopról leoldott miRNS, amelyet a további feldolgozásig -80°C-on tárolunk.

5.2.3 Össz-miRNS koncentrációmérés

A kapott minták össz-miRNS koncentrációját *Nanodrop 1000* UV-VIS spektrofotométer (*Thermo Fischer Scientific Inc., Wilmington, USA*) segítségével határoztuk meg. RNA-40 beállítással dolgoztunk, és az egyes mérésekhez 2 µl mintát használtunk fel. A nukleinsavak abszorpció maximuma 260 nm-es hullámhosszon látható, az elnyelés mértékéből kiszámítható a minta nukleinsav koncentrációja.

5.2.4 A *let-7c* miRNS expressziós vizsgálata

5.2.4.1 *let-7c* miRNS expressziós vizsgálat anyai plazma mintákban

- **cDNS szintézis**

Az anyai plazma mintákból izolált miRNS-ek reverz transzkripcióját a *miScript® II RT Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) felhasználásával végeztük el, a gyártó leírásának megfelelően.

A kit tartalma (a gyártó elnevezése szerint):

- miScript Reverse Transcriptase Mix: 100 µl
- 5x miScript HiSpec Buffer: 400 µl (érett miRNS detekcióhoz)
- 5x miScript HiFlex Buffer: 400 µl (prekurzor miRNS detekcióhoz)
- 10x miScript Nucleics Mix: 200 µl
- RNase-free H₂O: 1,9 ml

A cDNS szintézis lépései:

1. Reverz transzkripció master mix összeállítása

Összemérjük a cDNS szintézishez szükséges komponenseket az alábbi módon (a mennyiség egy mintára értendőek):

2 µl 5x miScript HiSpec Buffer

1 µl 10x miScript Nucleics Mix

2 µl RNáz-mentes víz

1 µl miScript Reverse Transcriptase Mix

6 µl Reverz transzkripció master mix

2. Templát hozzáadása

A mixhez 4 µl templát miRNS-t adunk, amivel elérjük a 10 µl-es végtérfogatot.

3. Futtatás

A futtatást a *GeneAmp® PCR System 9700* thermocyclerrel (*Thermo Fischer Scientific Inc., Wilmington, USA*) hajtjuk végre: a mintát először 60 percig, 37°C-on, majd 5 percig, 95°C-on inkubáljuk.

- **RT-PCR**

A reakciók kivitelezéséhez a *LightCycler® FastSart DNA Master SYBR Green I* kitet (*Roche Ltd., Penzberg, Németország*) használtuk. A reakciót a *let-7c* miRNS-re és a kontroll u6-snRNS-re specifikus primerekkel (*miRCURY LNA™ PCR primer set, Exiqon A/S, Vedbæk, Dánia*) hajtottuk végre, a gyártók leírásának megfelelően. A mérések során a globin háztartási

gént alkalmaztuk kalibrátornak, előre meghatározott koncentrációkban (15, 1,5, 0,15, 0,015 ng/μl). A *let-7c* target szekvenciája: 5'-UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU-3'.

A kit tartalma (a gyártó elnevezése szerint):

- LightCycler® FastStart Enzyme: 1 üvegcsé ("vial 1a")
- LightCycler® FastStart Reaction Mix SYBR Green I: 3 üvegcsé, 3×64 μl ("vial 1b")
- MgCl₂ Stock Solution, 25 mM: 1 üvegcsé, 1 ml
- H₂O, PCR Grade: 2 üvegcsé, 2×1 ml

A RT-PCR reakció lépései:

1. Előkészítés:

- A *let-7c* és *u6* primereket 220 μl nukleáz-mentes vízzel felhígítjuk, röviden keverjük
- Az 1a "Enzyme" és az 1b "Reaction Mix" üvegcséket röviden centrifugáljuk. Az 1a-ból 10 μl-t hozzámérünk az 1b-hez, pipettázással kevejük, így megkapjuk a FastStart DNA Master SYBR Green I-et.

2. Reakció mix összeállítása:

Összemérjük a PCR-hez szükséges komponenseket (a mennyiség egy mintára értendőek):

H₂O, PCR Grade: 5,5 μl

MgCl₂, 25 mM: 1,5 μl

FastStart DNA Master SYBR Green I: 1,0 μl

Primer mix: 1,0 μl

9 μl PCR Master mix

3. Templát hozzáadása:

A mixhez 1 μl templát templát cDNS-t adunk, amivel elérjük a 10 μl-es végtérfogatot.

4. PCR reakció futtatása:

A futtatást a LightCycler® 2.0 fotométerrel kombinált thermocyclerrel (*Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország*) hajtjuk végre az alábbi beállításokkal:

Aktivációs lépés: 10 perc, 95°C

Denaturáció: 10 mp, 95°C

Anellálás: 15 mp, 58°C

Extenzió: 15 mp, 72°C

} ×40

• **Kiértékelés:**

A RT-PCR reakciókat a Light Cycler® 4.05 szoftverrel dolgoztuk fel. Az egyes mintákhoz tartozó *let-7c* és *u6* koncentrációkat Excel táblázatban (Microsoft Co., Seattle, USA) rögzítettük, és további számításokat végeztünk. Az adatok normalizálása a következő módon történt: az egyes mintákban lévő *let-7c* koncentrációt elosztottuk az ugyanabban a

mintában mért *u6* koncentrációval, majd a kapott hányadost megszoroztuk az összes mintában átlagosan mért *u6* koncentrációval.

5.2.4.2 *let-7c* miRNS expressziós vizsgálat magzati szívszövet mintákban

- **cDNS szintézis**

A magzati szív mintákból izolált miRNS-ek reverz transzkripcióját a *First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) segítségével, a gyártó leírásának megfelelően hajtottuk végre.

A kit tartalma (a gyártó elnevezése szerint):

- AMV Reverse Transcriptase: 24 µl
- Deoxynucleotide Mix: 210 µl
- 10x Reaction Buffer: 1,05 mL
- 25 mM MgCl₂:
- 0.05% Gelatin: 210 µl
- Oligo-p(dT)₁₅ Primer: 60 µl
- Random Primer p(dN)₆: 60 µl
- RNase Inhibitor: 30 µl
- Control Neo pa RNA: 25 µl
- Sterile Water: 1,3 mL

A cDNS szintézis lépései:

1. Reverz transzkripció master mix összeállítása

Összemérjük a cDNS szintézishez szükséges komponenseket (a mennyiség egy mintára értendőek):

10x Reaction Buffer:	2 µl
25 mM MgCl ₂ :	4 µl
Deoxynucleotide Mix:	2 µl
Random Primer:	2 µl
RNase Inhibitor:	1 µl
AMV Reverse Transcriptase:	0,8 µl
Sterile water:	4,2 µl
18 µl Reverz transzkripció master mix	

2. Templát hozzáadása

A mixhez 4 µl templát miRNS-t adunk, amivel elérjük a 20µl-es végtérfogatot.

3. Futtatás

A futtatást a *GeneAmp® PCR System 9700* thermocyclerrel (*Thermo Fischer Scientific Inc., Wilmington, USA*) hajtjuk végre: a mintát először 10 percig 25°C-on, majd 60 percig 42°C-on, végül 5 percig 99,9°C-on inkubáljuk.

• RT-PCR

A reakciók kivitelezéséhez a *miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR* kitet (*Exiqon A/S, Vedbæk, Dánia*) használtunk. A reakciót a *let-7c* miRNS-re és a kontroll *u6*-snRNS-re specifikus primerekkel hajtottuk végre, a gyártók leírásának megfelelően. A mérések során a globin háztartási gént alkalmaztuk kalibrátornak, előre meghatározott koncentrációkban (15, 1,5, 0,15, 0,015 ng/μl).

A kit tartalma (a gyártó elnevezése szerint):

- ExiLENT SYBR Green master mix: 500 μl
- *hsa-let-7c* miRCURY LNA™ PCR primer set: 1 üvegcsé
- *U6* snRNA PCR primer set: 1 üvegcsé
- Nuclease free H₂O: 1,25 ml

A RT-PCR reakció lépései:

1. Előkészítés:

- A *let-7c* és *u6* primereket 220 μl nukleáz-mentes vízzel felhígítjuk, röviden keverjük
- A cDNS mintákat 1:40 arányban felhígítjuk: 1 μl cDNS + 39 μl H₂O

2. Reakció mix összeállítása:

Összemérjük a PCR-hez szükséges komponenseket (a mennyiség egy mintára értendőek):

PCR Master Mix: 5 μl

PCR primer mix: 1 μl

6 μl PCR Master mix

3. Templát hozzáadása:

A mixhez 4 μl felhígított cDNS-t adunk, amivel elérjük a 10 μl-es végtérfogatot.

4. PCR reakció futtatása:

A futtatást a *LightCycler® 2.0* fotométerrel kombinált thermocyclerrel (*Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország*) hajtjuk végre az alábbi beállításokkal:

Aktivációs lépés: 10 perc, 95°C

Denaturáció: 10 mp, 95°C

Anellálás és extenzió: 1 perc, 60°C

} ×40

• Kiértékelés

A RT-PCR reakciók kiértékelése az 5.2.4.1 pontban leírtakkal megegyezően történt.

5.2.5 miRNS PCR Array vizsgálat

Az anyai plazma mintákon miRNS PCR Array analízist végeztünk, a szív-és érrendszeri betegségekre specifikus panel felhasználásával: *Human Cardiovascular Disease miRNA PCR Array* (Qiagen GmbH, Hilden, Németország), katalógusszám: MIHS-113Z. A panel 84 miRNS expressziós vizsgálatát teszi lehetővé, amelyek különböző szív-és érrendszeri megbetegedésekben, illetve szívfejlődési folyamatban a normálistól eltérő módon fejeződnek ki. Az egyes miRNS-ek meghatározó szerepét széles spektrumú kardiovaszkuláris betegség modellek, klinikai minták és sejtvonalak felhasználásával, korszerű kísérleti rendszerekben (microarray, RT-PCR, újgenerációs szekvenálás stb.) azonosították:

Myocardialis infarctus (MI):

Upregulált: *let-7e-5p, miR-122-5p, miR-126-5p, miR-133b, miR-145-5p, miR-146a-5p, miR-15b-5p, miR-208a, miR-208b, miR-223-3p, miR-320a, miR-499a-5p.*

Downregulált: *miR-1, miR-107, miR-130a-3p, miR-133a, miR-143-3p, miR-155-5p, miR-16-5p, miR-195-5p, miR-21-5p, miR-214-3p, miR-22-3p, miR-24-3p, miR-26a-5p, miR-26b-5p, miR-494.*

Cardialis hypertrophia (CH):

Upregulált: *let-7b-5p, let-7c, miR-103a-3p, miR-125b-5p, miR-140-5p, miR-142-3p, miR-146a-5p, miR-18b-5p, miR-195-5p, miR-199a-5p, miR-208a, miR-208b, miR-21-5p, miR-214-3p, miR-221-3p, miR-222-3p, miR-224-5p, miR-23a-3p, miR-23b-3p, miR-24-3p, miR-25-3p, miR-27a-3p, miR-27b-3p, miR-31-5p, miR-424-5p.*

Downregulált: *miR-1, miR-126-5p, miR-133a, miR-133b, miR-149-5p, miR-150-5p, miR-181b-5p, miR-185-5p, miR-29a-3p, miR-29b-3p, miR-29c-3p, miR-30e-5p, miR-451a, miR-486-5p, miR-93-5p.*

Regulált: *miR-182-5p.*

Cardiomyopathia (CM):

Upregulált: *let-7c, miR-100-5p, miR-103a-3p, miR-10b-5p, miR-125b-5p, miR-140-5p, miR-145-5p, miR-146a-5p, miR-181b-5p, miR-195-5p, miR-208a, miR-208b, miR-21-5p, miR-210, miR-214-3p, miR-221-3p, miR-222-3p, miR-23a-3p, miR-328, miR-342-3p, miR-423-3p, miR-499a-5p.*

Downregulált: *miR-1, miR-125a-5p, miR-126-5p, miR-133a, miR-133b, miR-143-3p, miR-29b-3p, miR-365a-3p, miR-378a-3p, miR-7-5p, miR-92a-3p.*

Differenciáció/Fejlődés:

Upregulált: *let-7a-5p, let-7b-5p, let-7c, let-7d-5p, let-7f-5p, miR-1, miR-133a, miR-143-3p, miR-144-3p, miR-145-5p, miR-17-5p, miR-181a-5p, miR-206, miR-208a, miR-21-5p, miR-24-3p, miR-26a-5p, miR-27a-3p, miR-27b-3p, miR-30a-5p, miR-30c-5p, miR-30d-5p, miR-378a-3p, miR-93-5p, miR-98-5p, miR-99a-5p.*

Downregulált: *miR-124-3p, miR-125b-5p, miR-183-5p, miR-302a-3p, miR-302b-3p.*

A panelen található miRNS-ek közül csak azokat vettük figyelembe, melyek kifejeződnek placentában is, ezáltal a keringésben jelenlévő szabad formájuk egy bizonyos hányada feltehetően magzati eredetű. A szöveti specificitásra vonatkozó adatokat a szakirodalomból [30-32] és internetes adatbázisok (*miRBase*: www.mirbase.org, *miRDB*: mirdb.org/miRDB/) felhasználásával gyűjtöttem ki.

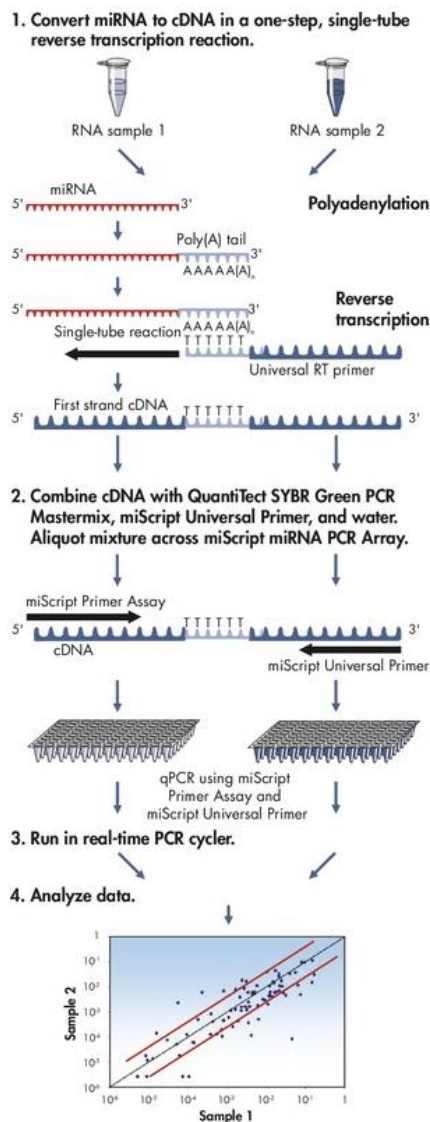
A miRNS PCR array felépítése a 7. Ábrán látható. A 12x8 soros platen az A-G sorokban helyezkednek el az értett miRNS specifikus forward primerek (miScript Primer Assays), a H sorban pedig az adatok normalizáláshoz szükséges próbák és egyéb kontrollok:

- Ce (*C. elegans* miR-39 miScript Primer Assay): szintetikus miRNS kontroll alternatív adat normalizációhoz
- SN1-6 (snoRNA/snRNA miScript PCR Controls): az adatok normalizálásához használt kontrollok a relatív kvantifikáció során ($\Delta\Delta C_T$ módszer)
- miRTC (miRNA Reverse Transcription Control): A cDNS szintézis hatékonyságának mérésére szolgáló kontroll
- PPC (Positive PCR Control): A PCR reakció hatékonyságának mérésére szolgáló kontroll

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	let-7a-5p	let-7b-5p	let-7c-5p	let-7d-5p	let-7e-5p	let-7f-5p	miR-1	miR-100-5p	miR-103a-3p	miR-107	miR-10b-5p	miR-122-5p
B	miR-124-3p	miR-125a-5p	miR-125b-5p	miR-126-3p	miR-130a-3p	miR-133a-3p	miR-133b	miR-140-5p	miR-142-3p	miR-143-3p	miR-144-3p	miR-145-5p
C	miR-146a-5p	miR-149-5p	miR-150-5p	miR-155-5p	miR-15b-5p	miR-16-5p	miR-17-5p	miR-181a-5p	miR-181b-5p	miR-182-5p	miR-183-5p	miR-185-5p
D	miR-18b-5p	miR-195-5p	miR-199a-5p	miR-206	miR-208a-3p	miR-208b-3p	miR-21-5p	miR-210-3p	miR-214-3p	miR-22-3p	miR-221-3p	miR-222-3p
E	miR-223-3p	miR-224-5p	miR-23a-3p	miR-23b-3p	miR-24-3p	miR-25-3p	miR-26a-5p	miR-26b-5p	miR-27a-3p	miR-27b-3p	miR-29a-3p	miR-29b-3p
F	miR-29c-3p	miR-302a-3p	miR-302b-3p	miR-30a-5p	miR-30c-5p	miR-30d-5p	miR-30e-5p	miR-31-5p	miR-320a	miR-328-3p	miR-342-3p	miR-365a-3p
G	miR-378a-3p	miR-423-3p	miR-424-5p	miR-451a	miR-486-5p	miR-494-3p	miR-499a-5p	miR-7-5p	miR-92a-3p	miR-93-5p	miR-98-5p	miR-99a-5p
H	cel-miR-39-3p	cel-miR-39-3p	SNOR D61	SNOR D68	SNOR D72	SNOR D95	SNOR D96A	RNU6-2	miRTC	miRTC	PPC	PPC

7. Ábra. miScript miRNS PCR Array felépítése, miScript Primer Assay-k

A miRNS PCR Array kvantitatív RT-PCR rendszeren alapszik, ami az érett miRNS-ek specifikus és szenzitív kimutatását teszi lehetővé. A vizsgálat lépései összefoglalóan alábbi ábrán láthatóak:



8. Ábra. miRNS PCR Array analízis lépései (Qiagen protokoll)

- **miRNS pool-ok elkészítése**

A különböző szív- és kromoszóma-rendellenességeknek megfelelően 5 beteg és 2 korosztály szerint megkülönböztetett, normál mintákból összeállított miRNS pool-t készítettünk (5. Táblázat). Az egyes mintákból 2 µl-t kevertünk össze, a pool-ok összterfogata 12 µl volt. Amelyik csoportból nem állt rendelkezésre 6 db minta, azt RNáz-mentes vízzel egészítettük ki a következő módon:

- I. 21-es triszómia: 6x2µl miRNS
- II. 18-as triszómia: 3x2µl miRNS + 6µl H₂O
- III. VSD: 6x2µl miRNS
- IV. HLHS: 5x2µl miRNS + 2µl H₂O
- V. TOF: 2x2µl miRNS + 8µl H₂O
- VI. Normál_30-35: 6x2µl miRNS
- VII. Normál_36-42: 6x2µl miRNS

Minta			Terhesség adatai		össz-miRNS koncentráció
Pool	Típus	Szám	Echokardiográfia	Citogenetika	
1	beteg	5	AVSD	21-es triszómia	4,45 ng/µl
1	beteg	70	NI	21-es triszómia	2,05 ng/µl
1	beteg	24	HLHS	21-es triszómia	5,35 ng/µl
1	beteg	17	HLHS	21-es triszómia	8,35 ng/µl
1	beteg	47	NI	21-es triszómia	2,20 ng/µl
1	beteg	46	NI	21-es triszómia	3,10 ng/µl
2	beteg	18	VSD	18-as triszómia	5,85 ng/µl
2	beteg	65	NI	18-as triszómia	2,60 ng/µl
2	beteg	69	NI	18-as triszómia	1,75 ng/µl
3	beteg	1	VSD	N	2,45 ng/µl
3	beteg	10	VSD	N	3,00 ng/µl
3	beteg	19	VSD	N	5,75 ng/µl
3	beteg	74	VSD	N	2,65 ng/µl
3	beteg	23	VSD	N	5,90 ng/µl
3	beteg	77	VSD	N	4,90 ng/µl
4	beteg	2	HLHS	N	6,50 ng/µl
4	beteg	9	HLHS	N	3,60 ng/µl
4	beteg	13	HLHS	N	2,90 ng/µl
4	beteg	15	HLHS	N	6,65 ng/µl
4	beteg	3	HLHS	N	10,60 ng/µl
5	beteg	20	TOF	N	4,50 ng/µl
5	beteg	12	TOF	N	3,50 ng/µl
6	kontroll	27	N	N	4,10 ng/µl
6	kontroll	31	N	N	4,00 ng/µl
6	kontroll	50	N	N	3,60 ng/µl
6	kontroll	62	N	N	4,10 ng/µl
6	kontroll	43	N	N	4,85 ng/µl
6	kontroll	59	N	N	2,65 ng/µl
7	kontroll	34	N	N	4,45 ng/µl
7	kontroll	52	N	N	3,35 ng/µl
7	kontroll	63	N	N	3,65 ng/µl
7	kontroll	28	N	N	4,25 ng/µl
7	kontroll	68	N	N	2,00 ng/µl
7	kontroll	41	N	N	3,40 ng/µl

5. Táblázat. miRNS pool-ok felosztása és össz-miRNS koncentrációk

- **cDNS szintézis**

A szintézist a *miScript® II RT Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) segítségével végeztük el, a gyártó leírásának megfelelően. A kit tartalmát ld. az 5.2.4.1 pontban.

A cDNS szintézis lépései:

1. Reverz transzkripció master mix összeállítása

Összemérjük a cDNS szintézishez szükséges komponenseket az alábbi módon (a mennyiség egy mintára értendőek):

4 µl 5x miScript HiSpec Buffer

2 µl 10x miScript Nucleics Mix

10 µl RNáz-mentes víz

2µl miScript Reverse Transcriptase Mix

18 µl Reverz transzkripció master mix

2. Templát hozzáadása

A mixhez 2 µl templát miRNS-t adunk, amivel elérjük a 20µl-es végtérfogatot.

3. Futtatás

A futtatást a *Techne TC-412* thermocyclerrel (*Bibby Scientific Limited, Stone, UK*) hajtjuk végre: a mintát először 60 percre, 37°C-on, majd 5 percre, 95°C-on inkubáljuk.

4. Hígítás

A reakció termékeként kapott mintákat 1:10 arányban felhígítjuk: 20µl cDNS-hez 200µl RNáz-mentes vizet adunk, majd finoman összekeverjük. A további feldolgozásig -20°C-on tároljuk.

• **RT-PCR**

A PCR reakciók elvégzéséhez *miScript® SYBR Green PCR Kítet* (*Qiagen GmbH, Hilden, Németország*) használtunk a gyártó leírásának megfelelően.

A kit tartalma (a gyártó elnevezése szerint):

- 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix: 3×1.7 ml
 - HotStarTaq® DNA Polymerase
 - QuantiTect SYBR Green PCR Buffer
 - dNTP mix
 - SYBR Green I
 - ROX™ passive reference dye
 - 5mM MgCl₂
- 10x miScript Universal Primer: 1 ml
- RNase-free H₂O: 2×2 ml
- 96-well plate containing dried assays
- Optical Thin-Wall 8-Cap Strips (12 per plate)

A RT-PCR reakció lépései:

1. Reakció mix összeállítása

Összemérjük a RT-PCR elvégzéséhez szükséges komponenseket az alábbi módon:

2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix: 1375µl

10x miScript Universal Primer: 275µl

RNáz-mentes víz: 1000µl

Templát cDNS: 100µl

Végtérfogat: 2750µl

2. PCR mix bemérése a miRNS PCR Array-be

Előkészítjük a miRNS PCR Array-t és a PCR mixből 25µl-t pipetázunk a plate minden lyukába (8×12).

3. miRNS PCR Array lezárása

12 db vékonyfalú optikai lemezzel lefedjük a plate oszlopait (×8), majd 1000×g-on 1 percig centrifugáljuk.

4. Futtatás

A RT-PCR reakciókat *BIO-RAD CFX384* típusú berendezéssel (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA*) hajtottuk végre, az alábbi beállításokkal:

Aktivációs lépés: 15 perc, 95°C

Denaturáció: 15 mp, 94°C

Anellálás: 30 mp, 55°C

Extenzió: 30 mp, 70°C

} ×40

• **Kiértékelés**

A RT-PCR reakciókat a *BIO-RAD CFX Manager*® szoftverrel dolgoztuk fel. Az egyes pool-ok analízise után készítettünk egy összefoglaló Excel táblázatot (*Microsoft, Seattle, USA*), amiben a miRNS-ekhez tartozó Ct (detekciós ciklus) értékek szerepeltek. A kapott adatok összehasonlítását a miRNS PCR Array kitet szolgáltató cég online kiértékelő eszközével végeztük el (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/mirna/arrayanalysis.php>). A triszómiás minták esetében kontrollként a 36-42 éves normál korosztályt, az egyéb szívfejlődési rendellenesség esetében a 30-35 éves korosztályt állítottuk be kontroll csoportként. A relatív kvantifikációhoz az alapbeállítást alkalmaztuk (összes referencia RNS-hez való viszonyítás).

Eredményként megkaptuk, hogy az egyes mintákban mely miRNS-ek mutatnak fokozott vagy csökkent expressziót a normál mintákhoz képest. Ezt összevetettük a különböző szív- és érrendszeri megbetegedésekben megfigyelt változásokkal, majd ez alapján kiválasztottuk jelentősebb miRNS-eket.

5.2.6 Bioinformatikai analízis

A vizsgálat befejező részeként bioinformatikai adatbázisok és miRNS-target predikciós programok segítségével elemeztük a kapott eredményeket. Megvizsgáltuk, hogy a szívfejlődési rendellenességekben és a kardiovaszkuláris megbetegedésekben egyaránt aberráns expressziót mutató miRNS-ek milyen hatással bírhatnak a szívfejlődés folyamatára.

Az Uniprot internetes adatbázis (<http://www.uniprot.org/>) felhasználásával olyan fehérje kódoló géneket kerestünk, melyek részt vesznek a szívfejlődés szabályozásában. A szívfejlődés gén ontológiai (GO) kódja: 0007507. A keresésnél a következő kritériumokat adtuk meg: „go_id:0007507 AND organism:”Homo sapiens (Human) [9606]” AND reviewed:yes”. A kapott géneket a miRWalk webszerverrel (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk>) vizsgáltuk tovább, amely több miRNS-target predikciós programot kombinál. Mi ezek közül a Diana-microT, miRanda és Tarbase eszközöket alkalmaztuk, amelyek különféle paramétereket vesznek figyelembe a predikció kiszámításánál (seed régió komplementaritás, konzerváltság stb.). A miRTarBase adatbázis segítségével meghatároztuk (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>), hogy a prediktált miRNS-mRNS interakciókat validálták-e valamilyen kísérleti módszerrel (microarray, RT-PCR stb.). Az utolsó lépésben megvizsgáltuk, hogy a prediktált target gének közül volt-e olyan, aminek a mutációját összefüggésbe hozták szívfejlődési rendellenességgel. Erre a célra a CHDWiki adatbázist alkalmaztuk forrásként (<http://homes.esat.kuleuven.be/~bioiuser/chdwiki>).

A bioinformatikai analízis alapján megtudtuk, hogy a PCR Array reakciók alapján szignifikánsnak ítélt miRNS-ek milyen szabályozó szereppel bírnak a szívfejlődésben, és hogy megváltozott expressziójuk vezethet-e valamilyen úton veleszületett szívhiba kialakulásához.

5.2.7 Statisztika

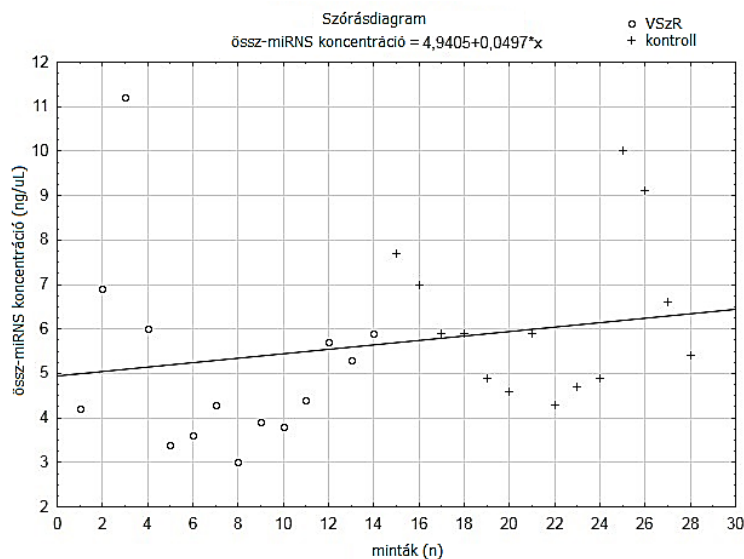
A statisztikai elemzéseket a STATISTICA (StatSoft Inc., Tulsa, USA) szoftverrel végeztük el. Az eredményeket átlag±szórás formában adtuk meg, esetenként megjelenítettük a medián, minimum, maximum és percentilis értékeket is. A csoportok közötti eltérések statisztikai szignifikanciáját a Student-féle t-próbával számoltuk ki, szignifikáns különbségnek a $p < 0,05$ értéket vettük. Korreláció-számítást végeztünk annak a megvizsgálására, hogy van-e összefüggés az egyes anyai illetve terhességi paraméterek és a *let-7c* miRNS expressziós mintázata között. Ha az r (korrelációs koefficiens)=0-0,25, akkor nem volt kapcsolat, ha $r=0,25-0,50$, akkor gyenge kapcsolat volt, ha $r=0,50-0,75$, akkor erős kapcsolat volt, ha $r=0,75-1,00$, akkor a kapcsolat nagyon erős volt a változók között.

6 EREDMÉNYEK

6.1 Össz-miRNS koncentráció

A spektroszkópai mérések alapján elmondható, hogy minden anyai plazma és magzati szívsvövet mintából sikeres volt a miRNS extrakció. A kapott miRNS minták alkalmasak voltak a további vizsgálatok elvégzéséhez.

Nem mutatkozott szignifikáns különbség a két csoport plazma mintáiban mért össz-miRNS-koncentrációkban: a kontroll mintákban átlagosan $6,36 \pm 2,11$ ng/μl, a betegekben pedig $5,11 \pm 2,10$ ng/μl volt a koncentráció ($p=0,23$) (9. Ábra).



9. Ábra. Az anyai plazma mintákban mért össz-miRNS koncentrációk. 1-14: beteg, 15-28: kontroll

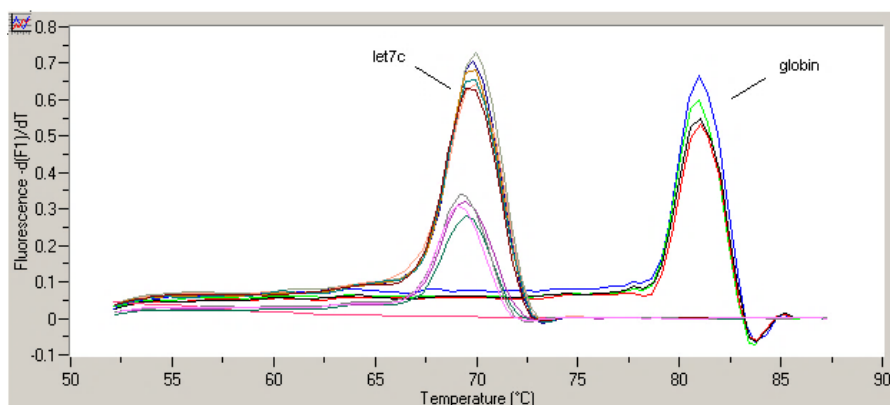
A várakozásoknak megfelelően, a szív mintákban mért össz-miRNS koncentráció magasabb volt, mint a plazma minták esetében. Az egyes csoportokhoz tartozó szövetminták tekintetében nem volt lényeges különbség: a kontroll mintákban átlagosan $19,35 \pm 1,34$ ng/μl, a betegekben pedig $17,09 \pm 9,45$ ng/μl volt a koncentráció ($p=0,98$).

6.2 A *let-7c* miRNS expressziós vizsgálat eredményei

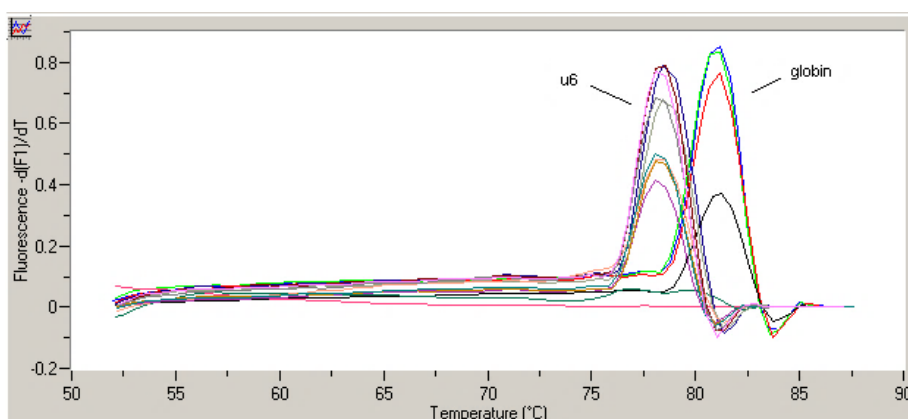
6.2.1 A *let-7c* expressziója anyai plazma mintákban

A miRNS expressziós vizsgálatok elvégzéséhez optimalizáltuk a RT-PCR reakciót. A módszer segítségével hatékonyan detektáltuk az *u6* snRNS-t és a *let-7c* miRNS-t anyai plazmában (10., 11. Ábra). Eredményként azt kaptuk, hogy a *let-7c* miRNS expressziója lényegesen megnőtt a kóros esetekben: a kontroll csoportban alig volt kimutatható, mintegy $0,017 \pm 0,023$ ng/μl volt a koncentrációja, míg a beteg mintákban ennek sokszorosát, $2,81 \pm 3,70$ ng/μl-t mértük ($p < 0,05$) (12. Ábra). Ez nagyon magas, 163,96-szoros expressziós szint-növekedésnek (FC, fold-change) felel meg.

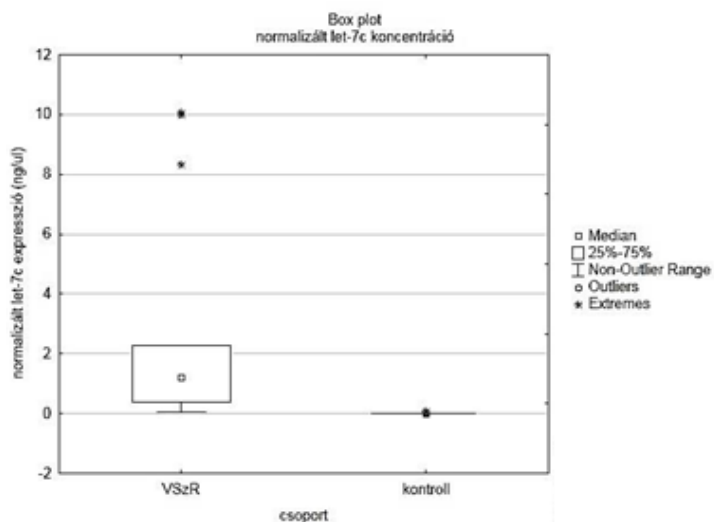
Nem találtunk korrelációt az anyák BMI indexe és a *let-7c* miRNS expressziós szintje között ($r=0,038$). A beteg csoportban, a terhességi kor és a miRNS koncentrációja között gyenge kapcsolatot véltünk felfedezni ($r=0,35$). Szintén a beteg csoportban gyenge összefüggést találtunk az anyák életkora és a miRNS kifejeződési mintázata között ($r=0,28$).



10. Ábra. A globin kalibrátor gén és a vizsgált *let-7c* miRNS olvadási görbéi.



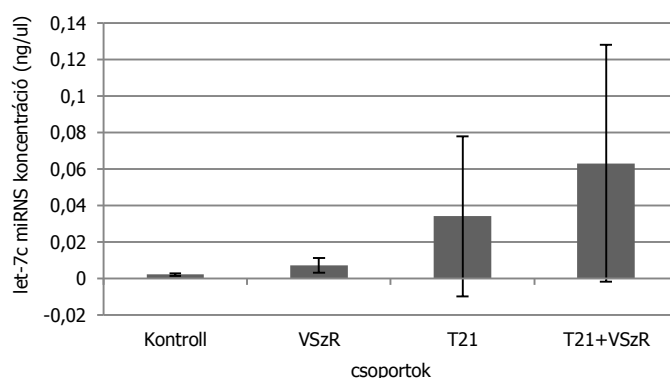
11. Ábra. A globin kalibrátor gén és az *u6* kontroll snRNS olvadási görbéi.



12. Ábra. A beteg és kontroll csoportban mért *let-7c* miRNS koncentrációk medián értékei

6.2.2 A *let-7c* expressziója magzati szívszövet mintákban

A magzati szívszövet mintákon végzett RT-PCR vizsgálatok során a *let-7c* miRNS fokozottan expresszáldott a kóros esetekben: a kontroll csoportban átlagosan $0,0021 \pm 0,00075$ ng/μl, a beteg csoportban pedig $0,031 \pm 0,041$ ng/μl koncentrációt mértünk. Ez 14,76-szoros expresszió növekedésnek felel meg. Az egyes alcsoportokon belül a *let-7c* eltérő mértékben fejeződött ki: a szívfejlődési rendellenességet mutató esetekben $0,0072 \pm 0,0042$ ng/μl (FC: 3,44); a 21-es triszómiás, de a szívüket tekintve patológiás elváltozást nem mutató magzatok esetében $0,034 \pm 0,044$ ng/μl (FC: 16,29) volt a koncentráció. A legmagasabb értéket a szívfejlődési rendellenességgel szövődött 21-es triszómiák esetében mértünk, $0,063 \pm 0,065$ ng/μl (FC: 30,19) (13. Ábra).



13. Ábra. A *let-7c* miRNS átlagos koncentrációja és szórása a kontroll (2 eset) és a kóros magzati szívszövet mintákban (3+2+2 eset).

6.3 A miRNS PCR Array eredményei

A miRNS PCR Array eredményeként megkaptuk, hogy az egyes betegcsoportokban mely miRNS-ek mutatnak fokozott- vagy csökkent expressziót az életkor szerint illesztett normál csoportokhoz képest. Egy miRNS downreguláltnak tekinthető, hogyha a kontroll mintához viszonyított expressziós szintje (FC érték) 0,5 érték alatt van, tehát koncentrációja legfeljebb fele akkora; upregulációt abban az esetben állapítunk meg, hogyha ugyanez az érték meghaladja a 2-t, tehát legalább kétszer akkora mennyiségben található meg a kóros mintákban. A megfigyelt változások összesítve a 6. Táblázatban láthatóak.

PCR Array	Kórkép				miRNS pool-ok					
miRNA neve	MI	CH	CM	DD	T21	T18	VSD	HLHS	TOF	Σ
hsa-let-7a-5p				Up	3,78	0,67	1,32	1,26	2,50	-
hsa-let-7b-5p		Up		Up	2,13	0,31	0,83	1,09	0,98	-
hsa-let-7c-5p		Up	Up	Up	5,65	0,78	1,89	3,23	14,64	Up
hsa-let-7d-5p				Up	2,13	0,64	3,54	1,36	1,99	-
hsa-let-7e-5p	Up				1,94	0,31	3,67	2,83	15,80	Up
hsa-let-7f-5p				Up	1,98	0,38	1,11	0,99	2,47	-
hsa-miR-1	Down	Down	Down	Up	1,47	0,23	0,35	0,99	0,80	-
hsa-miR-100-5p			Up		7,77	2,15	0,95	0,78	3,34	Up
hsa-miR-103a-3p		Up	Up		2,46	1,73	2,15	0,35	1,31	-
hsa-miR-107	Down				0,02	0,01	0,89	0,99	1,13	-
hsa-miR-10b-5p			Up		1,47	0,23	0,35	0,99	0,80	-
hsa-miR-122-5p	Up				0,67	0,08	1,63	7,57	3,82	-
hsa-miR-124-3p				Down	6,45	0,17	0,53	0,61	14,54	-
hsa-miR-125a-5p			Down		4,05	0,84	2,26	0,19	1,17	-
hsa-miR-125b-5p			Up	Down	1,67	0,67	2,14	0,51	1,13	-
hsa-miR-126-3p		Down			1,84	0,99	2,26	0,12	0,59	-
hsa-miR-130a-3p	Down				1,03	0,56	1,14	0,07	0,30	-
hsa-miR-133a-3p		Down	Down	Up	1,47	0,23	0,35	0,99	7,74	-
hsa-miR-133b	Up	Down	Down		1,47	0,23	0,35	0,99	0,80	-
hsa-miR-140-5p		Up	Up		1,23	4,49	6,00	0,99	1,04	-
hsa-miR-142-3p		Up			7,51	6,90	2,94	0,04	0,92	Up
hsa-miR-143-3p	Down		Down	Up	14,40	24,70	8,25	0,99	2,48	Up
hsa-miR-144-3p				Up	12,98	4,43	1,37	0,78	1,14	-
hsa-miR-145-5p	Up		Up	Up	22,92	32,82	7,49	0,11	1,20	Up
hsa-miR-146a-5p	Up	Up	Up		0,83	0,50	4,98	0,21	0,48	Down
hsa-miR-149-5p		Down			1,47	0,23	0,35	0,99	0,80	-
hsa-miR-150-5p		Down			2,19	2,01	4,48	0,05	0,47	-
hsa-miR-155-5p	Down				1,47	0,23	0,72	0,99	4,35	-
hsa-miR-15b-5p	Up				2,25	0,72	3,38	0,09	0,49	-
hsa-miR-16-5p	Down				5,13	1,73	0,64	0,02	0,36	-
hsa-miR-17-5p				Up	3,55	1,24	2,69	0,10	0,82	-
hsa-miR-181a-5p				Up	0,78	0,87	1,14	0,46	2,22	-
hsa-miR-181b-5p		Down	Up		1,44	2,69	6,26	0,49	5,86	Up
hsa-miR-182-5p		Reg			2,95	0,56	0,35	0,99	0,80	-
hsa-miR-183-5p				Down	0,71	0,21	0,35	0,99	0,80	-
hsa-miR-185-5p		Down			3,18	1,74	1,29	0,18	0,42	-
hsa-miR-18b-5p		Up			1,47	0,23	0,35	0,99	2,03	-
hsa-miR-195-5p	Down	Up	Up		9,44	2,44	1,02	0,05	1,02	-
hsa-miR-199a-5p		Up			4,00	3,60	3,57	0,66	0,85	Up
hsa-miR-206				Up	1,47	0,23	0,35	0,99	0,80	-
hsa-miR-208a-3p	Up	Up	Up	Up	1,47	0,23	0,35	0,99	0,80	-
hsa-miR-208b-3p	Up	Up	Up		1,47	0,23	0,35	0,99	0,80	-
hsa-miR-21-5p	Down	Up	Up	Up	1,66	0,61	2,76	0,02	2,10	-
hsa-miR-210-3p			Up		1,55	0,98	0,84	0,99	7,95	-
hsa-miR-214-3p	Down	Up	Up		1,47	0,46	0,35	0,99	0,80	-
hsa-miR-22-3p	Down				3,75	3,65	2,67	0,05	1,07	Up
hsa-miR-221-3p		Up	Up		1,80	2,11	6,34	0,28	1,67	-
hsa-miR-222-3p		Up	Up		1,12	0,78	4,36	0,17	1,02	-
hsa-miR-223-3p	Up	Up			3,75	0,00	8,60	0,05	0,40	-
hsa-miR-224-5p		Up			3,13	0,93	1,99	0,99	1,58	-
hsa-miR-23a-3p		Up	Up		1,15	1,05	2,96	0,21	0,48	-
hsa-miR-23b-3p		Up			2,58	1,24	2,26	0,22	0,28	-
hsa-miR-24-3p	Down	Up		Up	4,28	3,99	5,48	0,15	1,46	Up
hsa-miR-25-3p		Up			3,41	0,64	0,96	0,07	0,41	-
hsa-miR-26a-5p	Down			Up	1,93	0,48	2,20	0,22	0,70	-
hsa-miR-26b-5p	Down				2,62	0,62	1,44	0,52	1,76	-
hsa-miR-27a-3p		Up		Up	2,53	5,57	17,45	0,06	1,76	Up
hsa-miR-27b-3p		Up		Up	3,81	3,70	4,52	0,24	1,35	Up

6. Táblázat (I. rész): miRNS PCR Array eredményei. Jelölések: kék: downregulált miRNS-ek, piros: upregulált miRNS-ek, szürke: placentában nem expresszálódó miRNS-ek. MI: Myocardialis infarktus, CH: Cardialis Hypertrophia, CM: Cardialis Myopathia, DD: Fejlődés&Differenciáció.

hsa-miR-29a-3p		Down			7,83	16,41	22,55	0,71	2,83	Up
hsa-miR-29b-3p		Down	Down		2,43	0,92	2,21	0,18	0,62	-
hsa-miR-29c-3p		Down			5,81	8,15	5,41	0,07	0,87	Up
hsa-miR-302a-3p				Down	1,47	0,23	0,35	0,99	3,16	-
hsa-miR-302b-3p				Down	1,47	0,23	0,35	0,99	0,80	-
hsa-miR-30a-5p				Up	1,80	1,11	1,69	0,02	1,38	-
hsa-miR-30c-5p				Up	1,57	0,86	1,76	0,06	0,61	-
hsa-miR-30d-5p				Up	6,01	1,82	1,28	0,06	3,08	-
hsa-miR-30e-5p		Down			1,93	1,36	1,64	0,07	0,71	-
hsa-miR-31-5p		Up			1,47	0,23	0,35	0,99	7,47	-
hsa-miR-320a	Up				0,71	0,20	0,95	0,46	0,22	Down
hsa-miR-328-3p			Up		0,53	0,38	0,53	1,51	14,84	-
hsa-miR-342-3p			Up		0,15	0,21	3,15	0,37	5,62	-
hsa-miR-365b-3p			Down		6,86	3,96	8,91	0,91	0,74	Up
hsa-miR-378a-3p			Down	Up	1,10	0,93	2,58	0,13	0,51	-
hsa-miR-423-3p			Up		2,49	6,31	3,49	0,14	2,48	Up
hsa-miR-424-5p		Up			4,46	6,09	4,39	0,04	0,19	-
hsa-miR-451a		Down			6,54	2,31	1,81	0,08	0,54	-
hsa-miR-486-5p		Down			1,61	0,25	0,23	0,06	0,19	Down
hsa-miR-494-3p	Down				3,94	1,45	0,71	0,99	1,71	-
hsa-miR-499a-5p	Up		Up		0,01	0,00	0,35	0,99	0,80	Down
hsa-miR-7-5p			Down		4,14	0,41	1,17	0,59	2,52	-
hsa-miR-92a-3p			Down		2,99	0,60	0,61	0,07	0,60	-
hsa-miR-93-5p		Down		Up	10,77	5,57	3,59	0,13	0,95	Up
hsa-miR-98-5p				Up	1,47	0,13	0,82	1,14	0,80	-
hsa-miR-99a-5p				Up	0,52	0,74	1,32	0,99	1,14	-

6. Táblázat folytatás

A miRNS-eket a kóros mintákban mutatott megváltozott expressziójuk és a kardiovaszkuláris megbetegedésekben megfigyelt változások alapján különböző szignifikancia-szintű csoportokba soroltuk be:

Upregulált miRNS-ek:

I. Legalább 3 betegcsoportban upregulálódott, ebből 2 legalább non-szindrómikus forma; egy betegcsoportban sem downregulálódott; továbbá a szív-és érrendszeri kórképekben is overexpressziót mutat: *hsa-let-7c-5p*.

II.a. Legalább 3 betegcsoportban upregulálódott, ebből 2 legalább non-szindrómikus forma; továbbá a szív-és érrendszeri kórképekben is overexpressziót mutat: *hsa-let-7e-5p*, *hsa-miR-423-3p*.

II.b. Legalább 3 betegcsoportban upregulálódott; egy betegcsoportban sem downregulálódott; továbbá a szív-és érrendszeri kórképekben is overexpressziót mutat: *hsa-miR-100-5p*, *hsa-miR-199a-5p*.

II.c. Legalább 3 betegcsoportban upregulálódott, ebből 2 legalább non-szindrómikus forma; egy betegcsoportban sem downregulálódott; a szív-és érrendszeri kórképekben változatos expressziót mutat: *hsa-miR-143-3p*, *hsa-miR.29a*.

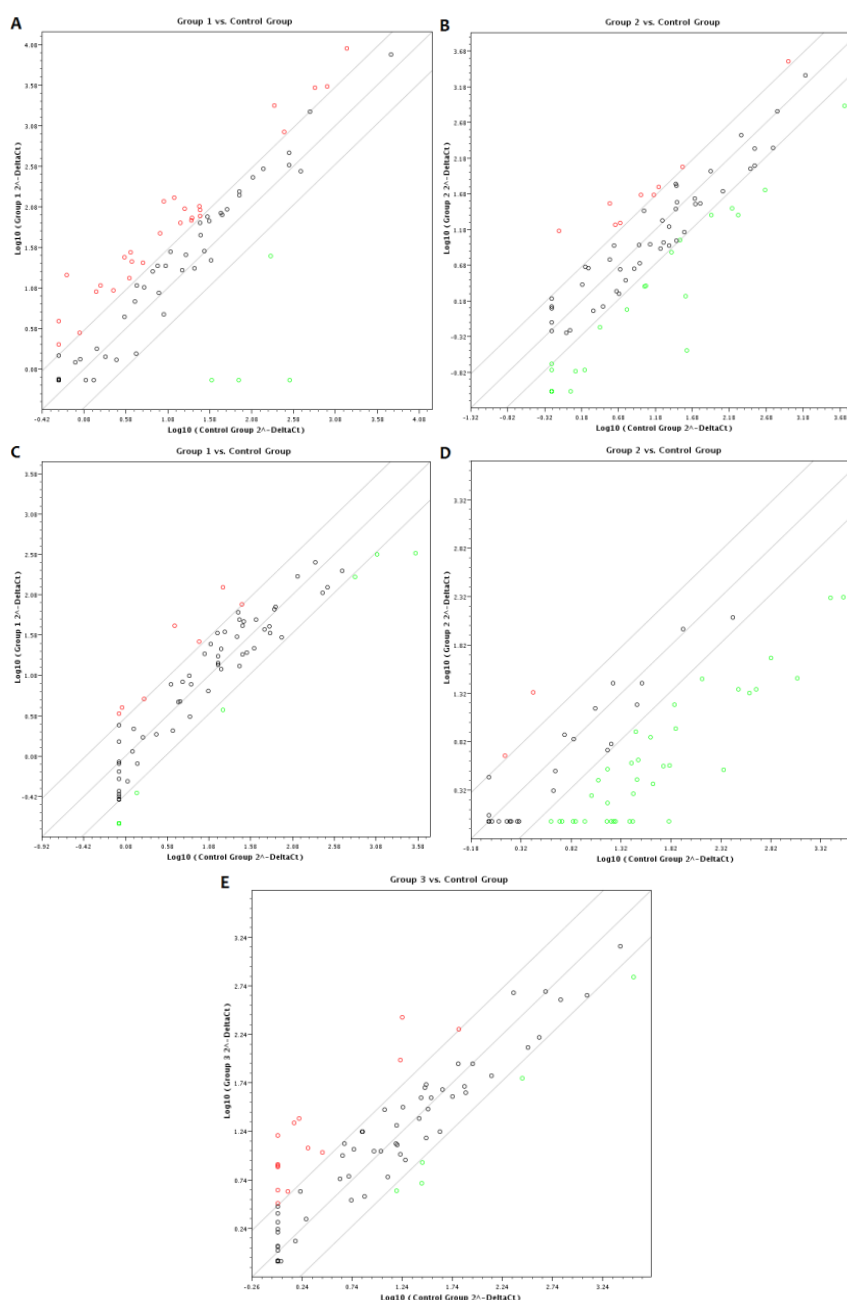
III. Legalább 3 betegcsoportban upregulálódott és maximum egy betegcsoportban downregulálódott: *hsa-miR-142-3p*, *hsa-miR-145-3p*, *hsa-miR-181b-5p*, *hsa-miR-22-3p*, *hsa-miR-24-3p*, *hsa-miR-27a-3p*, *hsa-miR-27b-3p*, *hsa-miR-29c-3p*, *hsa-miR-365b-3p*, *hsa-miR-93-5p*.

Downregulált miRNS-ek:

I. Legalább 3 betegcsoportban downregulálódott, ebből 2 legalább non-szindrómikus forma; egy betegcsoportban sem upregulálódott; továbbá a szív-és érrendszeri kórképekben is underexpressziót mutat: *hsa-miR-486-5p*.

II. Legalább 3 betegcsoportban downregulálódott, ebből 2 legalább non-szindrómikus forma; egy betegcsoportban sem upregulálódott; a szív-és érrendszeri kórképekben változatos expressziót mutat: *hsa-miR-320a*.

III. Legalább 3 betegcsoportban downregulálódott és maximum egy betegcsoportban upregulálódott: *hsa-miR-146a*.



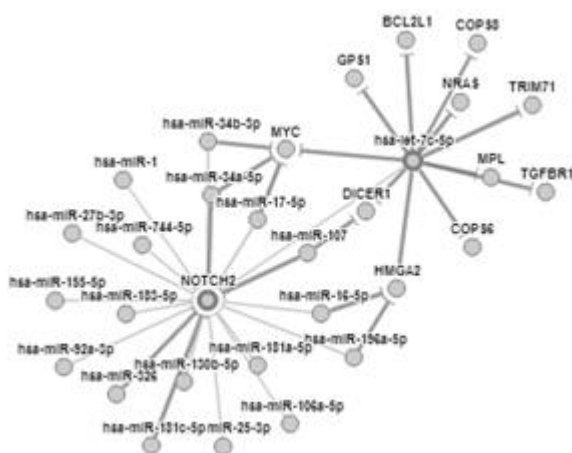
14. Ábra. Szórásdiagramok. jelölések: A: 21-es triszómia, B: 18-as triszóma, C: VSD, D: HLHS, E: TOF; zöld: dowregulált miRNS-ek, piros: upregulált miRNS-ek, fekete: egyéb miRNS-ek

6.3.1 A bioinformatikai analízis eredményei

Az Uniprot adatbázisban 407 olyan humán eredetű, fehérje kódoló gént találtunk, amely a szívfejlődés folyamatához kapcsolható. A miRNS PCR Array analízis eredményeként azt kaptuk, hogy a beteg mintákban és a kardiovaszkuláris kórképekben általánosan upregulálódott miRNS-ek a *let-7c*, *let-7e*, *miR-100*, *miR-199a* és *miR-423*; downregulálódott miRNS a *miR-486* volt. Az analízis további részében ezeket a miRNS-eket elemeztük.

- *hsa-let-7c-5p*

A miRWalk webszerver alkalmazásával azt az eredményt kaptuk, hogy a 407 gén által kódolt mRNS szekvenciák közül 98 a *hsa-let-7c* miRNS lehetséges célpontja (legalább egy predikciós program által megjósolt interakció alapján). 44-et ezek közül mind a három felhasznált predikciós program potenciális célpontként határozott meg (Mellékletek, 1. Táblázat). A 44 találat közül 4-et validáltak kísérleti módszerekkel: *DICER1* (Western blot [33]), *TGFBR1* (Western blot, reporter assay, RT-PCR [34]), *NOTCH2* (NGS [35], 15. Ábra) és *TAZ* (NGS [35]); 6 gén mutációja szívfejlődési rendellenességhez vezetett: *ACVR2B* (non-szindrómikus VSzR [36]), *CHD7* (CHARGE szindróma [37]), *HAND2* (non-szindrómikus VSZR [38]), *NOTCH2* (Alagille szindróma [39]), *SH3PXD2B* (Frank-Ter Haar szindróma [40]) és *TBX5* (Holt-Oram szindróma [41]).



15. Ábra. hsa-let-7c - NOTCH2 interakció (forrás: miRTarbase)

- *hsa-let-7e-5p*

A miRWalk webszerver alkalmazásával azt az eredményt kaptuk, hogy a 407 gén által kódolt mRNS szekvenciák közül 119 a *hsa-let-7e* miRNS lehetséges célpontja (legalább egy predikciós program által megjósolt interakció alapján). 46-ot ezek közül mind a három felhasznált predikciós program potenciális célpontként határozott meg (Mellékletek, 2. Táblázat). A 46 találat közül 2-t validáltak kísérleti módszerekkel: *CHD7* (NGS [35]) és *PAX3* (NGS [35]). 5 gén mutációja szívfejlődési rendellenességhez vezetett: *ACVR2B* (non-szindromikus VSzR [36]), *CHD7* (CHARGE szindróma [37]), *HAND2* (non-szindromikus

VSzR [38]), *NOTCH2* (Alagille szindróma [39]) és *SH3PXD2B* (Frank-Ter Haar szindróma [40]).

- *hsa-miR-423-3p*

A miRWalk webszerver alkalmazásával azt az eredményt kaptuk, hogy a 407 gén által kódolt mRNS szekvenciák közül 60 a *hsa-miR-423-3p* miRNS lehetséges célpontja (legalább egy predikciós program által megjósolt interakció alapján). 12-t ezek közül mind a három felhasznált predikciós program potenciális célpontként határozott meg (Mellékletek, 3. Táblázat). A 12 találat közül egyet sem validáltak kísérleti módszerekkel, és csupán 1 gén mutációja vezetett szívfejlődési rendellenességhez: *ACVR2B* (non-szindromikus VSzR [31]).

- *hsa-miR-100*

A miRWalk webszerver alkalmazásával azt az eredményt kaptuk, hogy a 407 gén által kódolt mRNS szekvenciák közül 21 a *hsa-miR-100* miRNS lehetséges célpontja (legalább egy predikciós program által megjósolt interakció alapján). Ezek közül a *NEBL* gént mind a három felhasznált predikciós program potenciális célpontként határozta meg. A miRNS-mRNS interakciót nem validálták kísérletes eszközökkel, és nem hozták összefüggésbe szívfejlődési rendellenességgel

- *hsa-miR-199a-5p*

A miRWalk webszerver alkalmazásával azt az eredményt kaptuk, hogy a 407 gén által kódolt mRNS szekvenciák közül 164 a *hsa-miR-199a-5p* miRNS lehetséges célpontja (legalább egy predikciós program által megjósolt interakció alapján). 45-öt ezek közül mind a három felhasznált predikciós program potenciális célpontként határozott meg (Mellékletek, 4. Táblázat). A 45 találat közül 2-t validáltak kísérleti módszerekkel: *ERBB2* (Western blot [42]) és *HIF1A* (Riporter assay, Western blot, RT-PCR [43]). 5 gén mutációja szívfejlődési rendellenességhez vezetett: *ACVR2B* (non-szindromikus VSzR [36]), *JAG1* (Alagille szindróma [44]), *PTPN11* (Nooan szindróma [45]), *NOTCH2* (Alagille szindróma [39]) és *STRA6* (PDAC szindróma [46]).

- *hsa-miR-486-5p*

A miRWalk webszerver alkalmazásával azt az eredményt kaptuk, hogy a 407 gén által kódolt mRNS szekvenciák közül 107 a *hsa-miR-486-5p* miRNS lehetséges célpontja (legalább egy predikciós program által megjósolt interakció alapján). 40-et ezek közül mind a három felhasznált predikciós program potenciális célpontként határozott meg (Mellékletek, 5. Táblázat). A 40 találat közül egyet sem validáltak kísérleti módszerekkel. 4 gén mutációja szívfejlődési rendellenességhez vezetett: *ACVR2B* (non-szindromikus VSzR [36]), *FBN1* (Marfan szindróma [47]), *NF1* (Neurofibromatosis [48]) és *NOTCH2* (Alagille szindróma [39]).

7 ÉRTÉKELÉS

A humán keringésben fellelhető szabad miRNS-ek szintje relatíve állandó, különböző egyének között konzisztens és stabilitásukat szélsőséges körülmények között is megőrzi. Ezen tulajdonságainak köszönhetően, a keringő miRNS-ek potenciális biomarkerként szolgálhatnak különböző kórképek kimutatására. Számos olyan miRNS ismert, melyeknek a megváltozott expressziója szív- és érrendszeri betegségek jelenlétére utal. Például a *miR-1* plazmában mért koncentrációja szignifikánsan emelkedik akut myocardialis infarctus (AMI) esetében [49]; artéria-koronária betegségben (CAD) pedig a *miR-126* és *miR-17~92a* miRNS-ek szintjének lényeges csökkenését figyelték meg [50].

Azok a miRNS-ek, amelyek a terhesség ideje alatt expresszálódnak a placentában, nagy valószínűséggel kimutathatóak az anyai keringésben. Számos olyan található közöttük, amely részt vesz a szívfejlődés folyamatának szabályozásában, ezáltal összefüggésbe hozható a szívfejlődési rendellenességekkel. Az ilyen sajátosságú, magzati eredetű miRNS-ek vizsgálata új lehetőségeket nyit a non-invazív molekuláris magzati diagnosztikában. Egy kínai kutatócsoport SOLiD szekvenálás segítségével miRNS expressziós vizsgálatot végzett, olyan 18-22 terhességi hétben lévő várandósok szérum mintáiban, akiknek magzatát szívfejlődési rendellenességgel diagnosztizáltak (ASD, VSD vagy TOF). Eredményeik szerint a *hsa-miR-19b*, *hsa-miR-22*, *hsa-miR-29c* és *hsa-miR-375* miRNS-ek szignifikánsan upreguláltak voltak a beteg magzatot hordozó terhes nők keringésében [51]. Li és munkatársai VSD-vel diagnosztizált gyermekektől gyűjtöttek perifériás vérmintát, majd microarray és RT-PCR vizsgálatokat végeztek [52]. 7 downregulált és 1 upregulált miRNS-t azonosítottak, melyek a jobb kamra fejlődésért felelős géneket szabályoznak. Mindazonáltal, a VSD a szívfejlődés folyamán alakul ki, ezért lehetséges, hogy a gyerekek esetében megfigyelt változások a betegség következményei és nem pedig kiváltó okai.

A miRNS PCR Array eredményeként megkaptuk, hogy az egyes betegcsoportokban mely miRNS-ek mutatnak fokozott- vagy csökkent expressziót az életkor szerint illesztett normál csoportokhoz képest. Ezt összevetettük a különböző szív- és érrendszeri megbetegedésekben megfigyelt változásokkal, majd ez alapján kiválasztottuk jelentősebb miRNS-eket: általánosan upregulálódott miRNS-ek a *let-7c*, *let-7e*, *miR-100*, *miR-199a* és *miR-423*; downregulálódott miRNS a *miR-486* volt.

A magzati szív-és érrendszer fejlődése különböző transzkripciós faktorok irányítása alatt áll, melyek bonyolult szabályozási hálózatot alkotnak. Ha a rendszer valamely eleme károsodik, gyakran alakul ki szívfejlődési rendellenesség. Az általunk szignifikánsnak ítélt miRNS-ek a hálózat több tagját is szabályozhatják: a *let-7c* és *let-7e* miRNS-ek prediktált célgénjei között szerepelnek többek között a *FOXP1*, *HAND2* és *TBX5* transzkripciós faktorok, melyek nélkülözhetetlenek a szív normál fejlődéséhez. A *miR-199a* miRNS gátolja az

érképződési folyamatokat, validált célpontjai a *HIF1A* és *ERBB* gének. Több daganatos megbetegedésben is kimutatták angiogenezis gátló hatását [42]. A *miR-423* fokozott expresszióját figyelték meg szívelégtelenséggel sújtott betegek keringésében [53]. Prediktált targetjei között több növekedési faktor receptor is szerepel (*PDGFRB* és *FGFR2*), ezáltal overexpressziója gátolhatja a fejlődési folyamatokat is. A *miR-486* mind a három, általunk vizsgált szívfejlődési rendellenességben (VSD, HLHS, TOF) csökkent expressziót mutatott. Small és munkatársai leírták, hogy a *miR-486* hiányában szuppresszálódik a *PI3K-Akt* út vonal, ami egy fontos növekedési és túlélési jelpálya [54]. A miRNS egy többszörösen prediktált célpontja a *PTEN* gén, ami ezt az útvonalat negatívan szabályozza.

A RT-PCR és a miRNS PCR Array analízis eredményeként is azt kaptuk, hogy a *let-7c* miRNS jelentősen upregulálódott a beteg gyermeket hordozó várandósok plazma mintáiban. Ez az eltérés a kóros magzati szívszövetekben is kimutatható volt, ami tovább erősíti a *let-7c* miRNS lehetséges szerepét a szívfejlődési rendellenességek kialakulásában.

A *let-7* miRNS család tagjai (13 db miRNS, köztük a *let-7c*) konstitutívan expresszálódnak a szív- és érrendszer főbb sejteiben, beleértve a vaszkuláris simaizomsejteket, az endothel sejteket és a koszorúér simaizomsejtjeit [22]. Kóros koncentrációban kardiovaszkuláris megbetegedésekhez vezethetnek, a *let-7b* az AMI [55], a *let-7i* a DCM egy lehetséges biomarkere [56]. Babiarz és munkatársai 2012-ben hiPSC (human induced pluripotent stem cells) eredetű szívizomsejteken végeztek mRNS és miRNS transzkriptomikai vizsgálatot. végeztek. A kapott expressziós profilokat biostatistikai módszerekkel elemezték ki, és azt kapták, hogy a *let-7* miRNS család egy fontos csomópontja a cardiomyocita differenciációt szabályozó miRNS-mRNS hálózatnak [23]. Gu és munkatársai leírták, hogy a *let-7* család tagjai fokozottan expresszálódnak a méhlepényben [32], ezért feltehetően megtalálhatóak az anyai keringésben is.

A *let-7c* a 21-es kromoszóma q21.2 régiójában, a *C21orf34* gén egy intronjában helyezkedik el. Expresszióját feltehetően a gén promótere szabályozza. Coppola és munkatársai 2013-ban kísérletesen bebizonyították, hogy a *let-7c* részt vesz a cardiomyogenesis szabályozásában: célpontja egy olyan metil-transzferáz enzim (*Ezh2*), amely kulcsfontosságú, a szívfejlődésben szerepet játszó transzkripció faktorokat csendesít (ezáltal a miRNS serkenti a folyamatot) [24]. Thum és munkatársai azt találták, hogy a *let-7c* expressziós mintázata nagy hasonlóságot mutat krónikus szívelégtelenségben és magzati szívben. Ebből arra következtettek, hogy a betegség a fétális gén program reaktivációjával jellemezhető, és ezt a változást vélhetően miRNS-ek (köztük a *let-7c*) idézik elő [57].

Az általunk végzett bioinformatikai analízis szerint a *NOTCH2* gén a *let-7c* miRNS fontos célpontja és a gén csendesítése szívfejlődési rendellenességhez vezethet: a gént a felhasznált predikációs programok a hsa-let-7c potenciális célpontjaként határozták meg; kísérletesen validálták a miRNS-mRNS interakciót; továbbá a gén mutációja szívhiba

kialakulásához vezetett. A *NOTCH2* fontos szerepet játszik a velőcső eredetű vaszkuláris simaizom sejtek proliferációjának szabályozásában és nélkülözhetetlen a szív kiáramlási pályájának megfelelő kifejlődéséhez [58]. Az Alagille szindróma egy szívfejlődési rendellenességgel jellemezhető komplex, dominánsan öröklődő kórkép. A betegség kialakulásának oka a Notch szignalizációs útvonal diszfunkciója, melyért az esetek egy részében a *NOTCH2* gén mutációja tehető felelőssé [39]. Mindezek alapján arra következtettünk, hogy a *let-7c* miRNS a veleszületett szívfejlődési rendellenesség potenciális biomarkere, és a közeljövőben alkalmazható lehet a betegség kiszűrésére.

8 ÖSSZEFOGLALÁS

A veleszületett szívfejlődési rendellenességek a leggyakoribb születési defektusokhoz tartoznak. Súlyosságuktól és korrigálhatóságuktól nagyban függ a gyermek várható élettartama, ezért fontos a terhesség alatti felismerés. Egyre nagyobb az igény olyan biomarkerekre, amelyek segítségével megbízhatóan kimutatható a betegség. Ígéretes megoldást kínálnak az anyai keringésben fellelhető magzati eredetű miRNS-ek, melyek több, a szívfejlődés folyamatában résztvevő gén expresszióját is szabályozzák.

A kutatás során célkitűzésünk volt a miRNS-ek szerepének tanulmányozása a szívfejlődési rendellenességekben; a *let-7c* miRNS expressziós vizsgálata anyai plazma mintákban és kóros magzati szívszövetben; további potenciális miRNS biomarkerek keresése a veleszületett szívfejlődési rendellenesség non-invazív prenatális kimutatására.

Az anyai plazma vizsgálatok elvégzéséhez 38 egészséges, valamint 41 olyan várandóstól gyűjtöttünk perifériás vérmintát, akiknek a magzata szívfejlődési rendellenességet mutatott. A *let-7c* miRNS expressziós vizsgálatához 28 (14 beteg és 14 kontroll) várandós mintáját választottuk ki. A miRNS mintákból cDNS-t szintetizáltunk, majd kvantitatív RT-PCR módszer segítségével meghatároztuk a *let-7c* miRNS koncentrációját. A második vizsgálathoz a beteg csoportból 22, a kontroll csoportból 12 anyai plazma mintát használtunk fel. A különböző szív- és kromoszóma-rendellenességeknek megfelelően 5 beteg és 2, korosztály szerint megkülönböztetett normál miRNS pool-t készítettünk. Az így kapott mintákon miRNS PCR Array analízist végeztünk, a szív-és érrendszeri betegségekre specifikus panel felhasználásával. Bioinformatikai adatbázisok és miRNS-target predikciós programok segítségével elemeztük a kapott eredményeket. A magzati szívszövet vizsgálatok elvégzéséhez fetopathológiai feldolgozások során 7 db kóros és 2 db egészséges szívszövet-mintát gyűjtöttünk. A mintákból miRNS izolálást végeztük, majd az anyai plazma vizsgálatokhoz hasonló módon meghatároztuk a *let-7c* miRNS koncentrációját.

A miRNS PCR Array analízis eredményeként azt kaptuk, hogy a beteg mintákban és a kardiovaszkuláris kórképekben általánosan upregulálódott miRNS-ek a *let-7c*, *let-7e*, *miR-100*, *miR-199a* és *miR-423*; downregulálódott miRNS a *miR-486* volt. A RT-PCR expressziós vizsgálat során szintén azt tapasztaltuk, hogy a *let-7c* miRNS jelentősen upregulálódott a beteg gyermeket hordozó várandósok plazma mintáiban. Ez az eltérés a kóros magzati szívszövetekben is kimutatható volt, ami tovább erősíti a *let-7c* miRNS lehetséges szerepét a szívfejlődési rendellenességek kialakulásában.

Kutatásunk eredményeként több potenciális biomarkert találtunk, amelyek a későbbiekben alkalmazhatóak lehetnek a veleszületett szívfejlődési rendellenességek korai kimutatására. További célkitűzéseink között szerepel a markerek validálása RT-PCR módszerrel és a különböző szívhibák kialakulási mechanizmusának pontos feltérképezése.

9 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Munkám elkészítéséhez nyújtott segítségükért köszönetemet szeretném kifejezni:

- Dr. Rigó János Jr. professzornak, aki lehetővé tette, hogy a diplomához szükséges vizsgálatokat a Semmelweis Egyetem I.Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikán végezhessem el.
- Programvezetőmnek, Dr. Lázár Leventének, aki biztosította számomra, hogy bekapcsolódjak a mikroRNS-ekkel kapcsolatos kutatómunkába, és aki mindvégig figyelemmel kísérte és támogatta tudományos diákköri tevékenységemet.
- Témavezetőmnek, a Genetikai Laboratórium vezetőjének, Dr. Nagy Bálintnak, aki töretlen lelkesedésével és magas színvonalú szakmai tudásával irányította és segítette munkámat.
- Dr. Schönléber Juliannának, aki biztosította számomra a lehetőséget, hogy részt vegyek a fetopathológiai vizsgálatokon, és segédkezett a szívminák gyűjtésében.
- Gnotek Edit asszisztensnek, aki a laboratóriumban végzett munkában segítséget nyújtott és hasznos szakmai tanácsokkal látott el.
- Dr. Gilda Cobellis-nek, a Seconda Università di Napoli kutatójának, aki biztosította a lehetőséget és a szükséges eszközöket az Olaszországban végzett kutatások elvégzéséhez.
- Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom családomnak az évek során nyújtott támogatásukért, türelmükért és biztatásukért.

10 IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Capozzi G., Caputo S. et al., „Congenital heart disease in live-born children: incidence, distribution, and yearly changes in Campani Region.”, *J Cardiovasc Med*, 9(4):368-374, 2008
- [2] Freeman S.B., Bean L.H. et al. „Ethnicity, sex, and the incidence of congenital heart defects: report from the National Down Syndrome Project”, *Genet. Med.*, 10:173-180, 2008
- [3] Fahed A.C., Nemer G.M., „Genetic Causes of Syndromic and Non-Syndromic Congenital Heart Disease”, *Mutations in Human Genetic Disease*, Chapter 6, 2012
- [4] Bruneau, „The developmental genetics of congenital heart disease”, *Nature*, 451:943-948, 2008
- [5] Park HK, Park YH., „Fetal surgery for congenital heart disease”, *Yonsei Medical Journal*, 42(6):686-694, 2001
- [6] Artz W., Tulzer G.; „Fetal surgery for cardiac lesions”, *Prenatal Diagnosis*, 31:695-698, 2011
- [7] Bán Z., Papp Z., „Prenatális és preimplantációs diagnosztika”, *Magyar Tudomány*, 3:322-330, 2006
- [8] Nagy B., Lázár L., Rigó J., *Praenatalis Molekuláris Genetika*. Budapest, Semmelweis Kiadó, 2011
- [9] Tounta G., Kolialexi A. et al. „Non-invasive prenatal diagnosis using cell-free fetal nucleic acids in maternal plasma: Progress overview beyond predictive and personalized diagnosis” *EPMA Journal*, 2:162-171, 2011
- [10] Bianchi D.W., Platt L.D. et al., „Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing”, *Obsterics & Gynacology*, 119(5):890-901, 2012
- [11] Rasiah SV, Publicover M. et al., „A systematic review of the accuracy of first-trimester ultrasound examination dor detecting major congenital heart disease”, *Ultrasound Obstet Gynecol*, 28(1):110-116, 2006
- [12] Tegnader E., Eik-Nes SH., „The examiner’s ultrasound experience has a dignificant impact on the detection rate of the congenital heart defects at the second-trimester fetal examination”, *Ultrasound Obstet Gynecol*, 28(1):8-14, 2006
- [13] Masszi Gy., Hajdú J., „Magzati kardiológiáról gyermekgyógyászoknak”, *Gyermekgyógyászati Továbbképző Szemle*, 2014
- [14] Bruns RF, Moron AF et al., „The role of nuchal translucency in the screening for congenital heart defects”, *Arq Bras Cardiol*, 87(3):307-314, 2006
- [15] Jeliffe-Pawlowski LL., Walton-Haynes L. et al., „Using second trimester ultrasound and maternal serum biomarker data to help detect congenital heart defects in pregnancies with positive triple-marker screening results”, *Am J Med Genet A*, 146A(19):2455-2467, 2008

- [16] Lewis B.P., Burge C.B. et al., „Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicated that thousands of human genes are microRNA targets”, *Cell*, 120:15-20, 2005
- [17] Winter J, Jung S. et al., „Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation”, *Nat Cell Biol*, 11(3):228-234, 2009
- [18] Yates L. A., Norbury C. J. et al., "The Long and Short of MicroRNA", *Cell*, 153:516-519, 2013
- [19] Chen JF, Mandel EM et al., „The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation”, *Nat. Genet.*, 38: 228-233, 2006
- [20] van Rooij E., Quiat D., „A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance”, *Dev. Cell*, 17:662-673, 2009
- [21] Ji R, Cheng Y et al., „MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of microRNA in vascular neointimal lesion formation”, *Circ Res*, 100:1579-1588, 2008
- [22] Bao MH., Feng X. et al. „Let-7 in cardiovascular diseases, heart development and cardiovascular differentiation from stem cells”, *Int. J. Mol. Sci.*, 14:23086-23102, 2013
- [23] Babiarz J.E., Morgane Ravon M. et al. „Determination of the Human Cardiomyocyte mRNA and miRNA Differentiation Network by Fine-Scale Profiling”, *Stem Cells And Development*, 21 (11): 1956-1965, 2012
- [24] Coppola A., Romito A. et al. „Cardiomyogenesis is controlled by the miR-99a/let-7c cluster and epigenetic modifications”, *Stem Cell Research*, 12:323–337, 2014
- [25] Chen X., Ba Y. et al., „Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases”, *Cell Research*, 18:997-1006, 2008
- [26] Chim SS, Shing KF et al., „Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma”, *Clinical Chemistry*, 54(3):482-490, 2008
- [27] Yu Z., Han S. et al. „Potential role of maternal serum microRNAs as biomarker for fetal congenital heart defects”, *Medical Hypotheses*, 76: 424-426, 2011
- [28] Heid CA, Stevens J. et al., „Real Time Quantitative PCR”, *Genome Research*, 6(10):986-94, 1996
- [29] Livak KJ., Schmittgen TD. et al., „Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method”, *Methods*, 25(4):402-408, 2001
- [30] Morales-Prieto DM, Chaiwnagyen W. et al., „MicroRNA expression profiles of trophoblastic cells”, *Placenta*, 33 :725-734, 2012
- [31] Fu G., Brkic J. et al., „MicroRNA in human placental development and pregnancy complications”, *Int. J. Mol. Sci.*, 14:5519-5544, 2013

- [32] Gu Y., Sun J. et al. „Differential miRNA expression profiles between the first and the third trimester human placentas”, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 304: E836-E843, 2013
- [33] Tokumaru S, Suzuki M et al., „let-7 regulates Dicer expression and constitutes a negative feedback loop”, *Carcinogenesis*, 29(11):2073-2077, 2008
- [34] Tzur G, Israel A et al. „Comprehensive gene and microRNA expression profiling reveals a role for microRNAs in human liver development”, *PLoS One*, 20;4(10):e7511, 2009
- [35] Helwak A, Kudla G et al. „Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding”, *Cell*, 153(3):654-665, 2013
- [36] Kosaki R, Gebbia M et al. „Left-right axis malformations associated with mutations in ACVR2B, the gene for human activin receptor type IIB”, *Am J Med Genet*, 1;82(1):70-76., 1999
- [37] Aramaki M, Uda T et al., „Phenotypic spectrum of CHARGE syndrome with CHD7 mutations”, *Pediatr.*, 148(3):410-414, 2006
- [38] Shen L., Li XF et al. „Transcription factor HAND2 mutations in sporadic Chinese patients with congenital heart disease.”, *Chin Med J. (Eng)*, 123(13):1623-1627, 2010
- [39] McDaniel R., Warthen D.M. et al., „NOTCH2 Mutations Cause Alagille Syndrome, a Heterogenous Disorder of the Notch signaling Pathway”, *Am. J. Hum. Genet.*, 79:169-173, 2006
- [40] Iqbal Z, Cejudo-Martin P et al., „Disruption of the podosome adaptor protein TKS4 (SH3PXD2B) causes the skeletal dysplasia, eye, and cardiac abnormalities of Frank-Ter Haar Syndrome.”, *Am J Hum Genet.*, 86(2):254-261, 2010
- [41] Gruenauer-Kloevekorn C, Froster UG., „Holt-Oram syndrome: a new mutation in the TBX5 gene in two unrelated families.”, *Ann Genet.*, 46(1):19-23, 2003
- [42] He J, Jing Y et al. „Roles and mechanism of miR-199a and miR-125b in tumor angiogenesis.”, *PLoS One*; 8(2):e56647., 2013
- [43] Rane S, He M et al. „Downregulation of miR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1 α and Sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes.”, *Circ Res.*, 104(7):879-86, 2009
- [44] McElhinney DB, Krantz ID et al., „Analysis of cardiovascular phenotype and genotype-phenotype correlation in individuals with a JAG1 mutation and/or Alagille syndrome.”, *Circulation*, 106(20):2567-74., 2002
- [45] Sznajder Y, Keren B et al., „The spectrum of cardiac anomalies in Noonan syndrome as a result of mutations in the PTPN11 gene.”, *Pediatrics*, 119(6):e1325-31., 2007
- [46] Segel R, Levy-Lahad E et al., „Pulmonary hypoplasia-diaphragmatic hernia-anophthalmia-cardiac defect (PDAC) syndrome due to STRA6 mutations--what are the minimal criteria? ”, *Am J Med Genet A*, 149A(11):2457-63., 2009

- [47] Faivre L, Collod-Beroud G et al., „Effect of mutation type and location on clinical outcome in 1,013 probands with Marfan syndrome or related phenotypes and FBN1 mutations: an international study.”, *Am J Hum Genet.*, 81(3):454-66., 2007
- [48] Lin AE, Birch PH et al., „Cardiovascular malformations and other cardiovascular abnormalities in neurofibromatosis 1.”, *Am J Med Genet.*, 95(2):108-17, 2000
- [49] Ai J., Zhang R. et al. „Circulating microRNA-1 as potential novel biomarker for acute myocardial infarction in humans”, *Biochem Biophys Res Commun*, 391:73-77, 2010
- [50] Fichtlscherer S, De Rosa S et al., „Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease.”, *Circ Res.*, 107:677– 684., 2010
- [51] Zhu S., Cao L. et al., „Identification of maternal serum microRNAs as novel non-invasive biomarkers for prenatal detection of fetal congenital heart defects”, *Clinical Chimica Acta*, 424:66-72, 2013
- [52] Li D, Ji L et al., „Characterization of circulating microRNA Expression in patients with Ventricular Septal Defect”, *Plos One*, 9(8):e106318, 2014
- [53] Tijssen AJ, Creemers EE et al., „MiR423–5p as a circulating biomarker for heart failure”, *Circ Res.*, 106:1035–1039., 2010
- [54] Small EM, O'Rourke et al., „Regulation of PI3-kinase/Akt signaling by muscle enriched microRNA-486”, *PNAS*, 107(9):4218-23, 2010
- [55] Long G., Wang F. et al., „Circulating miR-30a, miR-195 and let-7b associated with acute myocardial infarction.”, *PLoS One*, 7:e50926, 2012
- [56] Mamoru S., Yoshitaka M. et al., „A cellular microRNA, let-7i, is a novel biomarker for clinical outcome in patients with dilated cardiomyopathy.”, *J. Card. Fail.*, 17:923–929, 2011
- [57] Thum T., Galuppo, P. et al., „MicroRNAs in the human heart: A clue to fetal gene reprogramming in heart failure.”, *Circulation*, 116:258–267, 2007
- [58] Varadkar P., Kraman M. et al., „Notch2 is required for the proliferation of cardiac neural crest-derived smooth muscle cells”, *Developmental Dynamics*, 237:1144-1152, 2008

11 MELLÉKLETEK

Mintaszám	Szívfejlődési rendellenesség
1	Ventricular Septum Defect (VSD), Pulmonary Atresia (PA)
2	Hypoplastic Left Heart Syndrome (HLHS), Pulmonary Atresia (PA)
3	Hypoplastic Left Heart Syndrome (HLHS), Aortic Atresia (AA)
4	Atrio-Ventricular Septum Defect (AVSD)
5	Univentricular Heart (UVH), Transposition of Great Arteries (TGA)
6	Atrio-Ventricular Septum Defect (AVSD), Pulmonary Atresia (PA)
7	Pulmonary Atresia (PA)
8	Hypoplastic Left Heart Syndrome (HLHS)
9	Ventricular Septum Defect (VSD)
10	Hypoplastic Right Heart Syndrome (HRHS)
11	Tetralogy of Fallot (TOF), Double Outlet Right Ventricle (DORV)
12	Atrio-Ventricular Septum Defect (AVSD)
13	Hypoplastic Left Heart Syndrome (HLHS)
14	Atrio-Ventricular Septum Defect (AVSD)

M.1. Táblázat. Anyai plazma *let-7c* miRNS expressziós vizsgálat, szívfejlődési rendellenességek

Gén neve	miRNS neve	Predikció (3/#)	Validálás	Szívfejlődési rendellenesség
ACVR2B	let-7c-5p	3	nem	igen
ADAMTS1	let-7c-5p	3	nem	nem
ADIPOR2	let-7c-5p	3	nem	nem
ALPK3	let-7c-5p	3	nem	nem
BMP2	let-7c-5p	3	nem	nem
BMPR1A	let-7c-5p	3	nem	nem
CASP3	let-7c-5p	3	nem	nem
CHD7	let-7c-5p	3	nem	igen
COL11A1	let-7c-5p	3	nem	nem
COL14A1	let-7c-5p	3	nem	nem
DICER1	let-7c-5p	3	igen	nem
DLC1	let-7c-5p	3	nem	nem
DVL3	let-7c-5p	3	nem	nem
EDN1	let-7c-5p	3	nem	nem
FOXN4	let-7c-5p	3	nem	nem
FOXP1	let-7c-5p	3	nem	nem
FRS2	let-7c-5p	3	nem	nem
HAND1	let-7c-5p	3	nem	nem
HAND2	let-7c-5p	3	nem	igen
HAS2	let-7c-5p	3	nem	nem
HDAC2	let-7c-5p	3	nem	nem
INSR	let-7c-5p	3	nem	nem
ITGA4	let-7c-5p	3	nem	nem
MEF2D	let-7c-5p	3	nem	nem
MIB1	let-7c-5p	3	nem	nem
NOTCH2*	let-7c-5p	3	igen	igen
OXTR	let-7c-5p	3	nem	nem
PAX3	let-7c-5p	3	nem	nem
PDGFB	let-7c-5p	3	nem	nem
POLR2D	let-7c-5p	3	nem	nem
PPARA	let-7c-5p	3	nem	nem
SEN2	let-7c-5p	3	nem	nem
SH3PXD2B	let-7c-5p	3	nem	igen
SMAD2	let-7c-5p	3	nem	nem
STK4	let-7c-5p	3	nem	nem
TAZ	let-7c-5p	3	igen	nem
TBX5	let-7c-5p	3	nem	igen
TGFBR1	let-7c-5p	3	igen	nem
THBS1	let-7c-5p	3	nem	nem
TNNI1	let-7c-5p	3	nem	nem

TSC1	let-7c-5p	3	nem	nem
VANGL2	let-7c-5p	3	nem	nem
VCAM1	let-7c-5p	3	nem	nem
YAP1	let-7c-5p	3	nem	nem

M.2. Táblázat. A *let-7c* miRNS 3 program által prediktált célpontjai a szívfejlődési gének között

Gén neve	miRNS neve	Predikció (3/#)	Validálás	Szívfejlődési rendellenesség
ACVR2B	hsa-let-7e-5p-5p	3	nem	igen
ADAMTS1	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
ADIPOR2	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
ALPK3	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
BMP2	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
BMPR1A	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
CASP3	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
CHD7*	hsa-let-7e-5p	3	igen	igen
COL11A1	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
COL14A1	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
COL3A1	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
DICER1	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
DLC1	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
DVL3	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
EDN1	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
FOXP4	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
FOXP1	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
FRS2	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
HAND1	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
HAND2	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
HAS2	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
HDAC2	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
INSR	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
ITGA4	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
MEF2D	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
MIB1	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
NOTCH2	hsa-let-7e-5p	3	nem	igen
OXTR	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
PAX3	hsa-let-7e-5p	3	igen	nem
PDGFB	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
POLR2D	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
PPARA	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
SEN2	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
SH3PXD2B	hsa-let-7e-5p	3	nem	igen
SMAD2	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
SPEG	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
STK4	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
TAZ	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
TBX5	hsa-let-7e-5p	3	nem	igen
TGFBR1	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
THBS1	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
TNNI1	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
TSC1	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
VANGL2	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
VCAM1	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem
YAP1	hsa-let-7e-5p	3	nem	nem

M.3. Táblázat. A *let-7e* miRNS 3 program által prediktált célpontjai a szívfejlődési gének között

Gén neve	miRNS neve	Predikció (3/#)	Validálás	Szívfejlődési rendellenesség
ACVR2B	hsa-miR-423-3p	3	nem	igen
ADIPOR2	hsa-miR-423-3p	3	nem	nem
CAV3	hsa-miR-423-3p	3	nem	nem

DLL1	hsa-miR-423-3p	3	nem	nem
ECE1	hsa-miR-423-3p	3	nem	nem
FGFR2	hsa-miR-423-3p	3	nem	nem
JUP	hsa-miR-423-3p	3	nem	nem
PDGFRB	hsa-miR-423-3p	3	nem	nem
SCUBE1	hsa-miR-423-3p	3	nem	nem
SMO	hsa-miR-423-3p	3	nem	nem
SOX11	hsa-miR-423-3p	3	nem	nem
VEGFA	hsa-miR-423-3p	3	nem	nem

M.4. Táblázat. A *miR-423* miRNS 3 program által prediktált célpontjai a szívfejlődési gének között

Gén neve	miRNS neve	Predikció (3/#)	Validálás	Szívfejlődési rendellenesség
ACVR2B	hsa-miR-199a-5p	3	nem	igen
ALPK3	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
ANK2	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
CCDC40	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
ECE1	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
ERBB2	hsa-miR-199a-5p	3	igen	nem
ERBB4	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
GLI3	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
GREM1	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
HDAC9	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
HEG1	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
HEYL	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
HIF1A	hsa-miR-199a-5p	3	igen	nem
IHH	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
ITGA3	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
ITGA4	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
JAG1	hsa-miR-199a-5p	3	nem	igen
MAML1	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
MAP2K5	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
MEF2D	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
MKL2	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
NEBL	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
NOTCH2	hsa-miR-199a-5p	3	nem	igen
NPY2R	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
OXSRI	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
PARVA	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
PAX3	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
PBRM1	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
PPARA	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
PPARD	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
PTPN11	hsa-miR-199a-5p	3	nem	igen
RARA	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
RXRB	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
SENP2	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
SGCB	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
SMAD3	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
SNAI1	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
SOX11	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
STK4	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
STRA6	hsa-miR-199a-5p	3	nem	igen
TSC1	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
WNT2	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
WNT5A	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
WT1	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem
XIRP1	hsa-miR-199a-5p	3	nem	nem

M.5. Táblázat. A *miR-199a* miRNS 3 program által prediktált célpontjai a szívfejlődési gének között

Gén neve	miRNS neve	Predikció (3/#)	Validálás	Szívfejlődési rendellenesség
ACVR2B	hsa-miR-486-5p	3	nem	igen
CASP7	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
CRKL	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
DICER1	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
DVL2	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
DYNLL1	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
EFNA1	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
EGLN1	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
FBN1	hsa-miR-486-5p	3	nem	igen
FOXP1	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
GLI2	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
HDAC2	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
ID3	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
MIB1	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
MKL2	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
MYLK2	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
NCOA6	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
NEBL	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
NF1	hsa-miR-486-5p	3	nem	igen
NFATC1	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
NIPBL	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
NOTCH2	hsa-miR-486-5p	3	nem	igen
NPY2R	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
PBRM1	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
PDGFRB	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
PTEN	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
RXRB	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
SMAD2	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
SMAD3	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
SMAD4	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
SNAI1	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
SOX4	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
SRF	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
STK4	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
TBX2	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
TEK	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
VEGFA	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
WNT16	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
YAP1	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem
ZMIZ1	hsa-miR-486-5p	3	nem	nem

M.6. Táblázat. A *miR-486* miRNS 3 program által prediktált célpontjai a szívfejlődési gének között