

XXXII. OTDK Biológia Szekció

**EGY ŐSSEJTSPECIFIKUS MIKRORNNS KLASZTER,
A C19MC EXPRESSZIÓJÁNAK VIZSGÁLATA**

Készítette: Fóthi Ábel

Pázmány Péter Katolikus Egyetem,
Orvosi biotechnológia MSc szak,
II. évfolyam

Témavezető: Dr. Orbán Tamás

MTA TTK Enzimológiai Intézet

Belső konzulens: Dr. Gáspári Zoltán

Pázmány Péter Katolikus Egyetem

Tartalomjegyzék

TARTALOMJEGYZÉK	1
1. BEVEZETÉS	2
1.1. MikroRNS-ek általános bemutatása	3
1.2. A C19MC miRNS klaszter	4
2. CÉLKITŰZÉSEK	8
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	9
3.1. RNS izolálás	9
3.2. Baktériumtranszformáció és plazmidizolálás	9
3.3. DNS elektroforézis agaróz gélen	10
3.4. DNS szekvenálás	10
3.5. TaqMan esszé	11
3.6. miRNS expresszió mérése TaqMan Low Density Array használatával	11
3.7. SYBR Green esszé	12
3.8. A C19MC pre-miRNS-ek és miRNS-ek bioinformatikai vizsgálata	13
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	14
4.1 Az RNS minták minőségének vizsgálata	14
4.1.1. Spektrofotometria	14
4.1.2. Gélelektroforézis	15
4.1.3. TaqMan esszé	15
4.2. TLDA eredmények	16
4.2.1. <i>Őssejtspecifikus miRNS-ek expressziós mintázata</i>	16
4.3. A C19MC bioinformatikai vizsgálata	19
4.3.1. <i>Transzkripciósfaktorok</i>	19
4.3.2. <i>A pre-miRNS szekvenciák vizsgálata</i>	21
4.3.3. <i>A miRNS-ek validált célpontjainak in silico elemzése</i>	22
4.4. C19MC pri-miRNS-ének kvantitatív vizsgálata SYBR Green qPCR-rel	24
4.4.1. <i>Primerek megtervezés SYBR Green esszéhez</i>	24
4.4.2. <i>SYBR Green esszéhez tervezett primerek optimalizálása</i>	26
4.4.3. <i>SYBR Green qPCR mérések eredményei</i>	28
5. DISZKUSSZIÓ	32

1. Bevezetés

Az RNS biológia jelenleg is a molekuláris biológia egyik legdinamikusabban fejlődő ága. Az elmúlt néhány évtized felfedezései rávilágítottak, hogy az RNS-eknek a korábban gondoltnál sokkal változatosabb szerepük van a sejt életében. Az új, nem kódoló funkcionális RNS-ek felfedezésével, mint például a siRNS-ek vagy mikroRNS-ek, bebizonyosodott, hogy RNS szinten történő génexpresszió szabályozás jóval bonyolultabb, mint azt előtte gondoltuk. Napjainkban már nagyszámú szabályzó RNS vált ismertté, azonban funkcióik pontos megértése még várat magára. Egyik legjelentősebb képviselőik a mikroRNS-ek, amik a sejt szinte minden folyamatát szabályozzák. Komplex hálózatokat alkotva képesek befolyásolni a sejt életét. Ezeknek a hálózatoknak a kialakításában a miRNS-eken kívül szerepük van mRNS-eknek, fehérjéknek, és egyéb funkcionális RNS-eknek.

A diagnosztikában egyre népszerűbbek a genetikai biomarkerek. Különböző minták összehasonlításával találhatunk olyan géneket, miRNS-eket, amelyek alapján megkülönböztethetők a patológiás minták. Azonban ahhoz, hogy ezekre a biomarkerekre pontos diagnózisokat lehessen építeni, nem elég leíró jellegű expressziós vizsgálatokat végezni, fel kell térképezni a patológiás folyamatokban játszott szerepüket is. Ehhez integrálnunk kell a biomarkereket a patológiás állapotot okozó, a génexpresszió több szintjére kiterjedő regulációs modellbe. Ez a miRNS-ek esetében azt jelenti, hogy célpontjaikat és az őket szabályozó mechanizmusait is meg kell ismernünk. Ehhez a feladathoz ezeknek a rendszereknek a komplexitása miatt új megközelítés és módszerek szükségesek.

A biológia területén egyre elterjedtebbek az úgynevezett nagyáteresztőképességű (high-throughput) technológiák, amelyekkel gyorsan nagy mennyiségű adat generálható, meggyorsítva ezzel a biológiai kutatásokat. A módszer új szemléletű kérdésfeltevéseket igényel, ugyanis a kutató az egyszerű adatgenerálás hatására könnyen elkövetheti azt a hibát, hogy nagy mennyiségű, nem releváns információt termel, amiknek a kiértékelésére már nincsen kapacitása. Ezért szükséges a kísérletek alapos megtervezése, a kérdés relevanciájának ellenőrzése. Ezenfelül nélkülözhetetlen némi bioinformatikai tudás, hiszen annak hiányában csak súlyos kompromisszumok árán lehetséges a nagy mennyiségű adatok feldolgozása. Mostanra ismertté vált, hogy a miRNS-ek a sejt minden differenciációs állapotában részt vesznek a gének

szabályozásában, így összejt állapotban is. Ezért az összejtekre jellemző mechanizmusok megismeréséhez a miRNS-ek vizsgálata is szükséges, expressziós vizsgálatuk is indokolttá vált. Egy sejten belül a miRNS-ek összességét miRNom-nak nevezzük, a genom és a proteom mintájára. Mikor miRNS expressziós vizsgálatot végzünk, ennek a miRNomnak az elemeit kvantitáljuk.

Dolgozatomban egy humán összejtvonal és differenciálódott formájának miRNomának kvantitálását célzó nagyáteresztő-képességű vizsgálat menetét, eredményét, az abból levont következtetéseket, és az ezekre épülő további kísérleteket mutatom be. A bevezetés után a kitűzött célok és feladatok bemutatásával folytatom, majd összefoglalom a munkám irodalmi hátterét, részletesen kitérve a miRNS-ekre és a témámhoz szorosan kapcsolódó kutatásokra. Ez után ismertetem az általam használt molekuláris biológiai és bioinformatikai módszereket, amit vizsgálataim eredményeinek bemutatása követi. A dolgozatot az irodalmi adatokon és a saját eredményeimen alapuló diszkusszióval zárom.

1.1. MikroRNS-ek általános bemutatása

A mikroRNS-ek (miRNS) rövid, ~22 nukleotidból álló egyszálú RNS molekulák. Az első miRNS-t 1993-ban, a *Caenorhabditis elegans* laboratóriumi fonálféreg embrionális fejlődését szabályzó géneket keresve fedezte fel Victor Ambros, Rosalind Lee és Rhonda Feinbaum^[1]. Ők azonban akkor még nem tudták, hogy egy új általános szabályozási mechanizmust találtak. Az sem volt ismert, hogy a kis RNS molekulák transzláció gátló mechanizmusa a később Craig Mello és Andrew Fire által 1998-ban leírt, duplaszálú RNS molekulákon alapuló hatással együtt az RNS interferencia mechanizmusai közé tartozik^[2], amely felfedezéséért az utóbbi szerzőpáros 2006-ban orvosi Nobel-díjat kapott. A miRNS-ek, mint a kis csendesítő RNS-ek külön osztálya végül 2001-től vált általánosan elfogadottá^[3].

Mára az élővilágban 28000 körülire tehető az ismertté vált érett miRNS molekulák száma, melyek szekvenciái a miRBase^[4] oldalán bárki számára elérhetőek. Az annotált miRNS-ek száma ennél kisebb, a humán miRNS-ek száma 2588. Az azonos névvel ellátott miRNS-ek hossza kis mértékben különbözhet, tehát egy miRNS-nek több izoformája is lehet. Az eltérés a miRNS 3' vagy az 5' végének hosszában mutatkozhat, ezeket egy adott miRNS 3'- vagy 5'-izoformáinak nevezzük. Az izoformák létrejötte bioszintézisükkel áll összefüggésben, amivel kapcsolatban

még mindig sok a megválaszolatlan kérdés^[5]. A miRNS-ek bioszintézisének több útvonala is ismert^[6], némelyik útvonal részletei azonban nem teljesen tisztázottak.

Legrégebb óta ismert és a legelterjedtebb útvonalat kanonikusnak nevezzük. Ennek során a genom nem transzlálódó részeiről az RNS-polimeráz II egy úgynevezett primer miRNS-t (pri-miRNS) ír át^[7]. Ez a hosszú elsődleges átírat több, „hajtú”-höz hasonló másodlagos szerkezetű kétszálú RNS (dsRNS) molekularészletet is tartalmazhat, ilyen esetben transzkripció értelemben ezek a miRNS-ek egy klasztert alkotnak. Az érés során a pri-miRNS-t a hajtúkanyarnál a dsRNS kötő DGCR8 fehérje felismeri, majd a Drosha RNáz III enzim kihatolja az ~55-70 nukleotid hosszúságú prekursor-miRNS-t (pre-miRNS-t)^[8]. A hasítás után a 3' végén marad egy 2 nukleotid hosszú túlnyúlás, amelyet felismerve az Exportin-5 transzport molekula a pre-miRNS-t a sejtmagból a citoplazmába szállítja^[9]. Itt a Dicer RNáz III enzim és dsRNS kötő partnere, a TRBP vágja le a terminális hurok szekvenciát, létrehozva egy rövid dsRNS-t^[10]. Ezen kettősszálú RNS molekulának általában csak az egyik szála lesz működőképes miRNS, de előfordul, hogy mindkettő^[11]. Korábban a kevésbé domináns szálból képződő miRNS-t nevében csillaggal jelöltük meg, most már inkább a szálat -3p, illetve -5p jelölésekkel látjuk el, aszerint, hogy az eredeti pre-miRNS melyik végéből származó szálról beszélünk^[12].

Idővel több nem kanonikus útvonal létre is fény derült, melyek hasonlítanak a kanonikus útvonalhoz, de attól néhány lépésben eltérnek^[4,13]. Ilyen például a mirtron útvonal, amelyben a pre-miRNS-ek kivágása Drosha/DGCR8-tól függetlenül, splicing-gal történik. A mirtronok esetében nem beszélhetünk pri-miRNS-ekről, mert ilyenkor a rövid intronokból képződő „lasszó” (lariat) szerkezet az Ldbr enzim segítségével a splicing-ot követően feloldódik, és felszabadul a pre-miRNS molekula^[14-17]. A mirtronok esetében az intron gyakran pontosan megfelel a pre-miRNS-nek, azonban az emlősökben előforduló nagyméretű intronok miatt ez viszonylag ritka^[18-20]. Emlősökben általában az intron hosszabb, mint a pre-miRNS, ezért ezeket „5' tailed”, illetve „3' tailed” mirtronoknak nevezzük attól függően, hogy a splicing termék melyik része hosszabb a pre-miRNS-énél. Ezt a hajtúkanyar szerkezetből kinyúló részt 3' tailed mirtronok esetében az exoszóma fehérjekomplex eliminálja. 5' tailed mirtronok esetében a kinyúló struktúra eltüntetésének pontos mechanizmusa még ismeretlen, de biztosan lezajlik^[21]. Az így létrejövő pre-miRNS-ek egyenértékűek a kanonikus útvonalon létrejöttel, továbbiakban nincs különbség sem érési, sem szabályozó mechanizmusokban.

Az érett miRNS egy Argonauta típusú fehérjéhez kötődve hozza létre a RISC (RNA-Induced Silencing Complex) nevezetű komplexet. A RISC látja el a miRNS legfontosabb feladatát, a gének poszttranszkripciószabályozását. Képes az mRNS szekvenciák nem transzlálódó 3' végéhez (3'UTR) kötődni, aminek hatására a mRNS transzlációja gátlódik, vagy beindul a mRNS degradációja^[22]. A fehérjeszintézis gátlásához a teljes komplementaritás nem szükséges, elegendő, ha a miRNS 5' végén lévő 7 nukleotid hosszú „seed” régió van komplementaritásban az mRNS 3'UTR végének egy részével^[23]. Abban az esetben azonban, ha a miRNS és az mRNS 3'UTR végének egy része teljesen komplementerek, a mRNS azonnal funkcióját veszti és lebomlik^[24].

1.2. A C19MC miRNS klaszter

A miRNS-ek rendelkezhetnek saját lokusszal, de gyakran egy gén intronikus szakaszában helyezkednek el. Mindkét esetben az elsődleges átírat (pri-miRNS) magában foglalhat több pre-miRNS-t kódoló hajtúkanyar szerkezetet, amelyekből különböző érett miRNS-ek képződnek, és amelyek transzkripciósz értelemben egy klasztert alkotnak. A miRNS-ek jelentős része ilyen klaszterekben íródik át^[25], amik közül a legnagyobb humán miRNS klaszter a 19-es kromoszómán elhelyezkedő C19MC. Ez a körülbelül 100 kilobázispár hosszú szakasz 46 különböző miRNS hajtú szerkezetet tartalmaz, amelyről 59 érett miRNS képződik^[4,26]. A klaszter miRNS-ei primáta specifikusak, csak főemlősökben vannak jelen, emiatt evolúciós értelemben fiatalnak számítanak^[27]. Nagy valószínűséggel egy szomszédos miRNS klaszterből, a miR-371-3-be tartozó miRNS klaszter tagjainak duplikációjával alakultak ki. Erre utalnak a klaszteren belül elhelyezkedő retrotranszpozonok, és a két klaszter miRNS-einek szekvenciái közti hasonlóságok^[28]. Ez a homológia különösen a C19MC tagjai közt jelentős, ezeknek a miRNS-eknek a seed régiói is hasonlóak^[29].

A klaszter expressziós mintázatát tekintve összejt^[30] és placenta specifikusnak mondható^[26]. Bár a klaszteren belül több RNS-polimeráz III kötőhely is található, transzkripcióját a RNS-polimeráz II végzi, amit *in silico* és kísérletes módszerekkel is alátámasztottak^[31]. Továbbá a klaszter érését befolyásoló tényezők közül ismert, hogy a hosszú elsődleges átíratból a Drosha/DGCR8 alkotta Mikroprocesszor komplex hasítja ki a pre-miRNS-eket^[32], tehát a miRNS-ek biogenezeise a kanonikus útvonalat követve zajlik. Az expresszióját szabályzó tényezők közül nagy szerepe van a DNS

metilációjának is. A promóter régiótól 5' irányban 17,6 kilóbázispár távolságra citozin és guanin gazdag régiók, úgynevezett CpG szigetek találhatóak, amelyek az embrió fejlődés korai szakaszában az anyai kromoszómán, később mindkét kromoszómán metilálódnak^[33]. Ezzel szemben placentában az anyai allél imprintálódik, az apai allél egészen születésig aktív^[34]. A klaszter teljes szakaszán nagyszámú repetitív szekvencia van, melyek közül legnagyobb számban Alu szekvenciák fordulnak elő^[28]. A sejtek differenciációja során ezek a repetitív elemek metilálódnak, ez által csendesítik a miRNS-ek expresszióját^[35]. Ezt támasztja alá az is, hogy 5-aza-20-deoxicitidin (5-Aza-CdR) demetiláló és 4-fenilbutánsav (PBA) hiszton deacetiláz gátló szerrel való kezelés hatására a klaszter egyes csendesített elemei újra kifejeződnek^[36].

A C19MC funkciójáról egyelőre keveset tudni, de a fő feladata nagy valószínűséggel a sejtek differenciációs állapotának szabályozása. Erre utal, hogy a célpontjai közt olyan fehérjék vannak, amelyek fontos sejtciklus regulátorok. A klaszter több tagja képes a CDKN1A-t szabályozni, ezzel a sejtek S fázisba jutását segítik elő^[37]. Érdekes módon a hsa-miR-522 az E2F-t képes szuppresszálni, ezzel a sejtciklus megállását okozza a G1/S fázis határán^[38]. Vizsgálatukat összejtspecifitásuk mellett a daganatokban betöltött változatos szerepük indokolja. Bár főként 'onkomiR'-eknek tartják őket, tumorszuppresszor funkciót is betölthetnek^[39]. Expressziójukat leggyakrabban enyhén differenciálódott daganatokban mutatták ki, többek között: medulloblastomában^[40], neuroektodermális agydaganatban^[41], hipofízis adenomában^[42], vastagbélrákban^[43], hepatocelluláris karcinómában^[44], petefészekrákban^[45], fibroszarkómában^[46], emlődaganatban^[47] és hasnyálmirigyrákban^[48]. A felsorolt daganattípusok nagy száma rávilágít, miért is fontos a klasztert szabályozó mechanizmusok megértése. Ha több információval rendelkeznénk ebben a kérdésben, az terápiás^[49] és diagnosztikai^[50] célokat is szolgálna. Azonban ahhoz, hogy helyes diagnózisokat lehessen hozni, fel kell térképezni a miRNS hálózatok és a patológiás folyamatok közti kapcsolatokat. A tapasztalatok azt mutatják, hogy ez egy igen nehéz feladat, ugyanis a miRNS-ek funkciója szövetenként eltérő lehet. Példaként a hsa-miR-512-3p említhető, mely a hepatocelluláris karcinómában tumorszuppresszorként^[51], neuroektodermális agydaganatban pedig onkogénként^[41], más néven „onkomiR”-ként viselkedik. Ez nem csak a diagnosztikát, de a miRNS-ek terápiás felhasználását is megnehezíti. Ennek ellenére a miRNS „mimics”-ek és antagonisták igen reményteljes gyógymódnak tűnnek. Amennyiben az endogén miRNS-ek száma túl alacsony és ezért nem képesek

ellátni funkciójukat, miRNS-szerű utánpótlással lehetne őket pótolni. Ez olyan, jelenleg nagyon nehezen kezelhető esetekben is működhetne, mikor az adott miRNS-nek tumorszuppresszor szerepe van. Nem csak az endogén miRNS-ek alacsony száma okozta problémák kezelésére van remény. Amennyiben a miRNS-ek túlzott expressziója jelent problémát, például „onkomiR”-ek esetében, a miRNS-eket antagonistákkal lehetne célba venni^[50]. Jelenleg az egyik legnépszerűbb módszer a Locked Nucleic Acids (LNA) tartalmú antagonisták használata^[52]. Ezek a módosított kémiai szerkezetű nukleinsavak, nehezebben bomlanak le, mint az RNS-ek, így hosszabban tartó hatást lehet velük elérni. A másik lehetőség a stabil expresszálas biztosítása a sejtekben, ahogy az a transzpozonos rendszerekkel expresszálatott mesterséges mirtronok esetében is történik. A transzpozonok képesek beépülni a genomba, így az expresszió stabilan megmarad a sejtosztódás után is^[20, 53].

2. Célkitűzések

Munkám során egy őssejtspecifikus miRNS klaszter, a C19MC transzkripcionális szintű szabályozását vizsgálom. Ehhez egy nagyáteresztő-képességű kvantitatív PCR technológiát, TaqMan Low Density Array-t és más kvantitatív PCR módszereket használva az alábbi feladatokat terveztem elvégezni.

- miRNS expressziós vizsgálatok elvégzése HuES9 humán ősejtvonalon és abból differenciálódott sejteken, a C19MC tagjainak jellemzése és őssejtspecifitásuknak validálása céljából.
 - RNS minták izolálása, minőségük ellenőrzése
 - TLDA mérés előkészítése, elvégzése, kiértékelése, szemléletes megjelenítése
- Az expressziós eredmények alapján felmerülő kérdések megválaszolása bioinformatikai és molekuláris biológiai eszközökkel:
 - Milyen mechanizmusok okozhatják az azonos klaszterbe tartozó miRNS-ek eltérő expressziós szintjét?
 - Transzkripció szinten mérhetőek-e különbségek a C19MC pri-miRNS-eiben?

3. Anyagok és módszerek

3.1. RNS izolálás

Az RNS izolálást TRIzol reagenssel (Life Technologies) HuES9 és 6 napos, differenciálódott 'embryoid body' formájából végeztem, a gyártó utasításait követve. Az RNS koncentrációját NanoDrop 2000 spektrofotométer készülékkel mértem (Thermo Scientific). Az izolátum minőségét gél elektroforézissel ellenőriztem. Az RNS elbomlását elkerülendő a mintákhoz RNáz inhibitor adtam.

3.2. Baktériumtranszformáció és plazmidizolálás

A SYBR Green qPCR-hez tervezett primerekkel amplifikált PCR termékeket agaróz gélen való futtatás után a NucleoSpin Extract II reagenscsomaggal (Macherey-Nagel), a gyártó utasításait betartva tisztítottam meg. A qPCR kísérletekhez szükséges plazmid konstrukciókat az inszertek pGEM-T (Promega) vektorokba történő ligálásával hoztam létre, a gyártó által javasolt protokoll szerint.

A plazmidok molekuláris klónozásához TOP10 E.coli baktériumokat használtam. 50 ml Luria-Bertani (LB) tápoldatban az előző éjjel 5ml LB oldatban felnevesztett TOP10 baktériumkultúrából leoltottam 1,5 ml-t majd 37°C-on inkubáltam, míg a 600 nm-en mért abszorbanciája elérte a 0,4-et (kb. 3 óra). A sejteket jégen 10 percig inkubáltam, majd 4°C-on 5000 rpm-mel 5 percig centrifugáltam. Ezután 1,5 ml 100mM-os CaCl₂-vel mostam a csapadékot, majd 20 percig jégen inkubáltam. Újabb 4°C -os, 5000 rpm-es, 5 percig tartó centrifugálás után a sejteket 1,7 ml CaCl₂ és 300ul glicerin keverékébe vettem fel. A kompetens baktériumokat 100-100 ul-es adagokban -80°C-on tároltam a további felhasználásig.

A -80C-on tárolt kompetens sejteket jégen felolvasztottam, majd a transzfektálandó plazmidokra pipettáztam. 30 percnyi jégen való inkubálás után a baktériumokat 42°C-os, 2 percig tartó hő sokknak tettem ki, majd újabb 5 percig jégen inkubáltam. A transzformálást követően 50 ug/ml ampicillint tartalmazó Luria-Bertani (LB) tápoldatot mértem a sejtekre, majd 1 óra, 37°C-on termosztátban történő rázatás után a mintákat ampicillines agar lemezekre szélesztettem. A lemezeket 37°C-on egy

éjszakán át inkubáltam. A lemezeken kinőtt baktériumtelepeket LB oldatba oltottam le, majd a mintákat egy újabb éjszakán át 37°C-os termosztátban rázattam. A plazmidizolálást a QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN) reagenscsomaggal végeztem, a gyártó utasításai szerint. A DNS koncentrációját a Thermo Scientific NanoDrop 2000 spektrofotométer készülékével mértem.

3.3. DNS elektroforézis agaróz gélen

Az RNS minőségét, a ligálások hatékonyságát és a PCR termékek hosszát gélelektroforézissel ellenőriztem. A mintákat 1%-os agaróz gélen futtattam, 1x TBE pufferben (Tris, bórsav, EDTA), 120V-os feszültségen, 1 órán keresztül. A gél ethidium-bromidot tartalmazott, a mintákhoz pedig 6x-os töménységű Orange Loading Dye-t adtam. Viszonyítási alapként 100bp-os, illetve 1kbp-os létrát használtam. A DNS fragmentumokat UV transzilluminátor segítségével tettem láthatóvá.

3.4. DNS szekvenálás

A cDNS-ről felsokszorozott amplikonokat szekvenálással is ellenőriztem. A szekvenáló PCR reakciókat egyszerre csak egyféle primerrel végeztem, a hagyományos Sanger-féle módszeren alapuló BigDye Terminator v1.0 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) felhasználásával és a gyártói utasításait követve.

A PCR termékeket DyeEX 2.0 Spin (QIAGEN) reagenscsomaggal tisztítottam meg a felhasználatlan primerektől és a be nem épült jelölt nukleotidoktól. A tisztított mintákat formamiddal denaturáltam. A szekvenálást ABI PRISM 310 Genetic Analyzer egykapillárisos DNS szekvenátor készülékkel történt. Az elektroferogramok kiértékelésére ABI PRISM Sequencing Analysis szoftvert használtam, a szekvenciák további elemzése Chromas és Vector NTI számítógépes programokkal végeztem.

3.5. TaqMan esszé

A cDNS átírásakor Multiscribe RT enzimet (Applied Biosystems) használtam a megfelelő protokollt követve. U6-ra és miR-21-re specifikus primereket használtam, a reakcióelegy összemérését jégen végeztem.

A TaqMan esszét 48-as optikai RT lemezzel végeztem TaqMan Universal Master Mix II reagenssel és U6, illetve miR-21 specifikus TaqMan próbákkal, a gyártó utasításait követve.

A reakciót StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) készüléken végeztem, az eredményeket a rendszer saját szoftverével értékeltem ki.

3.6. miRNS expresszió mérése TaqMan Low Density Array használatával

A miRNS expressziós vizsgálatokra több módszer is létezik^[54]. Ezek közül a TLDA módszert (Life Technologies) alkalmaztam humán minták miRNS expressziós vizsgálatára. A TLDA a TaqMan q-PCR módszeren alapszik. A sejtekből izolált RNS cDNS-sé való átírása egyszerre több száz primerrel történik, így kapjuk meg a RT-PCR végén az összes miRNS jelentős hányadát lefedő molekula populációt. A cDNS-eket hagyományos PCR-ral felszorzozzuk, emiatt az amplifikációs lépés miatt kis koncentrációjú RNS izolátummal is dolgozhatunk. Ez őssejtek esetében különösen hasznos. Az így előkészített mintánkat a TLDA kártyákra mérjük, amelyeken a TaqMan próbák találhatóak. Kártyánként egyszerre 384 mérést végezhetünk, így két kártya (A és B) felhasználásával egy minta miRNomának (teljes miRNS tartalmának) jelentős hányada vizsgálható.

A cDNS átírást TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit-tel és Megaplex RT Primer-ekkel (Applied Biosystems) végeztem a gyártó utasításait követve, 350 ng RNS-sel dolgozva.

A detekció érzékenységének növelése érdekében pre-amplifikációs lépést végeztem TaqMan PreAmp Master Mix és Megaplex PreAmp Primer-ek (Applied Biosystems) felhasználásával a gyártó utasításai alapján.

A Real-Time PCR reakció TaqMan Universal PCR Master Mix-szel (Applied Biosystems) a protokollt követve Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR készüléken 384 lyukú TaqMan Low Density Array-nek megfelelő kondíciókkal futott.

Az eredmények kiértékelése történhet Excel-lel, vagy más statisztikai programmal, például R-rel, aminek használatával az adatok elemzése igencsak meggyorsítható. Az R egy ingyenesen használható, szabadon fejleszthető statisztikai programnyelv^[55]. Bioinformatikusok körében egyre népszerűbb, ugyanis amellett, hogy ingyenes, könnyen is használható, jól dokumentált és a biológiai kutatások során felmerülő legtöbb statisztikai feladathoz előre megírt függvényt tartalmaz, amelyek szabadon átalakíthatóak.

3.7. SYBR Green esszé

A primerek megtervezését a VectorNTI (Invitrogen) szoftverrel végeztem. A vizsgálandó régiók beazonosításához figyelembe vettem a saját TLDA mérésemből származó miRNS expressziós eredményeket, az ENCODE projektből^[56] származó őssejtspecifikus transzkripciós faktorokra vonatkozó kromatin immunprecipitációs (ChIP) adatokat, illetve a repetitív szekvenciákra vonatkozó predikciókat, amelyeket a RepeatMasker (<http://repeatmasker.org>) programmal készítettem.

A SYBR Green méréseket HuES9 és 'embryoid body' mintából izolált totál RNS-en végeztem. Az RNS-ről először Multiscribe RT enzim (Applied Biosystems) cDNS-t írtam át a gyártó utasításait követve.

A SYBR Green esszéket 96-os optikai RT lemezekkel végeztem Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) reagenssel és egyedi, C19MC pri-miRNS specifikus primerekkel a gyártó utasításait kis módosítással betartva.

A qPCR reakció paraméterei a primerek optimális működésének érdekében az alábbiak szerint alakult:

- | | | |
|----------------------------|-------|--------|
| – Polimeráz aktiváció | 95 °C | 30 mp |
| – Amplifikáció (40 ciklus) | | |
| Denaturálás | 95 °C | 15 mp |
| Extenzió | 65 °C | 1 perc |

A reakciót StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) készüléken végeztem, az eredményeket a rendszer saját szoftverével, illetve Excellel és R-rel értékeltem ki.

3.8. A C19MC pre-miRNS-ek és miRNS-ek bioinformatikai vizsgálata

A pre-miRNS szekvenciák illesztését és a filogenetikai fa kiszámítását a CLUSTAL Omega programmal végeztem (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) A szekvenciák illesztésekor az RNS-ekre jellemző alapértelmezett beállításokat alkalmaztam. A filogenetikai fa Neighbour-joining módszerrel készült, az ágak a valós távolságokat mutatják.

A C19MC tagjainak validált célpontjait a következő adatbázisokból gyűjtöttem:

- miRWalk 2.0 (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>),
- miRecords (<http://mirecords.biolead.org/>),
- TarBase v7.0
(<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=tarbase/index>).

A validált célpontok funkcionális elemzését a Gene Ontology Consortium által annotált adatbázis (<http://geneontology.org/>) alapján az AmiGO 2 (<http://amigo.geneontology.org/amigo>) és a Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.7 programmal (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) készítettem. Mindkét program alapértelmezett beállításait használtam, a megjelenített p-értékek mindkét program esetén Bonferroni korrekció utáni értékek.

A miRNS-mRNS hálózatokat a Cytoscape 3.2.0-val (<http://www.cytoscape.org/>) elemeztem és jelenítettem meg.

4. Eredmények és értékelésük

4.1 Az RNS minták minőségének vizsgálata

A HuES9 humán embrionális őssejtből és 6 napos differenciálódott 'embryoid body' (EB) formájából izolált RNS minőségét háromféleképpen ellenőriztem: spektrofotometriával, gélelektroforézissel és TaqMan esszével

4.1.1 Spektrofotometria

Az első módszer a spektrofotometria volt. Ezzel a módszerrel a vizsgált minták koncentrációját és tisztaságát tudtuk megállapítani.

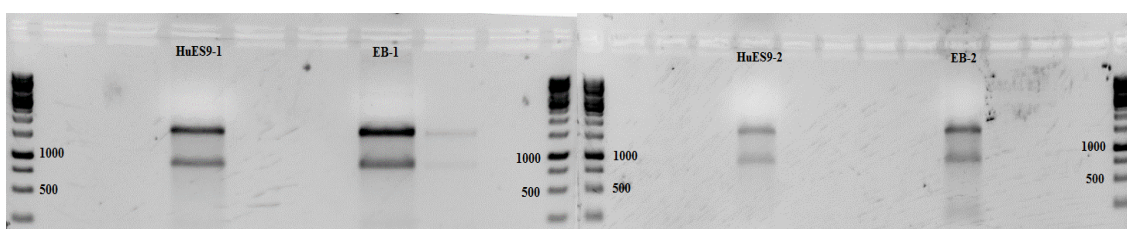
Minta neve	Koncentráció (ng/ul)	A260/A280
HuES9-1	105	1,88
EB-1	521	1,99
HuES9-2	34	1,85
EB-2	77	1,85

1. táblázat: *Spektrofotometria eredményei*

A koncentrációk igen alacsonyak, de ez a későbbiekben nem jelentett problémát, a TaqMan és SYBR Green esszék nagyfokú érzékenysége miatt. Az A260/A280 arány a 260 nm-es hullámhosszon (nukleotidok) és a 280 nm-es hullámhosszon (fehérjék) abszorbancia aránya, a mintában meglévő fehérje szennyeződés nagyságát mutatja. Minél nagyobb ez a szám, annál tisztábbak a minták. Az 1,8 feletti arány nagy tisztaságot jelez.

4.1.2. Gélelektroforézis

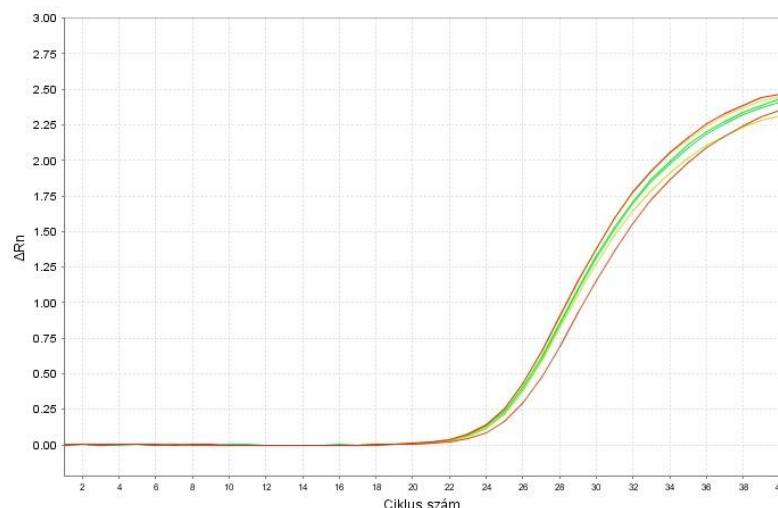
A második ellenőrző módszer a gélelektroforézis volt. A totál RNS izolátumoknak jellegzetes gélelektroforézis képük van, melyet a különböző RNS molekulák alakítanak ki. Jó minőségű RNS minta esetében 2-2 vastagabb csík figyelhető meg, melyek közül a felső jól láthatóan vastagabb, mint az alsó. Ezek a 28S és 18S rRNS-ek mennyiségét mutatják, melyek a legnagyobb mennyiségben íródnak át a sejtekben. Az 1. ábrán látható HuES9 és EB RNS minták gélelektroforézis képük alapján jó minőségűnek mondhatóak.



1. ábra: *HuES9 és EB mintákból izolált totál RNS gélelektroforetikus képe, 1000 bp-os létrákat használva.*

4.1.3. TaqMan esszé

Az RNS minőségének vizsgálata során alkalmazott harmadik módszer a komparatív TaqMan esszé volt. Ebben az esetben a mintáim U6 és miR-21 tartalmát kvantitatív mértem két biológiai párhuzamosban, 3-3 technikai párhuzamost alkalmazva. Az U6 snRNS a miRNS expressziós vizsgálatok során leggyakrabban alkalmazott endogén kontroll, mennyiségének elvileg állandónak kell lennie minden mintában, ezért én is ezt használtam a biológiai párhuzamosok összehasonlítására. A 2. ábra az U6 qPCR-rel mért amplifikációs görbéit mutatják a 3 technikai párhuzamosban. A görbék nagyfokú átfedést mutatnak, ebből következik, hogy a biológiai párhuzamosokban mért U6 mennyisége közel azonos, illetve mennyisége a differenciáció során alig változik, emiatt ideális endogén kontroll.



2. ábra: A minták U6 amplifikációs profilja.

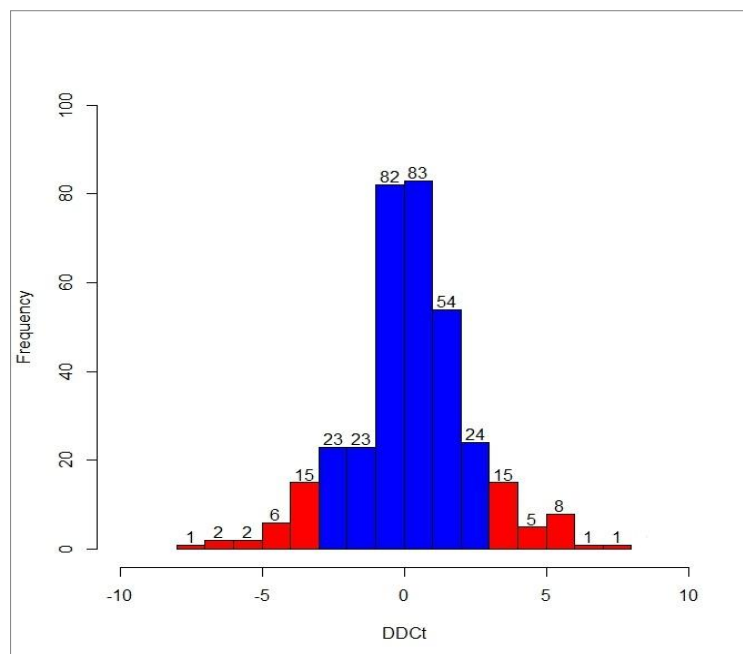
Az U6 és miR-21 C_t értékek összevetésével kapott ΔC_t értékekből származtatott relatív kvantifikációval következtethetünk a miR-21 mennyiségének differenciáció során történő változására. Ebből az látszik, hogy HuES9 mintákban mért értékek alig különböznek egymástól, az EB-kben viszont már nagyban eltérnek. Ennek oka, hogy az 'embryoid body' differenciálódott forma egy spontán bekövetkező, nem pedig irányított differenciáció eredménye. Ezt a megfigyelést a későbbiekben is szem előtt kell tartanunk, a differenciálódott formák közti eltérést elfogadhatjuk, azonban az őssejtekben mért expressziós szintek csak kis mértékben különbözhetnek a biológiai párhuzamosaiktól.

4.2. TLDA eredmények

4.2.1. Őssejtspecifikus miRNS-ek expressziós mintázata

Először a TLDA módszerrel kapott miRNS-ek C_t értékeinek és a kontrollként használt U6 és RNU44 RNS-ek összevetésével kiszámítottam a miRNS-ek ΔC_t értékeit. (A reakció során detektált C_t értékek az adott gén expressziós szintjét jellemzik, és hatékony esszék esetén 1 C_t különbség a gyakorlatban 2^1 , azaz kétszeres expressziós különbséget jelent.) Ezután a differenciálatlan HuES9 embrionális őssejt miRNS-einek ΔC_t értékeit vetettem össze a differenciálódott EB állapotban mért ΔC_t értékekkel. Szigorú beállításokat alapul véve amennyiben a két ΔC_t érték közti eltérés

($\Delta\Delta C_t$) kisebb volt, mint 3, abban az esetben a miRNS-t nem tekintettem specifikusnak egyik állapotra se (2^3 , azaz minimum nyolcszoros különbség). Ezeket a kék oszlopok jelölik. Azokat a miRNS-eket, melyeknek a $\Delta\Delta C_t$ abszolút értéke 3-nál nagyobb volt az ábrán piros oszlopokkal jelöltem. (3. ábra)



3. ábra: miRNS-ek eloszlása $\Delta\Delta C_t$ értékeik alapján, hisztogramon ábrázolva. Differenciációs állapottól független miRNS-ek (kék) nagyobb számban vannak, mint az állapotokra specifikusabbak (piros). Az összejtekre jellemző miRNS-ek a hisztogram baloldalán találhatók.

Ezután már csak a -3-nál kisebb $\Delta\Delta C_t$ értékű miRNS-eket vizsgáltam. Ezek azok a miRNS-ek, melyek expressziója csökken a differenciáció során, azaz inkább az összejt állapotra jellemzőek. Amennyiben az adott miRNS-hez rendelkezésemre állt biológiai párhuzamosban mért expressziós adat is, az összejt-specificitásnak egy további feltételt is támasztottam. A biológiai párhuzamosok értékei közti eltérésnek abszolút értéke kisebb kellett legyen 1-nél. Ebben az esetben valóban az összejtre specifikusan jellemző miRNS-ről van szó. Ezt az A típusú TLDA kártyával mérhető miRNS-ek esetében tudtam elvégezni, amellyel a C19MC klaszter tagjainak túlnyomó többsége (34 miRNS az A kártyán és 5 miRNS a B kártyán) is vizsgálható. Az A típusú TLDA kártyával mérhető összejt specifikus miRNS-eket az 2. táblázatban foglaltam össze, $\Delta\Delta C_t$ értékeik szerint rendezve, illetve feltüntetve azt is, hogy a C19MC

klaszter tagjai-e. Amennyiben biológiai párhuzamosok értékei nem álltak rendelkezésemre, ezt a feltételt nem tudtam figyelembe venni. Ez a B típusú TLDA kártyával mérhető miRNS-ek esetében volt így.

MiRNS neve	$\Delta\Delta C_t$	C19MC klaszter tagja?
hsa-miR-134	-7,298448	nem
hsa-miR-518f	-5,443868	igen
hsa-miR-411	-4,282949	nem
hsa-miR-518a-3p	-3,856467	igen
hsa-miR-433	-3,590058	nem
hsa-let-7e	-3,464300	nem
hsa-miR-520g	-3,204912	igen
hsa-miR-29a	-3,161722	nem
hsa-miR-410	-3,091283	nem

2. táblázat: Össejtspecifikus miRNS-ek:

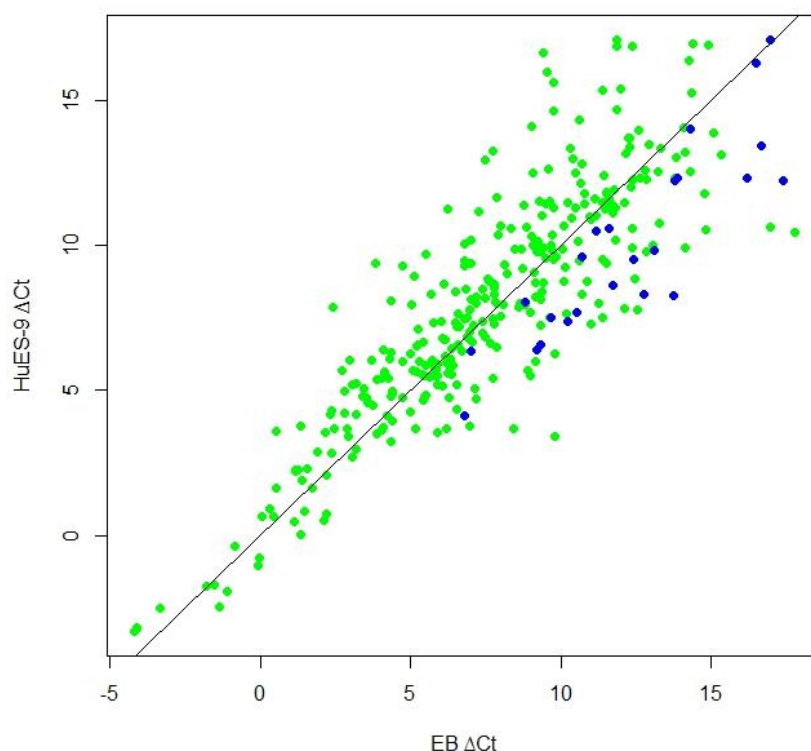
olyan miRNS-ek, melyek teljesítik az alábbi szűrési feltételeket:

- biológiai párhuzamosok ΔC_t értékei közti eltérés abszolút értéke kisebb 1-nél

- HuES9 és EB állapot ΔC_t értékei közti eltérés ($\Delta\Delta C_t$) kisebb -3-nál

A C19MC tagjai zölddel kiemelve.

A 2. táblázatból látszik, hogy az össejtspecifikusnak mondott C19MC klaszter tagjai közül a szűrési feltételeimnek mindössze három felelt meg. Ezért megvizsgáltam, mi a helyzet a miRNS klaszter többi tagjával. Egyrészt azt találtam, hogy néhány miRNS a biológiai párhuzamosokban mért túlzott eltérés miatt nem jutott át a szűrési feltételeken. Másrészt, ahogy a 4. ábrán látszik, egy kivétellel az össejtspecifikusnak mondott C19MC klaszter minden tagjának lecsökkent az expressziója a differenciáció során, azonban nem egyforma mértékben, azaz a $\Delta\Delta C_t$ értékek közt nagy a variabilitás. A klaszter miRNS-eit egymáshoz viszonyítva szembevetve az is, hogy ΔC_t értékeik nagyban eltérnek HuES9-ben és EB-ben is. Ennek legvalószínűbb magyarázata, hogy transzkripcionális szinten eltérőképpen szabályozódnak.



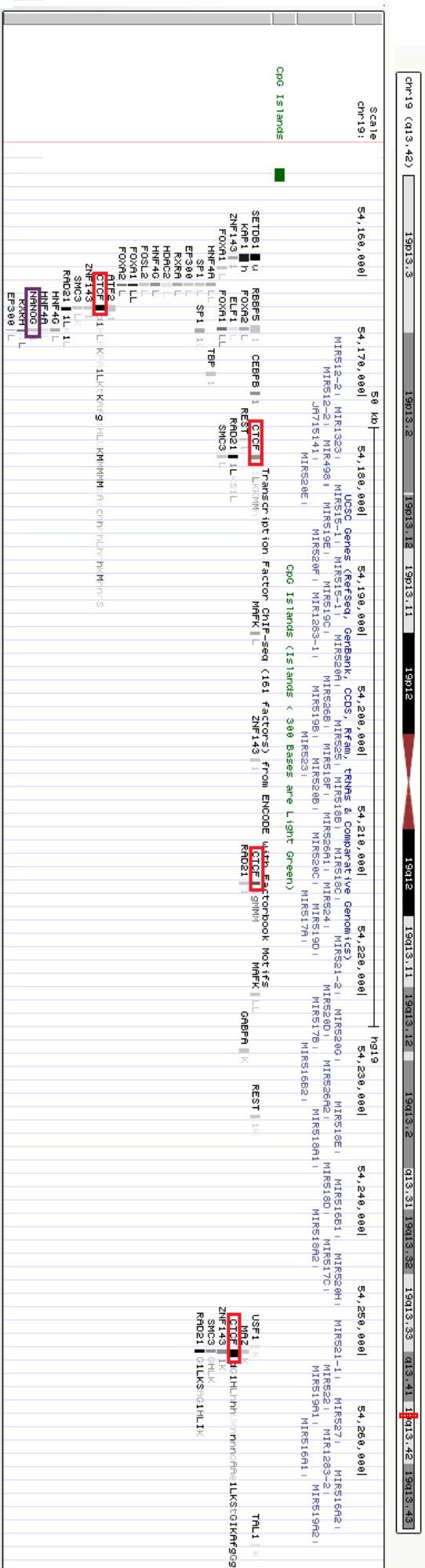
4. ábra: C19MC klaszterbe tartozó miRNS-ek (kék pontok) és további miRNS-ek (zöld pontok) eloszlása HuES-9-ben és EB-ben mért ΔC_t értékeik alapján, szórásvázlagra.

4.3. A C19MC bioinformatikai vizsgálata

4.3.1. Transzkripció faktorok

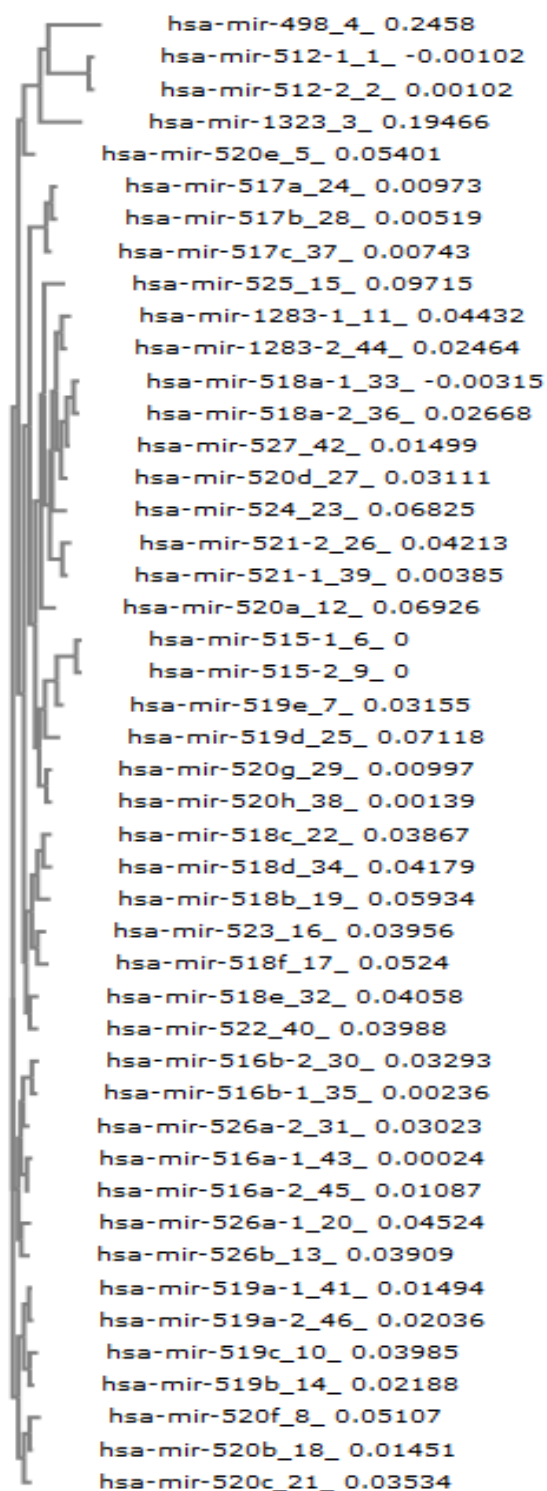
A klaszteren belüli eltérő transzkripció aktivitások hipotézisét erősítik az ENCODE projektből származó ChIP-seq adatok is, amik a klaszteren belüli transzkripció faktor kötőhelyek létére utalnak (5. ábra). Különösképpen igaz ez a H1 humán embrionális sejtvonalban detektált Nanog és CTCF kötőhelyekre. Előbbi a C19MC-t kódoló régió előtt, míg utóbbi a C19MC előtt és azon belül is, összesen 4 példányban található meg. Nanog egy őssejtspecifikus transzkripció faktor, CTCF pedig egy olyan fehérje, ami inzulátorként befolyásolhatja a klaszter metiláltsági állapotát, ezzel a klaszteren belül alklasztereket hozva létre.

90



Nanog kötőhely lila keretben, CTCF kötőhely piros keretben. A zöld téglalap CpG szigetet jelöl.

4.3.2. A pre-miRNS szekvenciák vizsgálata



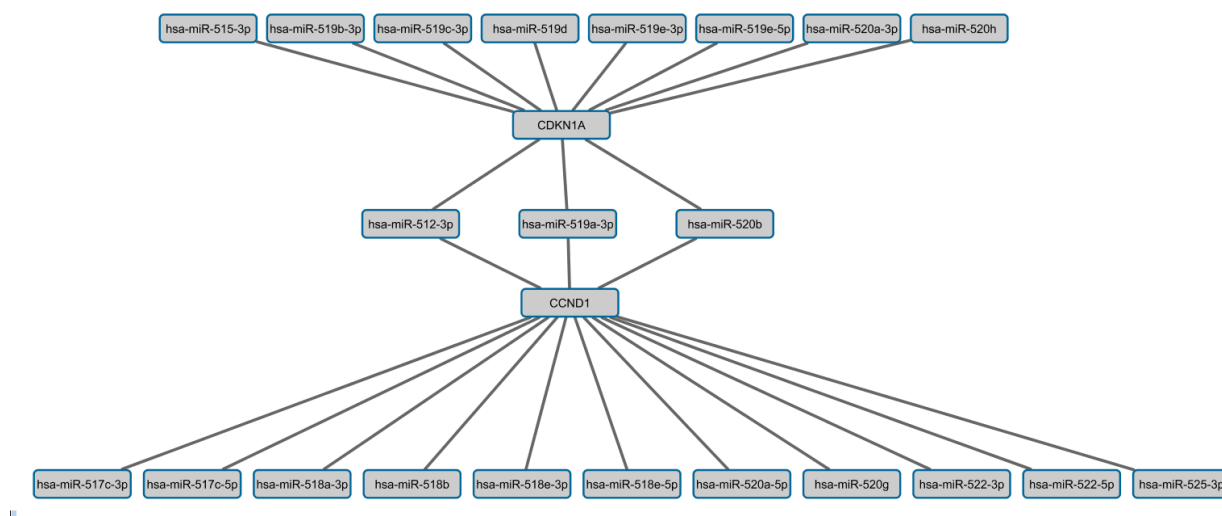
6. ábra: A C19MC pre-miRNS-ek Neighbour-joining módszerrel készült filogenetikai fája. Az ágak hossza a valós távolságokat mutatják. A pre-miRNS-ek neve, klaszteren belüli pozíciójuk és a páronkénti távolságok kerültek megjelenítésre.

Egyéb módszerekkel is kerestem klaszteren belüli csoportokat. Egyik ilyen módszer a pre-miRNS-ek szekvenciáinak illesztése és filogenetikai vizsgálata. A teljesen azonos miRNS-eket kódoló pre-miRNS-ek szekvenciájában is előfordulhat különbség, ezért a pre-miRNS-ekről könnyebb megmondani, hogy a klaszteren belül melyik hajtúkanyar szerkezetben helyezkednek el. Ezzel szemben az éret miRNS-ek esetében ez a pre-miRNS-ek duplikációja miatt nem mindig lehetséges. A pre-miRNS-ek neve után pozíciójuk és a páronkénti távolságok szerepelnek (6. ábra).

Szekvenciájukat tekintve a legegységibb pre-miRNS-ek a klaszter elején találhatóak, 1-4. pozícióban. Ez is megerősíti azt a hipotézisemet, hogy a klaszter elején elhelyezkedő miRNS-ek a klaszter többi tagjához képest más célpontokat regulálhatnak, emiatt expressziós szabályozásukban is eltérés lehet, akár transzkripcionális szinten is.

4.3.3. A miRNS-ek validált célpontjainak *in silico* elemzése

A C19MC pre-miRNS-einek szekvenciái nagyon hasonlóak, emiatt az érett miRNS-eké és seed régióiké is, ez a miRNS célpont predikciókat megbízhatatlanná teszi. Ezért validált célpontokat kerestem a miRNS-ekhez. 3 adatbázisban, összesen 253 validált miRNS-mRNS kapcsolatot találtam, 44 miRNS és 137 gén között. A legtöbb kapcsolattal rendelkező miRNS a hsa-miR-519-3p, gén a CCND1, a második pedig az CDKN1A. Ezt a két gént összesen 22 miRNS képes szabályozni a 44-ből, 11 a CCND1-et, 8 a CDKN1A-t, 3 pedig mindkettőt (7. ábra).



7. ábra: A két legtöbb kapcsolattal rendelkező gén (CCND1 és CDKN1A) és az őket szabályozó miRNS-ek hálózata.

A génontológiai elemzést háromszor végeztem el két programmal (DAVID 6.7 és AmiGO 2), először az összes célpontra (137 gén), majd azokra, amelyeket legalább két miRNS (53 gén) szabályoz, végül csak azokat vizsgáltam, amiket három miRNS is regulál (24 gén). Az eredmények közt az alacsony p-értékkel rendelkező, releváns annotációkat kerestem. A DAVID esetében a legalacsonyabb p-értékű annotációk általában relevánsak is voltak, azonban az AmiGO által számított legvalószínűbb annotációk közt több nagyon általános is szerepelt, mint például sejt folyamatok szabályozása, biológiai folyamatok pozitív szabályozása, így ezt a programot használva specifikusabb információkat kerestem az eredmények között.

A DAVID a 137 gén mindegyikét felismerte a funkciók között szerepelt több sejthalál szabályozásával (p-érték: $5,5E-19$) kapcsolatos is, amik közül a legspecifikusabb az apoptózis negatív szabályozása (p-érték: $5,9E-18$). Megjelenik még a sejtproliferáció szabályozás (p-érték: $1,1E-13$) és az organikus származékokra való reakció (p-érték: $1,1E-11$). A gének szűkebb halmazát vizsgálva is hasonló eredményeket kaptam, azonban a p-értékek megnöttek. Ebben az esetben is több a sejthalállal kapcsolatos funkció került elő, a legnagyobb valószínűséggel apoptózis negatív szabályozása (p-érték: $6,3E-7$). Felbukkantak olyan funkciók is, mint a sejt migráció szabályozása (p-érték: $2,5E-6$) és a sejtmozgás szabályozása (p-érték: $3,7E-8$). A gének legszűkebb halmazán a legmagasabb predikciós értékel különböző stimulusokra adott reakciók szabályozása szerepeltek például: hatóanyagokra (p-érték: $3,3E-8$), hormonokra (p-érték: $6,2E-8$), fém ionra (p-érték: $5,1E-5$). Továbbá ebben az esetben is igencsak elől szerepelt a sejt proliferáció szabályozása (p-érték: $1,8E-6$).

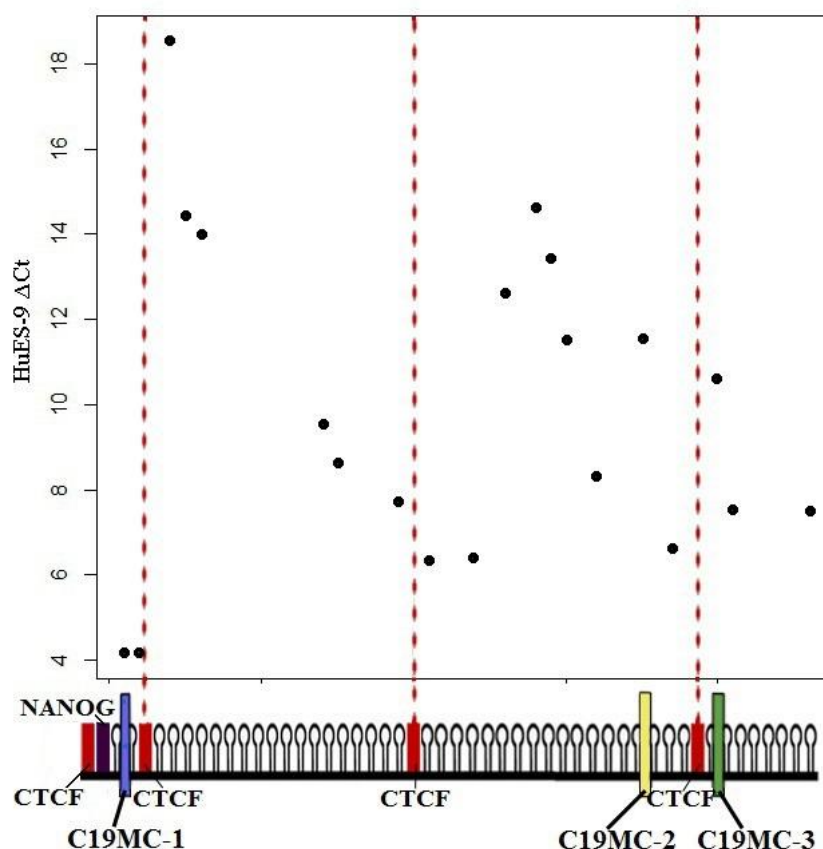
Az AmiGO által prediktált funkciók hasonlítottak a DAVID-éira, de azért némi eltérés mutatkozott. A program 137 génből 133-at ismert fel, ebben az esetben is a sejthalál szabályozása (p-érték: $1,8E-28$) volt az egyik legvalószínűbb funkció, illetve megjelent a szignáltranszdukció szabályozása (p-érték: $3,3E-25$). A szűkített halmazra nagy valószínűséggel prediktálta a szignáltranszdukció pozitív szabályozását (p-érték: $6,5E-15$), illetve a sejt differenciációt (p-érték: $8,7E-15$). A gének legszűkebb csoportjára többek közt sejtproliferáció szabályozást (p-érték: $8,5E-08$) és hatóanyagokra való reakciót (p-érték: $6,6E-07$) számította.

4.4. C19MC pri-miRNS-ének kvantitatív vizsgálata SYBR Green qPCR-ral

4.4.1. Primerek megtervezés SYBR Green esszéhez

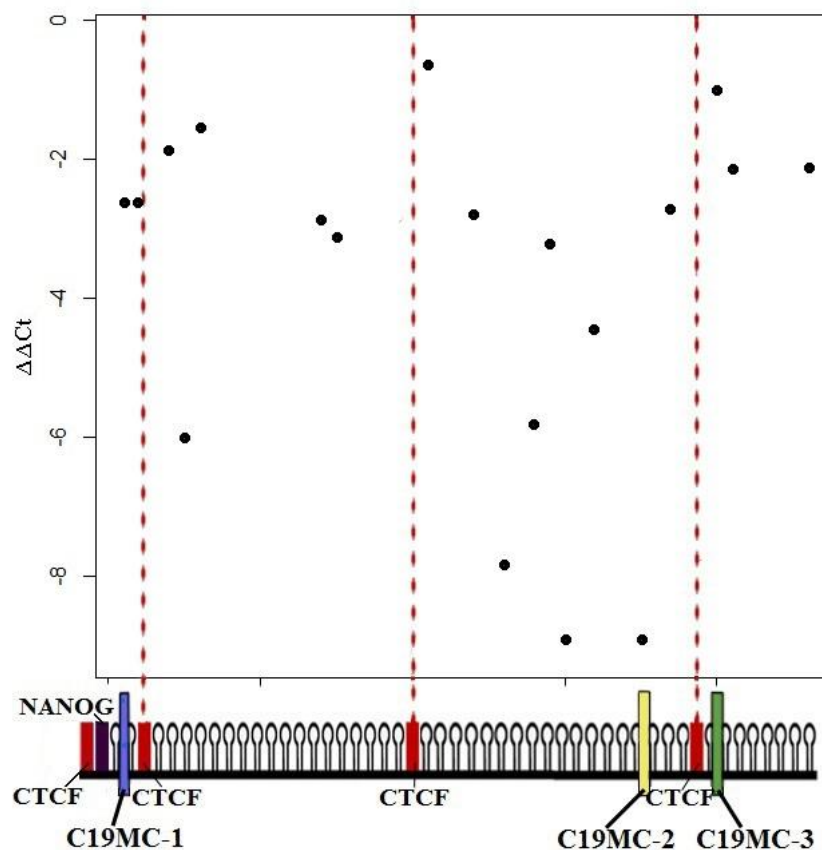
Hipotézisem igazolásához primereket terveztem a klaszter pri-miRNS-ének releváns szakaszainak kvantitatív vizsgálatához. A primerek megtervezése során nehézséget jelentettek a klaszteren belüli repetitív szekvenciák, amelyekről az optimálisnál alacsonyabb hibridizációs hőmérsékleten aspecifikus termékek képződhetnek, amik befolyásolhatják a qPCR mérés pontosságát. A 8. ábra a primer párokkal kijelölt szakaszokat a klaszteren belüli elhelyezkedésük és a miRNS-ek HuES9-ben mért ΔC_t értékük függvényében mutatja. A klasztert sematikus ábra jeleníti meg, amely mutatja a pre-miRNS-eket (hurkok), a Nanog és CTCF kötőhelyeket (lila, illetve piros téglalapok) és a primer párokkal kijelölt mérési pontokat (C19MC-1 (kék), C19MC-2 (sárga), C19MC-3 (zöld)). Mivel előfordulhat, hogy a TLDA kártyán szereplő próbák nem minden miRNS esetében a legrelevánsabb 3'-izoformáira specifikusak, csak az azokkal a próbákkal mért eredményeket tartottam meg, amelyek szekvenciáit a miRBase-en található mély-szekvenálási adatokkal összevetve a leggyakoribb 3'-izoformákra specifikusnak találtam.

Látszik, hogy a miRNS-ek expressziós szintje az esetleges technikai hibák szűrése után is nagy szórást mutat (8. ábra). A hsa-miR-512 pre-miRNS két példánya a klaszter elején helyezkedik el. Az érett miRNS-ek mindkét pre-miRNS-ből képződhetnek, ez azonban legfeljebb 1 C_t -nyi (kétszeres) különbséget jelenthet az egy kópiában meglévő miRNS-ekhez képest. Ennek a miRNS-nek a legmagasabb az expressziós szintje (4,15 ΔC_t) ami több, mint majdnem ötszöröse ($2^{2,25}$) a második hsa-miR-520c mennyiségének (6,4 ΔC_t). A hsa-miR-512 közelében egy CTCF kötőhely van, amely másik oldalán található miRNS-ek mindegyikének sokkal kisebb expressziós szintet mértünk. Ez arra utal, hogy a hsa-miR-512 környezetének magasabb transzkripció aktivitása van, mint a klaszter többi részének, ezért az első mérési pontot (C19MC-1) itt jelöltem ki. A második (C19MC-2) és harmadik (C19MC-3) primer párt olyan szakaszokra terveztem, amelyek környezetében alacsony expressziójú miRNS-ek találhatóak. Emellett tervezésükkor azt vettem még figyelembe, hogy a két szakasz egy CTCF kötőhely két oldalára és ezáltal feltételezetten különbözőképpen regulált régiókba esnek.



8. ábra: A primer párokkal kijelölt szakaszok (C19MC-1, -2, -3; kék, sárga, zöld téglalapok) elhelyezkedése a klaszteren belül, a miRNS-ek és a hozzájuk tartozó HuES9-ben mért ΔC_t értékek függvényében. A Nanog és CTCF kötőhelyeket lila, illetve piros téglalapok jelölik, a piros szaggatott vonal pedig a CTCF kötődés alapján feltételezett alklaszterek határát jelzi..

A ΔC_t értékek szintén nagy variabilitást mutatnak a klaszteren belül (9. ábra), azaz a miRNS-ek szintje a differenciáció során különbözőképpen változnak. Az első primer párral (C19MC-1) mért régióban a miRNS-ek ΔC_t értékei -2,5 körüli, a második régióban (C19MC-2) régióban alacsonyabb -4 és -9 közöttiek ezek az értékek. A harmadik régióban (C19MC-3) a legmagasabbak ΔC_t értékek, -1 és -2 közöttiek. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a klaszter elejének és végének transzkripciója kisebb mértékben változik, mint a C19MC-2 régióé.



9. ábra: A primer párokkal kijelölt szakaszok (C19MC-1, -2, -3; kék, sárga, zöld téglalapok) elhelyezkedése a klaszteren belül, a miRNS-ek és a hozzájuk tartozó $\Delta\Delta C_t$ értékek függvényében. A Nanog és CTCF kötőhelyeket lila, illetve piros téglalapok jelölik.

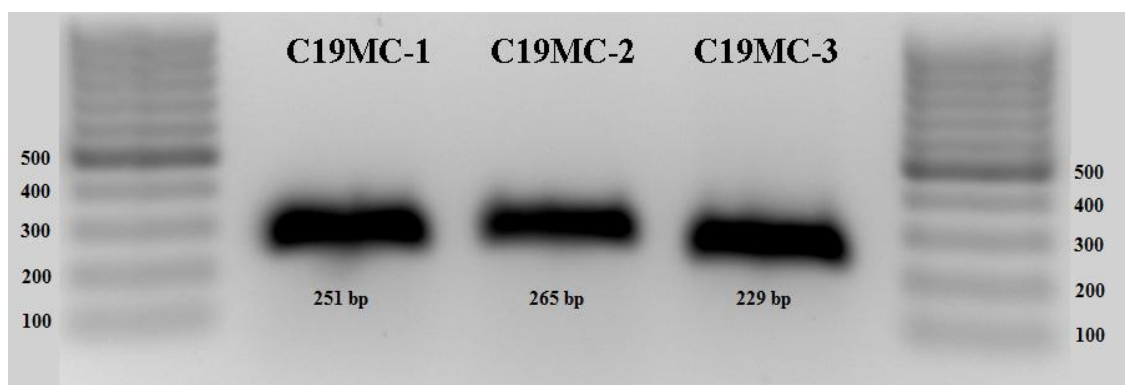
4.4.2. SYBR Green esszéhez tervezett primerek optimalizálása

Primer neve	Szekvencia	Olvadáspont	Amplikon hossza
C19MC-1For	5'- TAACTGGTGGTCAGCTTACAATGTG	65,8°C	251 nukleotid
C19MC-1Rev	5'- CGAAAGTTGCATCTGTACGACTGG	68,6°C	
C19MC-2For	5'- TTCGCTCTGCTCCTGGCTGTC	71,3°C	265 nukleotid
C19MC-2Rev	5'- GGCCTGGGAAGCTGCCTTCGGC	78,9°C	
C19MC-3For	5'- GGAATTAGAGGTGTGAGCCGC	66,9°C	229 nukleotid
C19MC-3Rev	5'- CAACAGCAATGGATGGAGAGC	66,9°C	

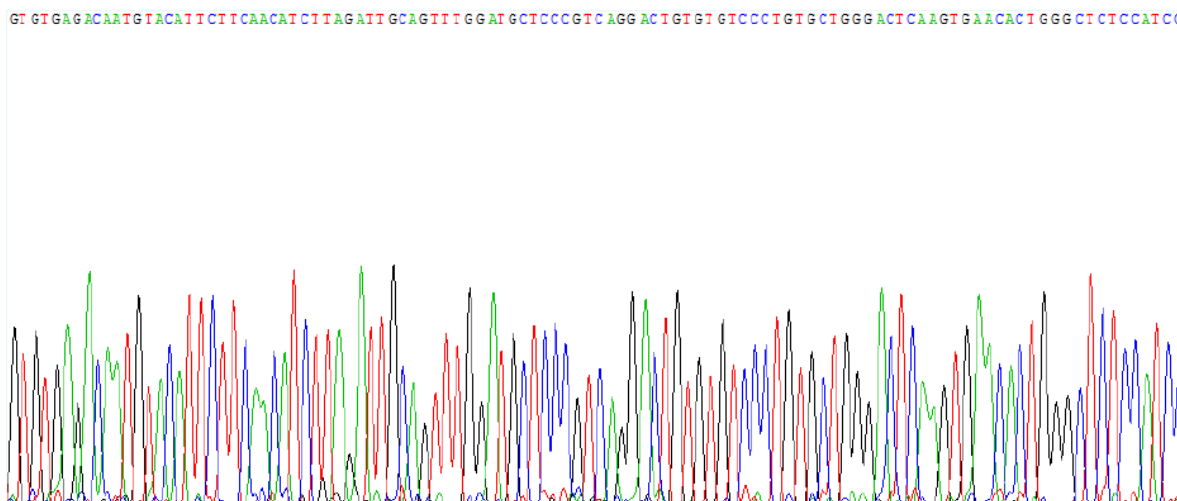
3. táblázat: A primerek neve, szekvenciája, olvadáspontja és primer párokkal kijelölt szakasz hossza.

Az 2. táblázat a primerek nevét, szekvenciáját és egyéb olyan paramétereit tartalmazza, amelyek befolyással lehetnek a qPCR mérés beállításaira. A primerek validálását PCR reakciókkal (10. ábra) genomi DNS-ről és HuES9-ből izolált totál RNS-ről átírt cDNS-eken is sikeresen elvégeztük. A PCR reakció termékeit gélelektroforézissel mindkét esetben ellenőriztük. HuES9 minta cDNS-ének esetében szekvenálást is végeztünk, amely egyértelműen megerősítette, hogy az amplikonok a vizsgálni kívánt régiókról íródtak át. A 11. ábra egy reprezentatív szekvenálási kromatogramot mutat.

A primerek optimalizálása érdekében a PCR reakciókat 55°C, 60°C és 65°C hibridizációs profillal is lefutattam. 55°C-on és 60°C-on a C19MC-3-as primer pár aspecifikus termékeket is amplifikált ezért emeltem a hibridizációs lépés hőmérsékletét 65°C-ra, amikor a primerek már specifikusan csak a kívánt régiót amplifikálták (10. ábra) genomi DNS-ről, illetve HuES9 cDNS-ről is.



10. ábra: *Primerek validálása és optimalizálása genomi DNS-en, 65°C-os hibridizációval, 100 bp-os létrák használatával.*

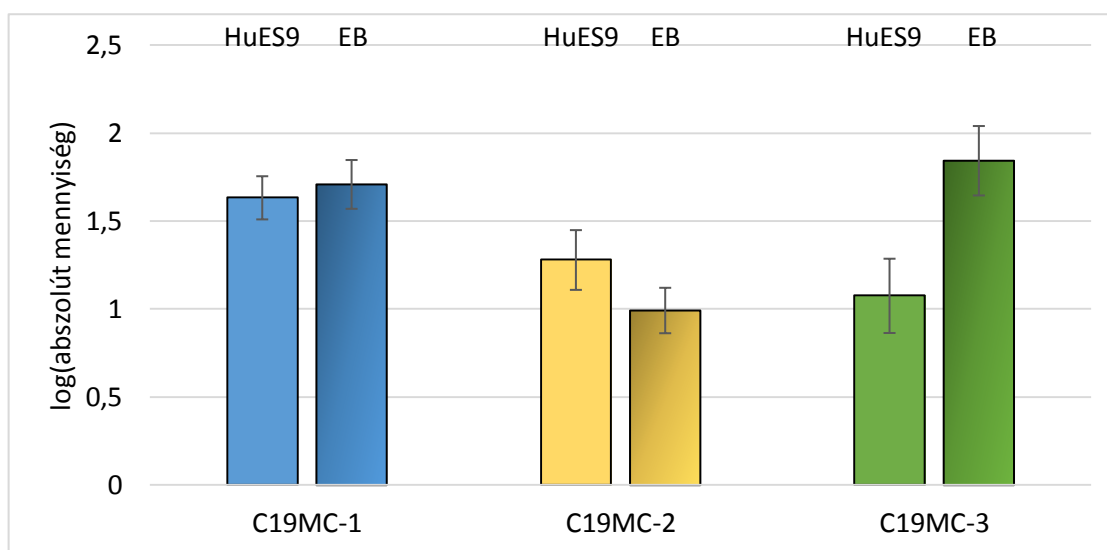


11. ábra: *C19MC-2* amplikon egy szakaszának szekvenálási kromatogramja.

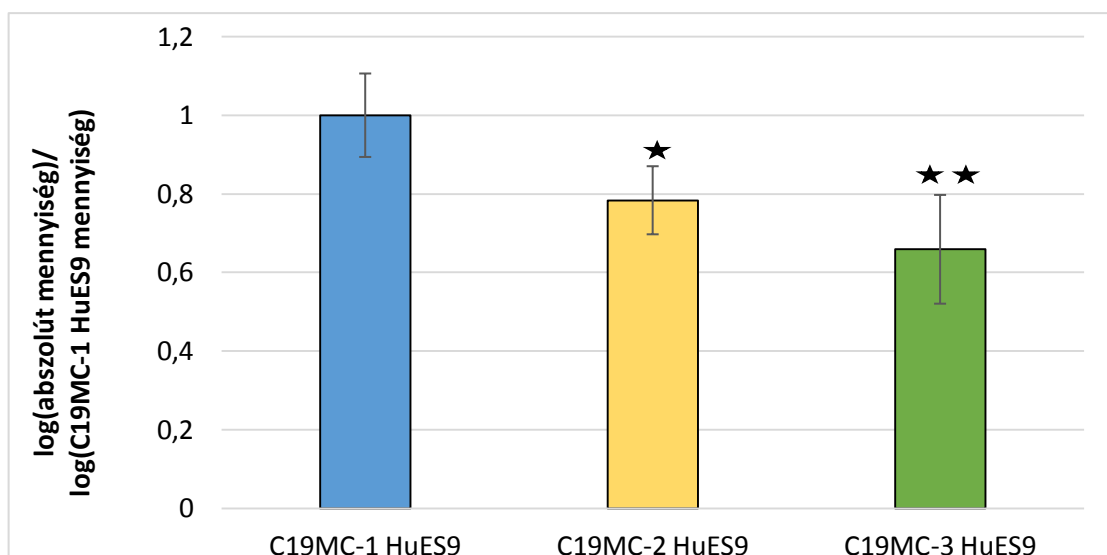
4.4.3. SYBR Green qPCR mérések eredményei

A primerek validálása és optimalizálása után elvégeztem a SYBR Green méréseket, a C19MC pri-miRNS-ének transzkripcióját vizsgálendő. Mivel egyedi, általam tervezett primerekkel dolgoztam, így nem tudhattam azok hatékonyságát, ezért minden mérésnél az abszolút kvantitatív módszert alkalmaztam. A kalibrációs görbéket pGEM vektorokba ligált C19MC-1, C19MC-2 és C19MC-3 amplikonok hígítási sorával hoztam létre. Minden esetben 3 technikai párhuzamost és 4-szeres hígítást alkalmaztam a kalibrációs pontok kimérésekor. A rendszerek hatékonysága 86,4% és 107,7% között mozgott, ezért relatív kvantitáláshoz további optimalizálásuk, illetve egy megfelelő endogén kontroll szükségesek.

A 12. ábra a három primer párral (C19MC-1, C19MC-2, C19MC-3) a klaszter elején, belsejében és a végén, két mintán (HuES9 és EB) elvégzett hatféle mérés eredményeit mutatja. A grafikon alapján megállapítható, hogy a klaszter különböző szakaszai különbözőképpen szabályzódnak a transzkripció során. A továbbiakban ezeket az eredményeket mutatom be az expressziós eltérések különböző aspektusaira rávilágítva.

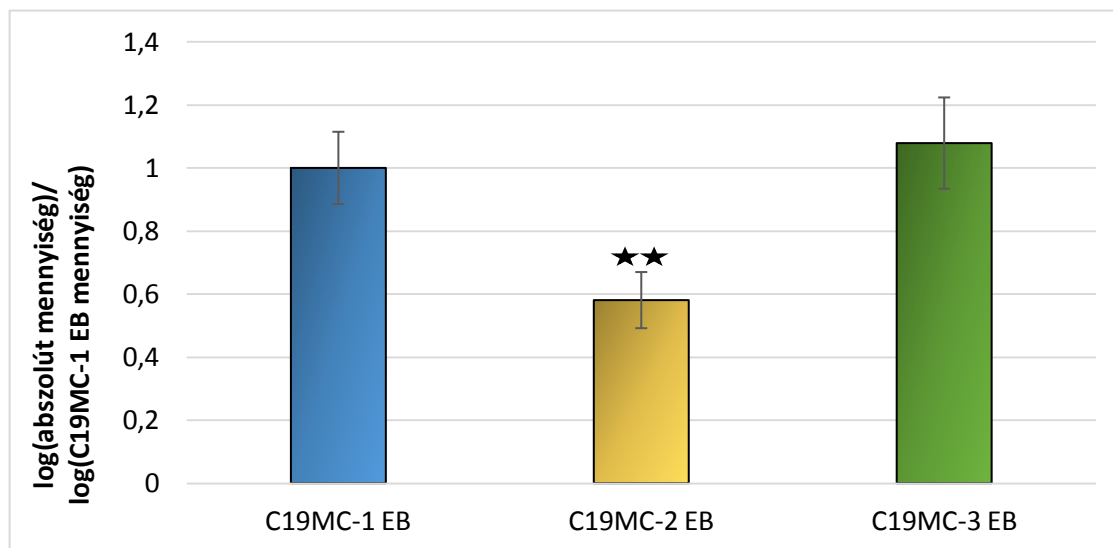


12. ábra: A C19MC pri-miRNS-ének három primer párral (C19MC-1 (kék), C19MC-2 (sárga), C19MC-3 (zöld)) HuES9-ben és EB-ben mért mennyisége.



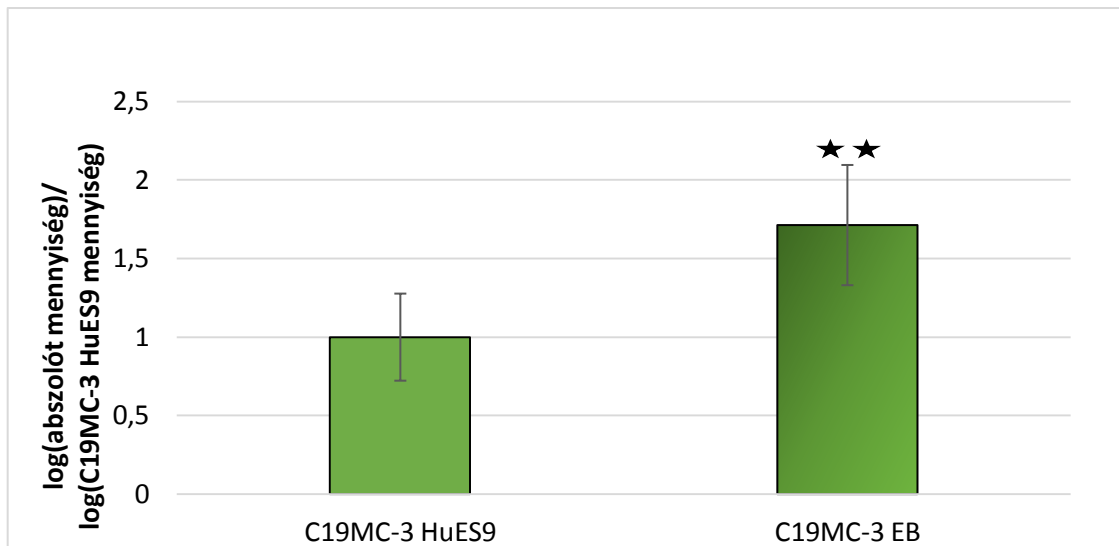
13. ábra: A C19MC pri-miRNS-ének három primer párral (C19MC-1 (kék), C19MC-2 (sárga), C19MC-3 (zöld)) HuES9-ben mért mennyisége, a klaszter elejére specifikus primerekkel (C19MC-1) mért mennyiségre normalizálva. (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,001$)

A 13. ábra az mutatja be, hogy HuES9-ben a klaszter eleje szignifikánsan erősebben expresszálódik, mint a másik két szakasza. Tehát összejt állapotban a C19MC transzkripciója nem egyben szabályozódik, hanem legalább két transzkripciós egységet különíthetünk el, egyik, amelyikbe a C19MC-1 primer párral mért szakasz is beleesik, másik pedig a C19MC-2-t és C19MC-3-t is magában foglaló régió.



14. ábra: A C19MC pri-miRNS-ének három primer párral (C19MC-1 (kék), C19MC-2 (sárga), C19MC-3 (zöld)) EB-ben mért mennyisége, a klaszter elejére specifikus primerekkel (C19MC-1) mért mennyiségre normalizálva. (**: $p < 0,001$)

EB állapotban a klaszter elején és végén szignifikánsan nem különböző expressziós értékeket mértünk, míg a középső szakasz transzkripciós aktivitása az elejétől, illetve végétől is szignifikánsan eltér (14. ábra). Ezek alapján EB állapotban is átíródnak a klasztertől függetlenül kisebb részek is. Ebben az esetben a C19MC-1 és C19MC-3 primer párokkal azonos expressziós szintet, míg a C19MC-2 primer párral ettől szignifikánsan eltérőt mértem. Ez azt jelenti, hogy a differenciáció során a klaszter elejének és végének transzkripciós aktivitása kiegyenlítődik.



15. ábra: A C19MC pri-miRNS-ének a C19MC-3-mal HuES9-ben és EB-ben mért mennyisége, a HuES9-ben mért mennyiségre normalizálva. (**: $p < 0,001$)

A 15. ábrán a differenciáció során a klaszter végén bekövetkező transzkripció aktivitás változására mutatok rá. A C19MC-3 primer párral mért harmadik régió mennyisége megnő a differenciáció során (15. ábra), ezzel szemben az első és a középső régió expressziója szignifikánsan nem különbözik HuES9 és EB állapot között. Ebből következik, hogy a 14. ábrán látható, a klaszter eleje és vége közti kiegyenlítődés a harmadik régió transzkripció aktivitásának növekedésének eredménye.

5. Diszkusszió

Munkám első célja a C19MC összejspecificitásának validálása volt HuES9 humán összejtvonalon. Ennek elérése érdekében egy nagyáteresztő-képességű módszert, a TaqMan Low Density Array-t (TLDA) alkalmaztam. Ezzel a módszerrel mértem HuES9-ből és 'embryoid body' (EB) differenciálódott formájából izolált RNS mintákban több, mint 600 miRNS expressziós szintjét. Az RNS minták minőségét spektrofotométerrel, gélelektroforézissel és TaqMan esszével ellenőriztem. A mérési eredményeket R programnyelv használatával kiértékelve a két differenciációs állapotot összevetésével kvantitatívan tudtam meghatározni a miRNS-ek differenciáció során bekövetkező expresszió szint változását. Szigorú szűrési feltételek után a C19MC klaszter egy részének sikeresen validáltam összejspecificitását. A szűrési feltételek enyhítésével, egy kivétellel a klaszter többi eleméről is megmutattam, hogy a differenciáció során csökken az expressziója. Ez azt jelenti, hogy a klaszter tagjainak expressziós szintje csökken, de a csökkenés mértéke eltérő. Továbbá az eredmények rávilágítottak, hogy az elvileg együtt átíródó miRNS-ek expressziós szintje HuES9-ben és EB-ben is nagyon eltérnek. Munkám folytatását erre a megfigyelésre alapoztam.

Második céloom az expressziós eredmények alapján felmerülő kérdések megválaszolása volt bioinformatikai és molekuláris biológiai eszközökkel. A kérdések a klaszter transzkripciójára, és az azt szabályzó mechanizmusokra vonatkoztak. Ezért az ENCODE projektből származó Chip-seq adatok gyűjtésével kezdtem. Ezeket felhasználva olyan transzkripciós faktorok kötőhelyeit kerestem, amik összejtekben befolyásolhatják a klaszter transzkripcióját. A klaszter előtt egy Nanog és egy CTCF kötőhely van, továbbá a klaszteren belül is van három CTCF kötőhely. Nanog egy összejt specifikus transzkripciós faktor, a klaszter promóter régiójához közeli kötőhelyekhez bekötve az egész klaszter transzkripcióját serkentheti. A CTCF fehérjék inzulátorok, amik a kromatin szerkezetének befolyásolásával hatással vannak az epigenetikai módosításokra, és ezáltal elkülöníthetnek egymástól független transzkripciós egységeket. Ez a C19MC esetében különösen izgalmas, ugyanis a klaszter promótere előtt elhelyezkedő CpG szigetek, és a klaszteren belüli általam is prediktált repetitív szekvenciák a differenciáció során metilálódnak, ami miRNS-ek expressziójának a gátlását okozza. Az elméletem szerint a klaszteren belüli

kötőhelyeihez bekötve a CTCF képes a klaszter metiláltsági állapotát befolyásolni, ami rövidebb pri-miRNS formák képződéséhez, és a miRNS-ek eltérő expressziós szintjeihez vezet. Ezt az elméletet megerősítendő bioinformatikai analíziseket és molekuláris biológiai kísérleteket végeztem.

A klaszter pre-miRNS-einek filogenetikai analízise megmutatta, hogy a legegyszerűbb szekvenciával a klaszter elején elhelyezkedő pre-miRNS-ek rendelkeznek, emiatt ezeknek lehet a klaszter többi tagjától leginkább eltérő célpontjaik, ami indokolná egyedi szabályzásukat.

A klaszter funkciójának vizsgálatához kísérletesen validált célpontokat gyűjtöttem webes adatbázisokból. A célpont gének funkcióit génontológiai adatbázis felhasználásával határoztam meg. Több programmal és a gének különböző halmazával is elvégeztem az analíziseket. Az eredmények alapján a klaszter szerepet játszik az apoptózis, a sejtproliferáció és sejt differenciáció szabályozásában, illetve különböző stimulusokra adott reakciók kialakításában. A validált célpontok közül a CCND1-t képes a legtöbb miRNS szuppresszálni. Ez a gén fontos szerepet tölt be a sejtciklus szabályozásban. Ciklin-dependens kinázok inhibitoraként képes a sejtciklust a G1/S fázisban tartani, így a sejt osztódás helyett differenciálódásba kezd. Azzal, hogy a miRNS-ek gátolják ennek a génnek az expresszióját a sejtproliferációt serkentik és a sejt differenciációt gátolják. Az, hogy a validált célpontok között további sejtciklus gének is szerepelnek, arra utal, hogy a C19MC tagjai képesek a sejtciklust több ponton is szabályozni.

A bioinformatikai analízisek után primer párokat terveztem a C19MC pri-miRNS-ének kvantitatív vizsgálatához. A primereket (C19MC-1, -2, -3) úgy terveztem meg, hogy a klaszterben sűrűn elhelyezkedő repetitív szekvenciák ellenére a pri-miRNS adott részére specifikusak legyenek. Továbbá figyelembe vettem, hogy a mért régiók a CTCF kötőhelyekhez viszonyítva hogyan helyezkednek el. Mindhárom primer párral kijelölt szakasz CTCF kötőhelyekkel el van választva egymástól, így ha hipotézisem helyes, különböző expressziós szinteket kell mérnem az elsődleges átiratokon. A primerek tervezésekor számításba vettem a TLDA mérés eredményeit is. Az első primer pár (C19MC-1) a leginkább expresszálandó miRNS-ek mellé terveztem, ezzel szemben a másik kettő primer pár környezetében elhelyezkedő miRNS-ek szintje alacsonyabb volt. Ez alapján azt vártam, hogy a legmagasabb értéket az első primer párral mérjem. Továbbá a TLDA mérés eredményi alapján a C19MC-1 és C19MC-3 közelében lévő miRNS-ek $\Delta\Delta C_t$ értékei hasonlóak, míg a

C19MC-2 közelében lévők sokkal alacsonyabb. Ennek egy lehetséges oka a C19MC-2 transzkripciós aktivitásának a C19MC-1-nél és C19MC-3-nál nagyobb mértékű csökkenése.

A C19MC pri-miRNS mérésekhez SYBR Green qPCR-t alkalmaztam, a kvantitálás során hígítási sorok alapján abszolút mennyiségeket számítottam. HuES9-ben és EB-ben is eltérő szinteket mértem a három primer párral. HuES9-ben C19MC-1 szint szignifikánsan magasabb, mint a C19MC-2 és C19MC-3 szint. EB-ben a C19MC-2 szintje továbbra is alacsony, a C19MC-1 és C19MC-3 szintje viszont kiegyenlítődik. Ennek oka a C19MC-3 szintjének szignifikáns megemelkedése EB-ben. Ezek az eredmények megerősítik, hogy a klaszter különböző részei transzkripcionális szinten különbözőképpen szabályozódnak, ami nagyvalószínűséggel a miRNS-ek expressziós szintjeire is hatással van.

A TLDA és a SYBR Green eredmények a fenti elképzelések mellett arra is utalnak, hogy a C19MC miRNS-ek mennyiségének csökkenését az EB állapotban elsődlegesen nem a klaszter transzkripciós aktivitásának csökkenése okozza, hanem egy másik, a miRNS-ek szintjét csökkentő hatás fokozódása. A klaszter végének (C19MC-3) megnövekedett transzkripciója ezt képes bizonyos mértékben ellensúlyozni, ezzel szemben a C19MC-2 régiónak a transzkripciója is gyengül, így az érett miRNS-ek szintje a két negatív hatás eredményeként drasztikusan lecsökken. A klaszter elejének (C19MC-1) mindkét differenciációs állapotban magas a transzkripciója, azonban az ismeretlen negatív hatás ezeket a miRNS-eket is érint, mennyiségük a differenciáció során csökken.

A feladatkiírásban két főpontba és alpontokba szedve fogalmaztam meg céljaimat. A feladatokat elvégeztem, és az eredmények alapján a felmerülő kérdések egy részére választ adtam, amit bioinformatikai és molekuláris biológiai módszerekkel is alátámasztottam. Eredményeim alapján olyan új kérdések is felvetődtek, amelyek további vizsgálatok alapjául szolgálhatnak. Terveink közt szerepel további TaqMan és SYBR Green esszék, valamint Northern blot mérések elvégzése különböző sejteken, például daganat sejteken, indukált pluripotens őssejteken és RNS polimeráz III gátlóval kezelt őssejteken. Ezekkel a kísérletekkel pontosabb képet kaphatnánk az alklaszterek méretéről, az őket alkotó miRNS-ekről, illetve az alklasztereket szabályozó mechanizmusokról. Továbbá luciferáz esszék elvégzését is tervezzük a miRNS-ek funkcióinak kísérletes validálásához.