

EGY ÓSSEJTSPECIFIKUS MIKRORNNS KLASZTER, A C19MC EXPRESSZIÓJÁNAK VIZSGÁLATA

Készítette: Fóthi Ábel
Orvosi biotechnológia szak

Témavezető: Dr. Orbán Tamás
MTA TTK Enzimológiai Intézet

Belső konzulens: Dr. Gáspári Zoltán
PPKE ITK

Budapest, 2014

Nyilatkozat

Alulírott Fóthi Ábel a Pázmány Péter Katolikus Egyetem Információs Technológiai és Bionikai Karának hallgatója kijelentem, hogy ezt a szakdolgozatot meg nem engedett segítség nélkül, saját magam készítettem, és a szakdolgozatban 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 Szakdolgozatot más szakon még nem nyújtottam be.

.....

Budapest, 2014. december 16.

Tartalomjegyzék

TARTALOMJEGYZÉK	1
1. MAGYAR NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ	3
2. ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ	5
3. BEVEZETÉS	7
4. FELADATKIÍRÁS	8
5. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	10
5.1. MikroRNS-ek általános bemutatása	10
5.2. A C19MC miRNS klaszter szabályzása, funkciója és klinikai alkalmazhatósága.....	11
6. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	14
6.1. RNS izolálás	14
6.2. TaqMan esszé	14
6.3. miRNS expresszió mérése TaqMan Low Density Array használatával.....	15
6.4. TaqMan Low Density Array mérés adatainak kiértékelése	16
6.5. A C19MC pre-miRNS szekvenciák filogenetikai vizsgálata.....	16
6.6. A C19MC miRNS-ek validált célpontjainak <i>in silico</i> elemzése	17
6.7. Primer tervezés	17
6.8. Primerek validálása és optimalizálása pri-miRNS expressziós vizsgálatához (SYBR Green)	17
6.9. SYBR Green esszé	18
6.10. Kompetens sejtek készítése	19
6.11. Inszertek ligálása a plazmidokba	19
6.12. Baktériumtranszformáció és plazmidizolálás	20
6.13. Telep-PCR alkalmazása	20
6.14. DNS elektroforézis agaróz gélen	21
6.15. DNS szekvenálás	21
7. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	22
7.1 Az RNS minták minőségének vizsgálata.....	22
7.1.1. <i>Spektrofotometria</i>	22
7.1.2. <i>Gélelektroforézis</i>	23
7.1.3. <i>TaqMan esszé</i>	23
7.2. TLDA eredmények	24
7.2.1. <i>Őssejtspecifikus miRNS-ek expressziós mintázata</i>	24
7.3. A C19MC bioinformatikai vizsgálata	29
7.3.1. <i>Transzkripció faktorok</i>	29

7.3.2. <i>A pre-miRNS szekvenciák vizsgálata</i>	31
7.3.3. <i>A miRNS-ek validált célpontjainak in silico elemzése</i>	32
7.4. C19MC pri-miRNS-ének kvantitatív vizsgálata SYBR Green qPCR-ral	34
7.4.1. <i>Primerek megtervezés SYBR Green esszéhez</i>	34
7.4.2. <i>SYBR Green esszéhez tervezett primerek optimalizálása</i>	37
7.4.3. <i>SYBR Green qPCR mérések eredményei</i>	39
8. DISZKUZZIÓ	43
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁSOK	46
IRODALOMJEGYZÉK	47

1. Magyar nyelvű összefoglaló

A miRNS-ek rövid, 21-24 nukleotid hosszú szabályzó RNS-ek, amik a gének poszt-transzkripcionális szabályzásának finomhangolását végzik a cél mRNS-ek degradációját indukálva, vagy az arról történő transzláció gátlásával. Érés mechanizmusuk egy komplex folyamat, a transzkripciója során saját miRNS lokuszáról, vagy egy fehérjét kódoló gén intronikus szakaszáról képződő elsődleges átírat (pri-miRNS) kódolhat egyetlen miRNS-t, vagy akár egy miRNS klasztert is, amelyből a kanonikus útvonalon a Drosha/DGCR8 komplex majd a Dicer enzim hasítja ki az érett miRNS-eket. A vizsgálat központi eleme a humán 19-es kromoszómán elhelyezkedő miRNS klaszter (C19MC). Ez a körülbelül 100 kilobázispár hosszú szakasz 46 különböző miRNS hajtú szerkezetet tartalmaz, amelyről 59 érett miRNS képződik, ezzel a legnagyobb humán miRNS klaszter. Jelenlegi tudásunk szerint ezek a miRNS-ek együtt expresszálódnak és expressziós mintázatukat tekintve összejt, placenta és gyengén differenciálódott daganat sejtekre specifikusak.

Munkám során TaqMan Low Density Array (TLDA) technológiát alkalmazva humán embrionális őssejtekben (HuES9) sikeresen validáltam a C19MC összejtspecifikus expresszióját. Azonban a klasztert alkotó miRNS-ek expressziós értékei közt a vártnál nagyobb eltéréseket találtam. Ennek a jelenségnek egy lehetséges magyarázata, hogy expressziós szabályozásuk már transzkripcó szintjén is eltérő.

Ezért az ENCODE projektből származó Chip-seq adatok gyűjtöttem. Ezeket felhasználva olyan transzkripciós faktorok kötőhelyeit kerestem, amik őssejtekben befolyásolhatják a klaszter transzkripcióját. A klaszter előtt egy-egy Nanog és CTCF kötőhely van, továbbá a klaszteren belül is van három CTCF kötőhely. A 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. 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 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.

Hipotézisem kísérletes validálásához a C19MC pri-miRNS-ére specifikus SYBR Green primereket terveztem. A SYBR Green rendszer validálása és optimalizálása után RT-qPCR méréseket végeztem, amelyek eredményei megerősítik az alklaszterekkel kapcsolatos

elméletemet. A klaszter különböző részein, különböző pri-miRNS expressziós szinteket mértem, továbbá ezek a szintek a differenciáció során különbözőképpen változtak. Ebből arra következtetek, hogy nem csak egy hosszú pri-miRNS, hanem bizonyos esetekben több rövidebb pri-miRNS is átíródik a klaszterről, és ezek transzkripcionális aktivitása a sejt differenciációja során pri-miRNS-enként eltérőképpen változik. Továbbá a TLDA és a SYBR Green eredmények arra utalnak, hogy a C19MC miRNS-ek mennyiségének csökkenését az EB állapotban elsődlegesen nem a klaszter transzkripció aktivitásának csökkenése okozza, hanem egy másik, a miRNS-ek szintjét csökkentő hatás fokozódása.

Ennek a szabályzórendszernek az őssejteken kívül daganat sejtekben is fontos szerepe lehet. Ugyanis rákos jellegű sejtvonalak egy részében őssejtspecifikus transzkripció faktorok és miRNS-ek, köztük a C19MC tagjai is expresszálódnak. Lehetséges, hogy az őssejtekben vizsgált szabályzó rendszer ezekben a sejtekben is jelen van. Ez a feltételezés későbbi vizsgálatok alapja lehet.

2. Angol nyelvű összefoglaló

MicroRNAs are small regulatory RNAs of 21-24 nucleotides in length. Their function is fine tuning the post-transcriptional regulation of genes by targeting mRNA molecules via sequence complementarity with their 3'-untranslated region for mRNA decay and/or translation inhibition. During their maturation process, they are transcribed either from their own microRNA locus or as an intronic sequence of a protein coding gene. This primary transcript (pri-miRNA) can encode a single microRNA or a cluster of microRNAs which, in the canonical pathway, undergo further subsequent nucleolytic cleavages by the Drosha/DGCR8 complex and Dicer to form mature microRNA molecules. Our subject of interest is a human miRNA cluster on chromosome 19, namely C19MC. This approximately 100 kilobase pair long sequence contains 46 separate miRNA hairpin structures and encodes 59 mature miRNAs, and as such, it is the biggest human miRNA cluster. These microRNAs are currently believed to be expressed simultaneously and in terms of expression pattern, exclusively in stem cells, placenta and in less differentiated tumor cells.

Using TaqMan Low Density Array (TLDA) technology I successfully validated the stem cell specificity of C19MC in a human stem cell line (HuES9). However, I found significant expression differences within the cluster. An explanation for this phenomenon, we propose that there are different transcriptional regulatory mechanisms inside the cluster.

Chip-seq data from Encode project strengthens this idea which seems to be further supported by the presence of certain transcription factor binding sites found inside the cluster. Upstream from the cluster there is a Nanog and a CTCF binding site. Furthermore, there are three other CTCF binding sites inside the cluster. Nanog is a stem cell specific transcriptional factor and binding to a site near to the promoter of the cluster can cause the upregulation of the whole cluster. CTCF protein is an insulator, it can regulate the epigenetic modifications of the chromatin by interacting with it.

In case of the C19MC, a CpG island near to the promoter of the cluster, as well as several repetitive sequences in the cluster are targets of methylation. Hence miRNAs are suppressed in differentiated cells. The presence of CTCF binding sites inside the cluster suggests that CTCF regulates the methylation of the cluster, causing transcription of various pri-miRNAs and different expression levels of the miRNAs.

Based on this hypothesis, I designed three pairs of PCR primers to be used in SYBR Green qRT-PCR measurements, in order to determine the expression of the sub-clusters inside C19MC. After optimizing and validating these primers I have demonstrated experimentally the existence of these novel sub-clusters inside C19MC. I have found alteration in the levels of pri-

miRNA and their dynamics when comparing different parts of the cluster. In conclusion, not just one long pri-miRNA, but there are more, smaller pri-miRNAs are transcribed and their transcription activity change uniquely during differentiation of the cell. Furthermore, based on the results of TLDA and SYBR Green measurements, the main factor in decrease of C19MC miRNAs is not the outcome of methylation, but other regulatory mechanism(s).

This regulatory network may have an important role not just in stem cells, but in cancer cells too. Expression of stem cell specific transcriptional factors and miRNAs in tumorous cells suggests the same. Hence, it is possible that this regulatory mechanism exists in certain cancer cell types but this presumption needs further investigation.

3. 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 nagyáteresztő-képességű (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 indokoltta 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 őssejtvonalt és differenciálódott formájának miRNomának kvantitálását célzó nagyátersztő-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 háttérét, 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.

4. Feladatkíírás

Munkám során egy összejtspecifikus 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 összejtvonalon, a C19MC tagjainak jellemzése és összejtspecifitásuknak 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?

5. Irodalmi Áttekintés

5.1. 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 transláció 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 útvonaltól azonban nem teljesen tisztázottak.

Legrégebb óta ismert és a legelterjedtebb útvonaltól kanonikusnak nevezzük. Ennek során a genom nem transzlálódó részéről az RNS-polimeráz II egy úgynevezett primer miRNS-t (pri-miRNS) ír át^[7]. Ez a hosszú elsődleges átírat több, „hajtű”-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 hajtűkanyarnál a dsRNS kötő DGCR8 fehérje felismeri, majd a Drosha RNáz III enzim kihalásítja 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 kettőszálú 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 mRNA szekvenciák nem transzlálódó 3' végéhez (3'UTR) kötődni, aminek hatására a mRNA transzlációja gátlódik, vagy beindul a mRNA 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 mRNA 3'UTR végének egy részével^[23]. Abban az esetben azonban, ha a miRNS és az mRNA 3'UTR végének egy része teljesen komplementerek, a mRNA azonnal funkcióját veszti és lebomlik^[24].

5.2. A C19MC miRNS klaszter szabályozása, funkciója és klinikai alkalmazhatósága

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 rendelkeznenk 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 patológias 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 tumorsuppresszorként^[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 tumorsuppresszor 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].

6. Anyagok és módszerek

6.1. 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 gélelektroforézissel ellenőriztem. Az RNS elbomlását elkerülendő a mintákhoz RNáz inhibitorot adtam.

6.2. 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 reverz transzkripció szakaszai:

- | | | | |
|----|---------------------|-------|------------------------|
| 1. | Primerek kitapadása | 16 °C | 30 perc |
| 2. | cDNS átírás | 37 °C | 120 perc |
| 3. | Enzim inaktiválás | 85 °C | 5 perc |
| 4. | Inkubálás | 4 °C | további felhasználásig |

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 qPCR reakció szakaszai:

- | | | | |
|---|--------------------------|-------|--------|
| – | Polimeráz aktiváció | 95 °C | 30 mp |
| – | Amplifikáció (40 ciklus) | | |
| | Denaturálás | 95 °C | 15 mp |
| | Extenzió | 60 °C | 1 perc |

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

6.3. miRNS expresszió mérése TaqMan Low Density Array használatával

A miRNS expressziós vizsgálatokra több módszer is létezik^[54]. A TaqMan Low Density Array (TLDA), miRNS microarray és az új generációs szekvenáláson alapuló mély-szekvenálás („deep sequencing”). 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-rel felsokszorozzuk, emiatt az amplifikációs lépés miatt kis koncentrációjú RNS izolátummal is dolgozhatunk. Ez összegek esetében különösen hasznos. Az így előkészített mintánkat a TLDA kártyákra mérjük, amelyeken a TaqMan próbák találhatók. 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 reverz transzkripció szakaszai:

I.	(40 ciklus)		
1.	16 °C	2 perc	
2.	42 °C	1 perc	
3.	50 °C	1 mp	
II.	85 °C	5 perc	
inkubálás	4 °C	a további felhasználásig	

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 pre-amplifikációs PCR paramétereit:

I.	95 °C	10 min
II.	55 °C	2 min
III.	72 °C	2 min
IV. (12 ciklus)		
1.	95 °C	15 mp
2.	60 °C	4 perc
V.	99.9 °C	10 perc
inkubálás	4 °C	a további felhasználásig

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.

6.4. TaqMan Low Density Array mérés adatainak kiértékelése

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 amellet, hogy ingyenes, könnyen is használható, jól dokumentált és a biológiai kutatások során felmerülő legtöbb statisztikai feladathoz előre megírt függvényt tartalmaz, amelyek szabadon átalakíthatóak.

6.5. A C19MC pre-miRNS szekvenciák filogenetikai 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.

6.6. A C19MC miRNS-ek validált célpontjainak *in silico* elemzése

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.

6.7. Primer tervezés

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

6.8. Primerek validálása és optimalizálása pri-miRNS expressziós vizsgálatához (SYBR Green)

A primerek működését humán DNS-ről és HuES9 mintából izolált totál RNS-ről is validáltam. Az RNS-ről először Multiscribe RT enzim (Applied Biosystems) cDNS-t írtam át 500 ng RNS-t felhasználva a gyártó utasításait követve.

A reverz transzkripció szakaszai:

1.	Primerek kitapadása	16 °C	30 perc
2.	cDNS átírás	37 °C	120 perc
3.	Enzim inaktiválás	85 °C	5 perc
4.	Inkubálás	4 °C	további felhasználásig

Ezután a primerek validálása és optimalizálása céljából PCR reakciót 2X PCR Mix-szel (Applied Biosystems) végeztem a gyártó utasításai szerint.

A PCR reakció szakaszai:

I.	elődenaturáció	95 °C	5 perc
II.	amplifikáció (35 ciklus)		
	denaturáció	95 °C	40 mp
	hibridizáció	55 °C, 60 °C, 65 °C	40 mp
	láncszintézis	72 °C	1 perc
III.	végző extenzió	72 °C	10 perc
IV.	inkubálás	4 °C	a további felhasználásig

6.9. SYBR Green esszé

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 reverz transzkripció szakaszai:

1.	Primerek kitapadása	16 °C	30 perc
2.	cDNS átírás	37 °C	120 perc
3.	Enzim inaktiválás	85 °C	5 perc
4.	Inkubálás	4 °C	további felhasználásig

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.

6.10. Kompetens sejtek készítése

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 glicerín keverékébe vettem fel. A kompetens baktériumokat 100-100 ul-es adagokban -80 °C-on tároltam a további felhasználásig.

6.11. Inszertek ligálása a plazmidokba

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.

6.12. Baktériumtranszformáció és plazmidizolálás

A plazmidok molekuláris klónozásához TOP10 E.coli baktériumokat használtam. A -80°C-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 hősooknak tettem ki, majd újabb 5 percig jégen inkubáltam. A transzformálást követően 50 µg/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.

6.13. Telep-PCR alkalmazása

A ligálási lépések sikerességének ellenőrzéséhez a polimeráz láncreakció (PCR) egy speciális alkalmazását, ún. telep-PCR-eket végeztem. Első lépésként az ampicillines lemezen képződő baktériumtelepekről vett mintákat steril vízben, 95 °C-on lizáltam. A PCR reakció során ezek a lizátumok szolgáltak templátként. Ezen kívül a reakcióelegy megfelelően megválasztott primerpárokat és a szükséges komponenseket (dNTP-k, puffer, enzim) magába foglaló PCR mixet tartalmazott.

A PCR reakció szakaszai:

I. elődenaturáció	95 °C	3 perc
II. amplifikáció (35 ciklus)		
denaturáció	95 °C	30 mp
hibridizáció	65 °C	30 mp
láncszintézis	72 °C	1 perc
III. végső extenzió	72 °C	10 perc
IV. inkubálás	4 °C	a további felhasználásig

6.14. 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.

6.15. 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 reakció szakaszai:

- | | | |
|------------------------------|-------|--------------------------|
| I. elődenaturáció | 95 °C | 30 mp |
| II. amplifikáció (35 ciklus) | | |
| denaturáció | 95 °C | 30 mp |
| hibridizáció | 65 °C | 15 mp |
| láncszintézis | 60 °C | 4 perc |
| III. inkubálás | 4 °C | a további felhasználásig |

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.

7. Eredmények és értékelésük

7.1 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

7.1.1 Spektrofotometria

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

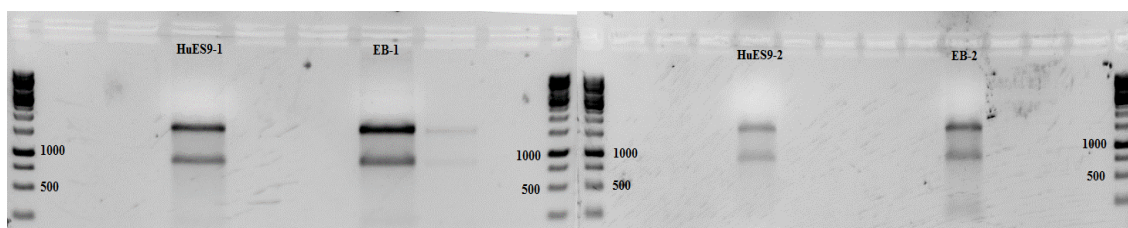
Minta neve	Koncentráció (ng/ul)	A260/A280
HuES9-1	105	1,88
EB-1	521	1,99
HuES9-2	34	1,85
EB-2	77	1,85

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.

7.1.2. Gélelektroforézis

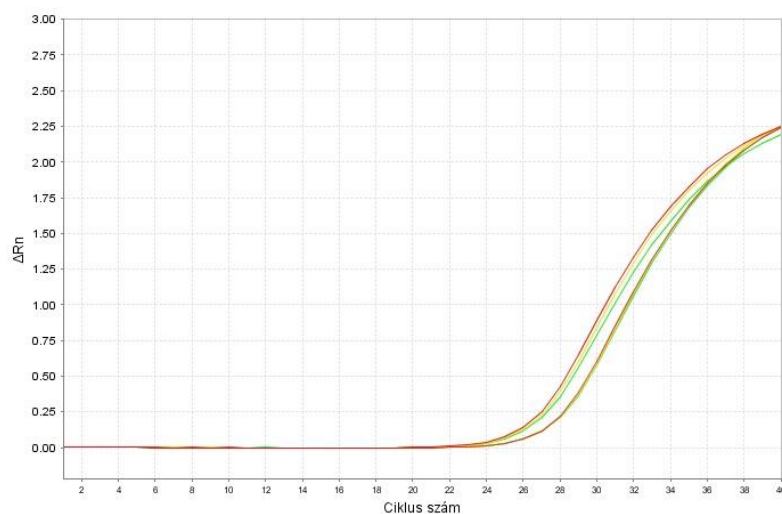
A második ellenőrző módszer a gélelektroforézis volt. A totál RNS izolátumoknak jellegzetes gélelektroforézis képük van, melyet a különböző RNS molekulák alakítanak ki. Jó minőségű RNS minta esetében 2-2 vastagabb csík figyelhető meg, melyek közül a felső jól láthatóan vastagabb, mint az alsó. Ezek a 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.



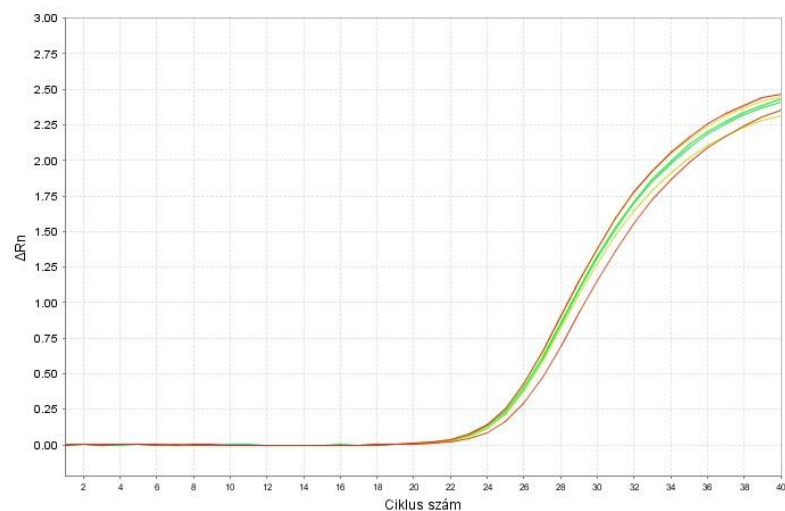
1. ábra: *HuES9 és EB mintákból izolált totál RNS gélelektroforetikus képe, 1000 bp-os létrákat használva.*

7.1.3. 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.

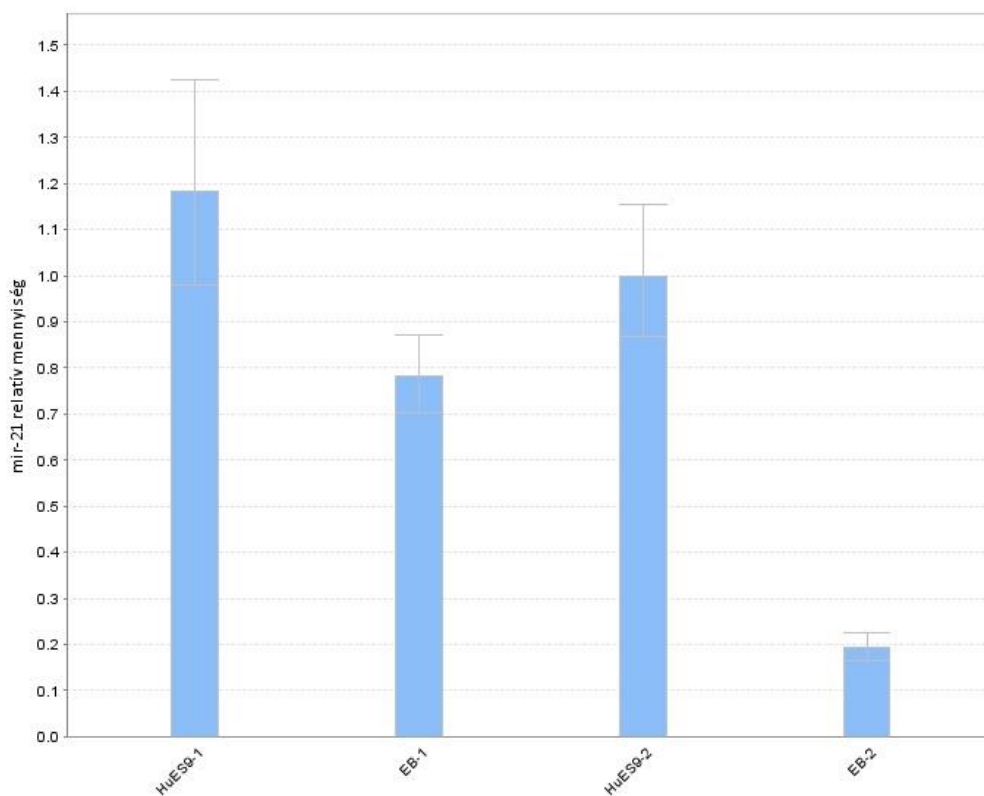


2. ábra: *HuES9 minták U6 amplifikációs profilja.*



3. ábra: EB minták U6 amplifikációs profilja.

A 2. és 3. ábrák az U6 qPCR-rel mért amplifikációs görbéit mutatják a differenciálatlan és a differenciálódott minta párok 3-3 technikai párhuzamosában. 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.



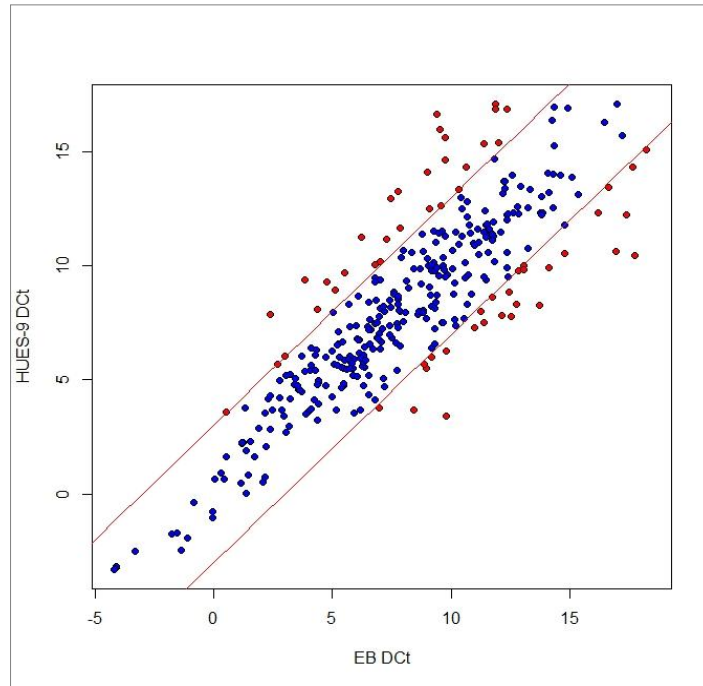
4. ábra: MiR-21 mennyiségének változása, normalizálva, két biológiai párhuzamosban mérve.

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 összegekben mért expressziós szintek csak kis mértékben különbözhetnek a biológiai párhuzamosaiktól.

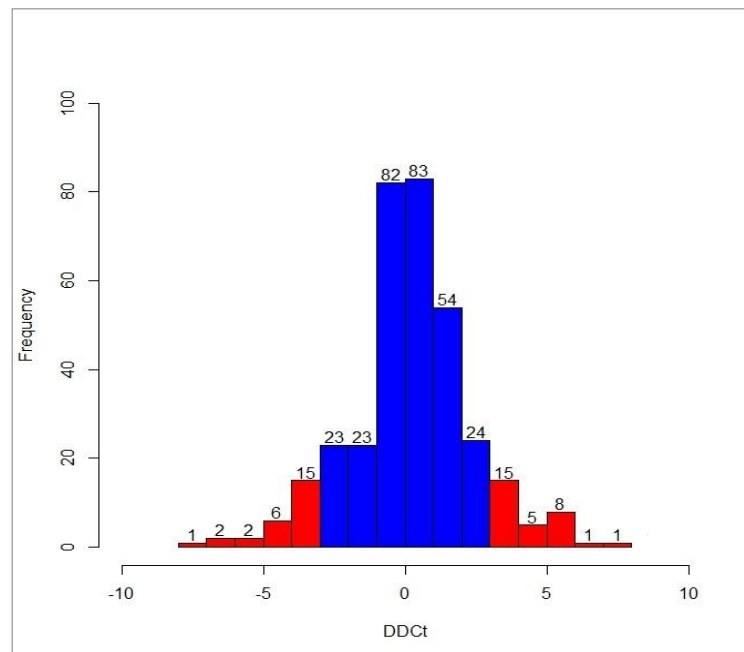
7.2. TLDA eredmények

7.2.1. Össejtspecifikus 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 pontok, illetve oszlopok jelölik. Azokat a miRNS-eket, melyeknek a $\Delta\Delta C_t$ abszolút értéke 3-nál nagyobb volt az ábrán piros pontokkal, illetve oszlopokkal jelöltem. (5. és 6. ábra)



5. ábra: HuES-9-ben és EB-ben mért miRNS-ek eloszlása ΔC_t értékeik alapján, szórási diagramon ábrázolva. A differenciálatlan, illetve differenciálódott állapotra jellemző miRNS-eket piros pontok jelölik. Előbbiek az átló alatt, utóbbiak fölött vannak.



6. 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-specifícitásnak 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. Ezeket a 3. táblázat tartalmazza, amelynek felépítése az előzőével megegyező.

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 (A)

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.*

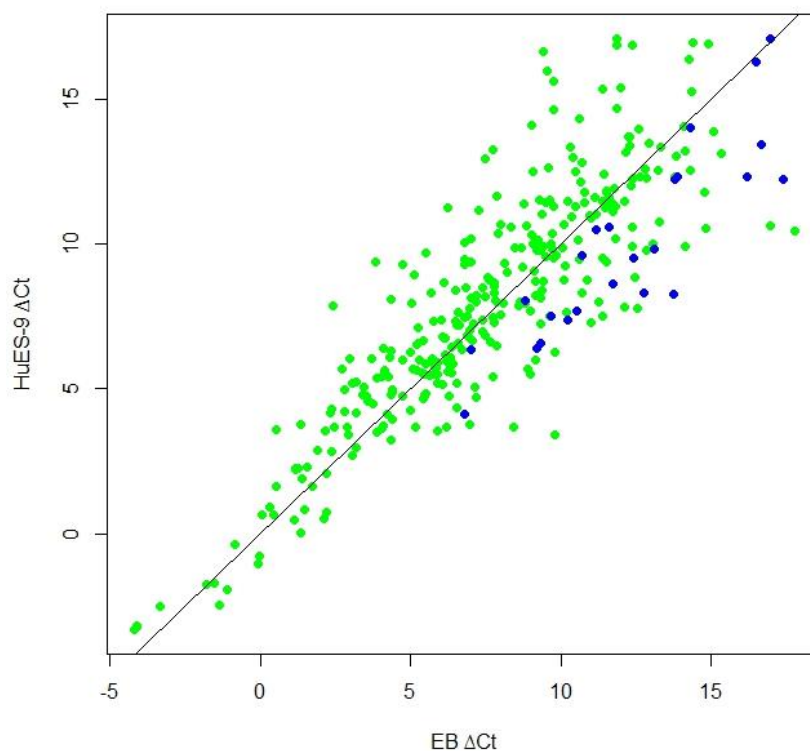
MiRNS neve	$\Delta\Delta C_i$	C19MC klaszter tagja?
hsa-miR-605	-5,562305	nem
hsa-miR-409-3p	-4,307197	nem
hsa-miR-214-5p	-3,266428	nem
hsa-miR-222-5p	-3,171137	nem

3. táblázat: Össejtspecifikus miRNS-ek (B)

miRNS-ek, melyek teljesítik az alábbi szűrési feltételeket:

- *HuES9 és EB állapot ΔC_i értékei közti eltérés ($\Delta\Delta C_i$) kisebb -3-nál*

A 2. és 3. táblázatokból 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 7. ábrán látszik, egy kivétellel az össejtspecifikusnak mondott C19MC klaszter minden tagjának lecsökkent az expressziója a differenciáció során, azonban nem egyforma mértékben, azaz a $\Delta\Delta C_i$ értékek közt nagy a variabilitás. A klaszter miRNS-eit egymáshoz viszonyítva szembetűnő az is, hogy ΔC_i értékeik nagyban eltérnek HuES9-ben és EB-ben is. Ennek legvalószínűbb magyarázata, hogy transzkripcionális szinten eltérőképpen szabályzódnak.



7. 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, szórási diagramon.

7.3. A C19MC bioinformatikai vizsgálata

7.3.1. 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 léteire utalnak (8. 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.

UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly

move

<<<

<

>

>>>

Zoom in

1.5x

3x

10x

base

Zoom out

1.5x

3x

10x

100x

chr19:54,127,110-54,268,279 141,170 bp.

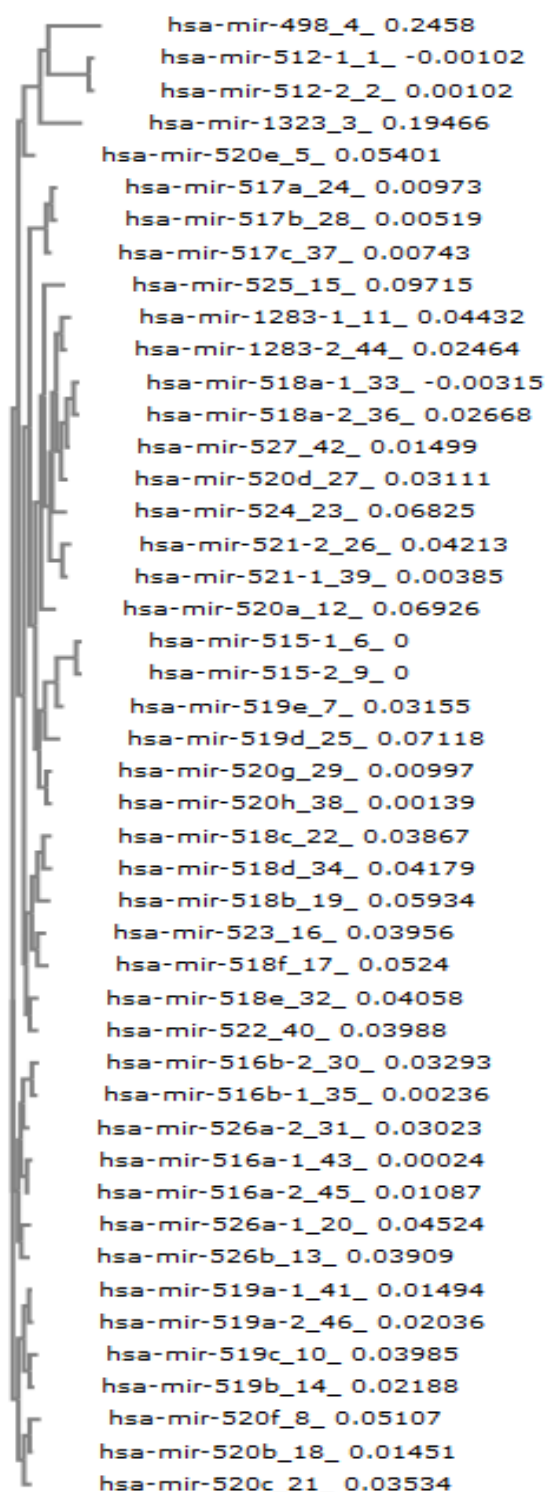
enter position, gene symbol or search terms

go



8. ábra: A CTGF miRNS-ek és környezetükben elhelyezkedő transzkripció faktor kötőhelyek. Nanog kötőhely lila keretben. CTGF kötőhely piros keretben. A barna téglalap CpG szigetet jelöl.

7.3.2. A pre-miRNS szekvenciák vizsgálata



9. ábra: A C19MC pre-miRNS-ek Neighbour-joining módszerrel készült filogenetikai fája.

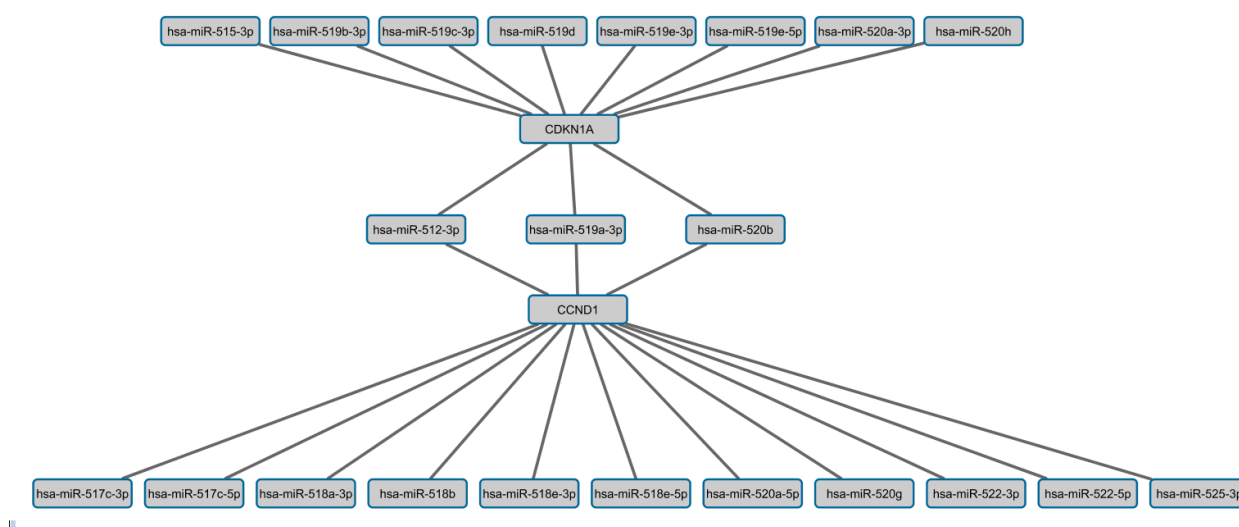
Az ágak hossza a valós távolságokat mutatják. A pre-miRNS-ek neve, klaszteren belüli pozíciójuk és a páronkénti távolságok kerültek megjelenítésre.

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 érett 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 (9. 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.

7.3.3. 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 (10. ábra).



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

A géntonológiai 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: $1,8E-6$).

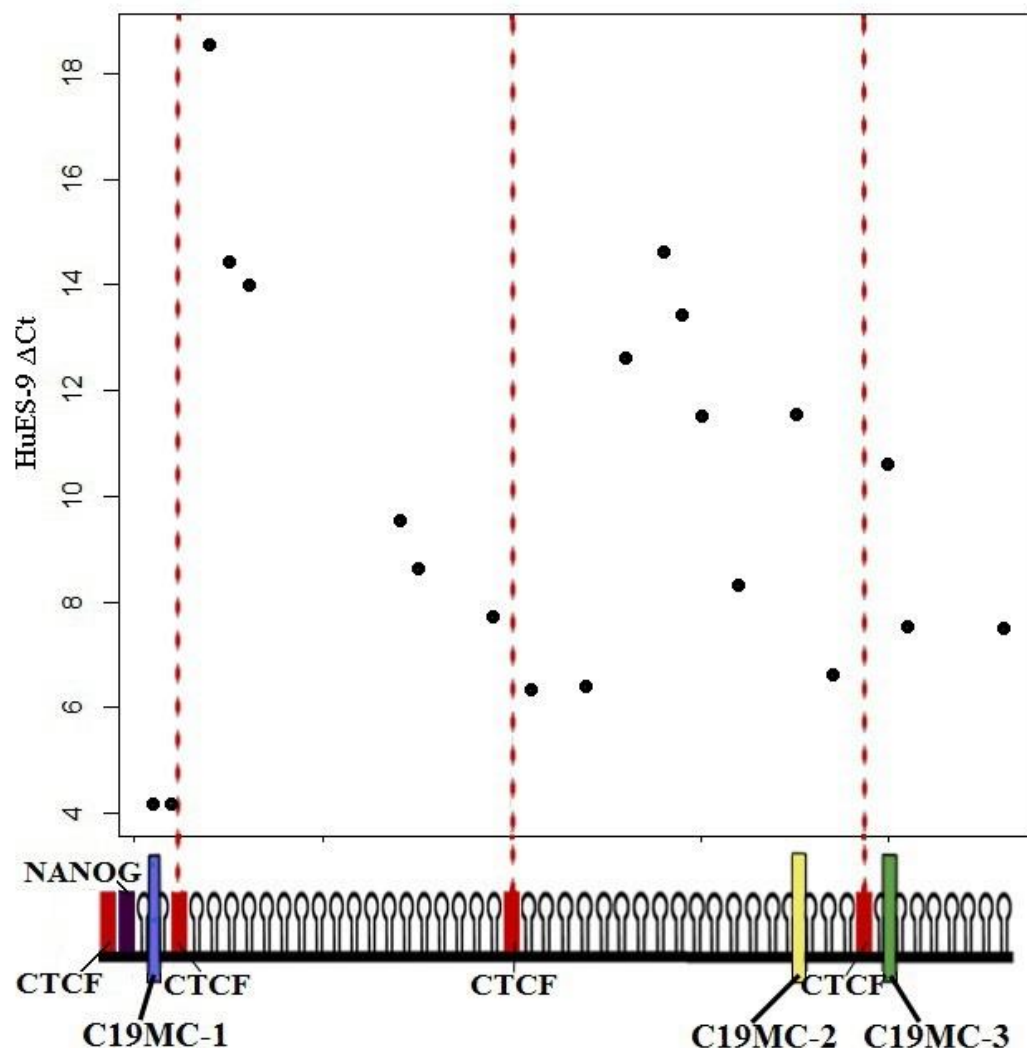
Az AmiGO által prediktált funkciók hasonlítottak a DAVID-éira, de azért némi eltérés mutatkozott. A program 137 génből 133-at ismert fel, ebben az esetben is a sejthalál szabályozása (p-érték: $1,8E-28$) volt az egyik legvalószínűbb funkció, illetve megjelent a szignáltranszdukció szabályozása (p-érték: $3,3E-25$). 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.

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

7.4.1. Primerek megtervezés SYBR Green esszéhez

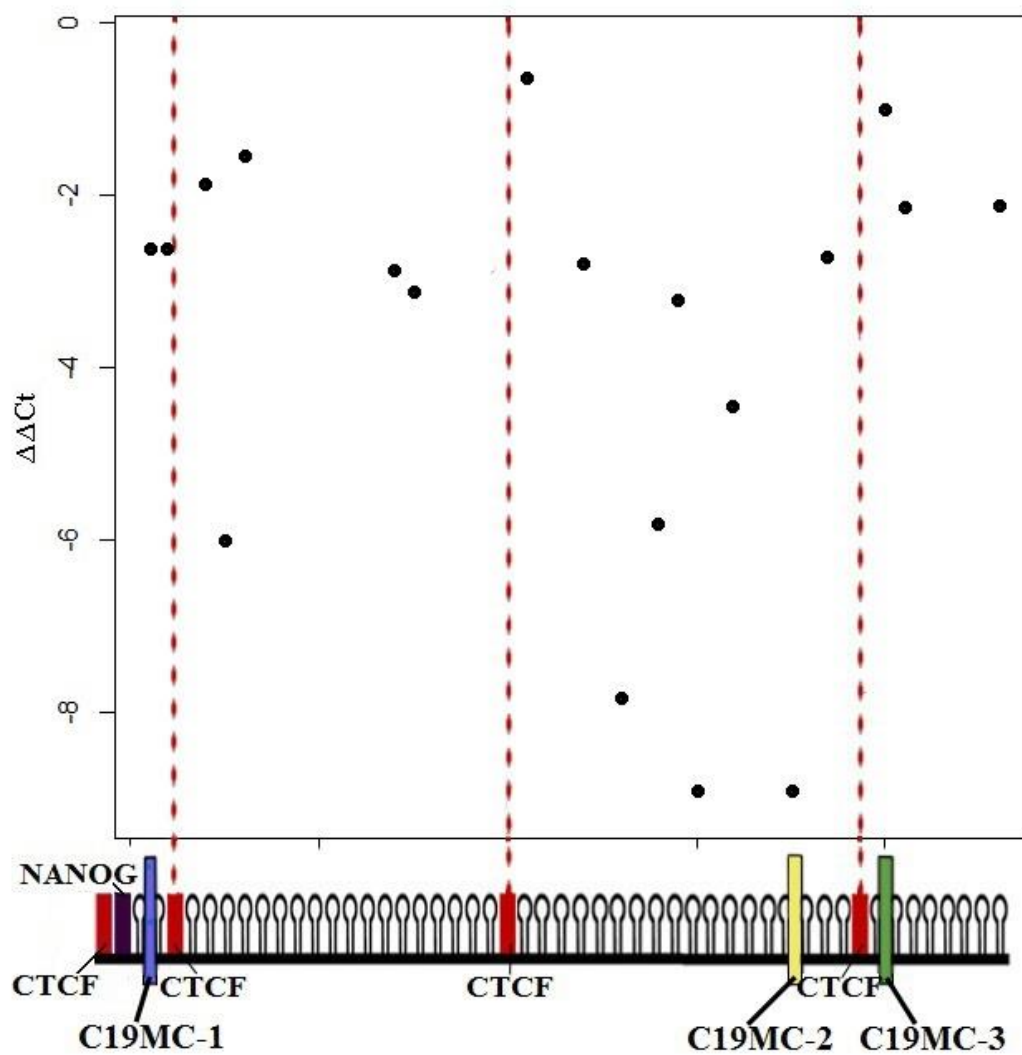
Hipotézisem igazolásához primereket terveztem a klaszter pri-miRNS-ének releváns szakaszainak kvantitatív vizsgálatához. A primerek megtervezése során nehézséget jelentettek a klaszteren belüli repetitív szekvenciák, amelyekről az optimálisnál alacsonyabb hibridizációs hőmérsékleten aspecifikus termékek képződhetnek, amik befolyásolhatják a qPCR mérés pontosságát. A 11. 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 (11. 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 essenek.



11. 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 $\Delta \Delta C_t$ értékek szintén nagy variabilitást mutatnak a klaszteren belül (12. ábra), azaz a miRNS-ek szintje a differenciáció során különbözőképpen változnak. Az első primer párral (C19MC-1) mért régióban a miRNS-ek $\Delta \Delta C_t$ 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 $\Delta \Delta C_t$ 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.



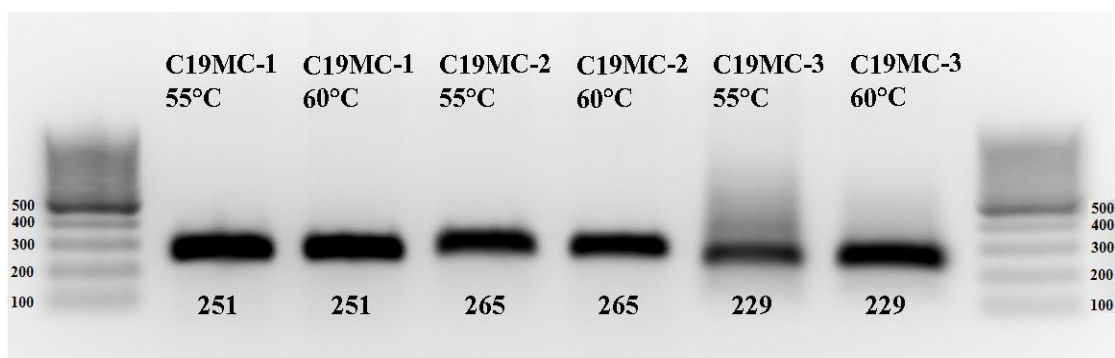
7.4.2. SYBR Green esszéhez tervezett primerek optimalizálása

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	

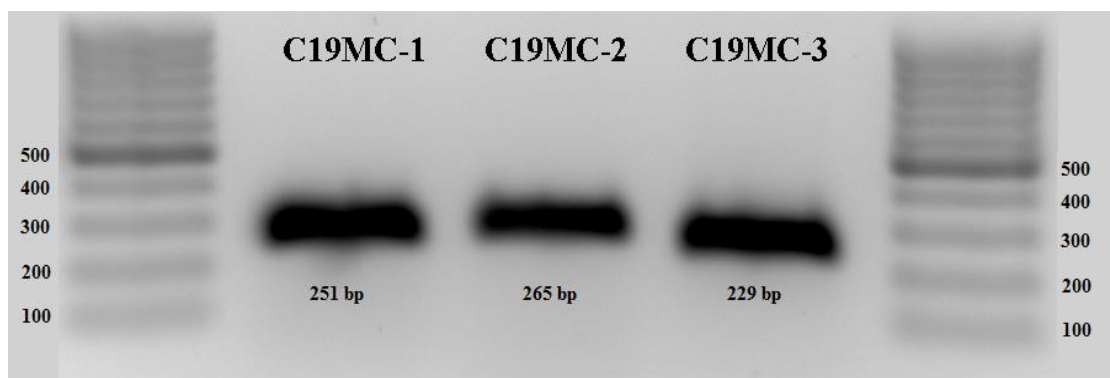
4. táblázat: *A primerek neve, szekvenciája, olvadáspontja és primer párokkal kijelölt szakasz hossza.*

Az 4. táblázat a primerek nevét, szekvenciáját és egyéb olyan paramétereit tartalmazza, amelyek befolyással lehetnek a qPCR mérés beállításaira. A primerek validálását PCR reakciókkal genomi DNS-ről és HuES9-ből izolált totál RNS-ről átírt cDNS-eken is sikeresen elvégeztük. A PCR reakció termékeit gélelektroforézissel mindkét esetben ellenőriztük (13., 14. és 15. ábra). HuES9 minta cDNS-ének esetében szekvenálást is végeztünk, amely egyértelműen megerősítette, hogy az amplikonok a vizsgálni kívánt régiókról íródtak át. A 16. ábra egy reprezentatív szekvenálási kromatogramot mutat.

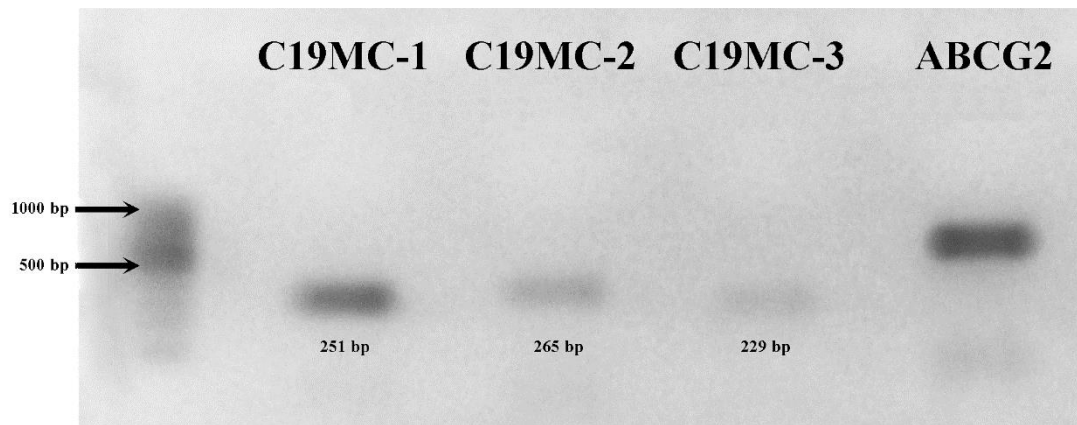
A primerek optimalizálása érdekében a PCR reakciókat 55°C, 60°C és 65°C hibridizációs profillal is lefutattam. 55°C-on és 60°C-on a C19MC-3-as primer pár aspecifikus termékeket is amplifikált (13. ábra) ezért emeltem a hibridizációs lépés hőmérsékletét 65°C-ra, amikor a primerek már specifikusan csak a kívánt régiót amplifikálták genomi DNS-ről (14. ábra), illetve HuES9 cDNS-ről is (15. ábra).



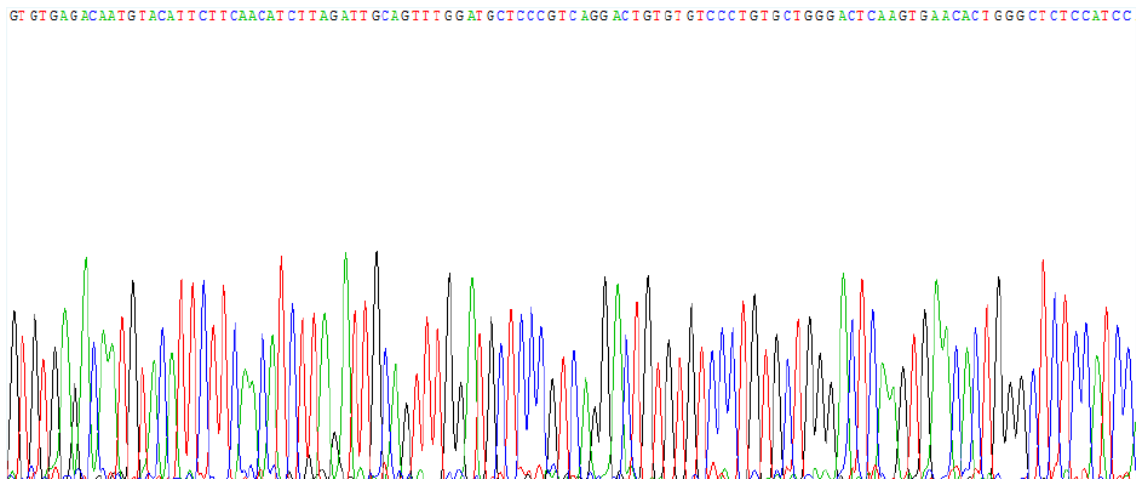
13. ábra: *Primerek validálása és optimalizálása genomi DNS-en, 55°C és 60°C-os hibridizációval, 100 bp-os létrák használatával. Az amplikonok várt hossza (C19MC-1: 251 bp, C19MC-2: 265 bp, C19MC-3: 229 bp) megegyezett a kapott termékek hosszával.*



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



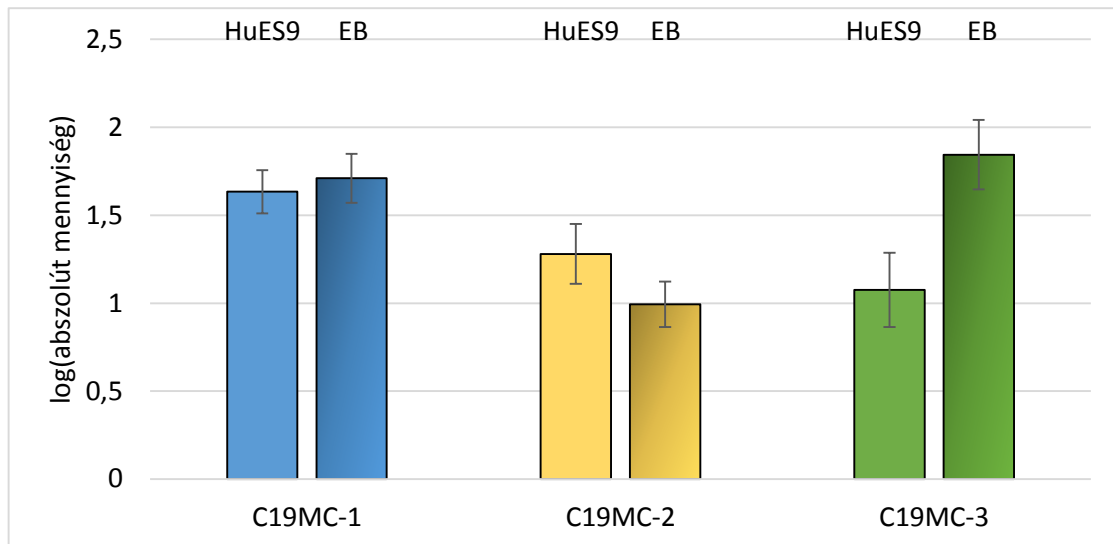
15. ábra: *Primerek validálása HuES9-ből izolált RNS-ről átírt cDNS-en, 100 bp-os létra használatával. Kontrollként az őssejtspecifikus ABCG2 gén kódoló régiójára specifikus primer párt használtam.*



16. ábra: *C19MC-2 amplikon egy szakaszának kromatogramja.*

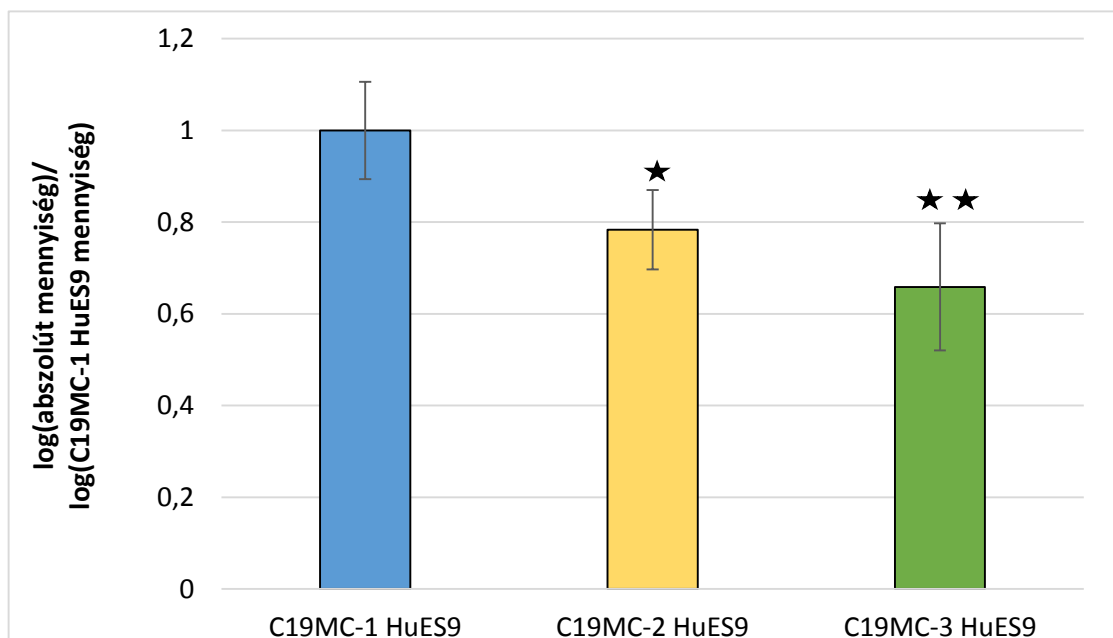
7.4.3. SYBR Green qPCR mérések eredményei

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.



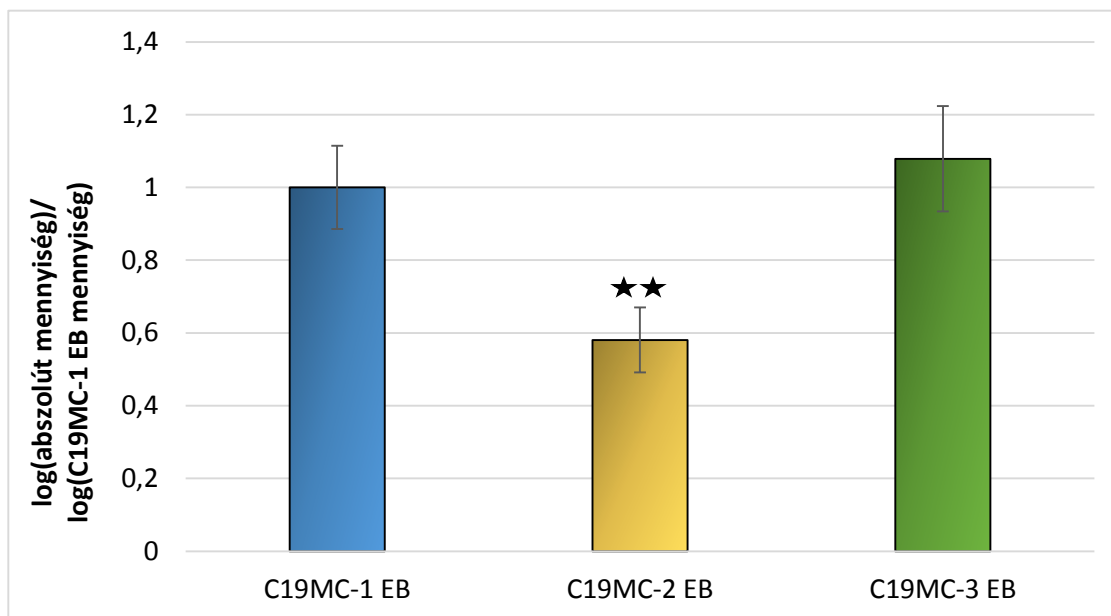
17. ábra: A C19MC pri-miRNS-ének három primer párral (C19MC-1 (kék), C19MC-2 (sárga), C19MC-3 (zöld)) HuES9-ben és EB-ben mért mennyiségének logaritmusai.

A 17. 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 szabályozódnak a transzkripció során. A továbbiakban ezeket az eredményeket mutatom be az expressziós eltérések különböző aspektusaira rávilágítva.



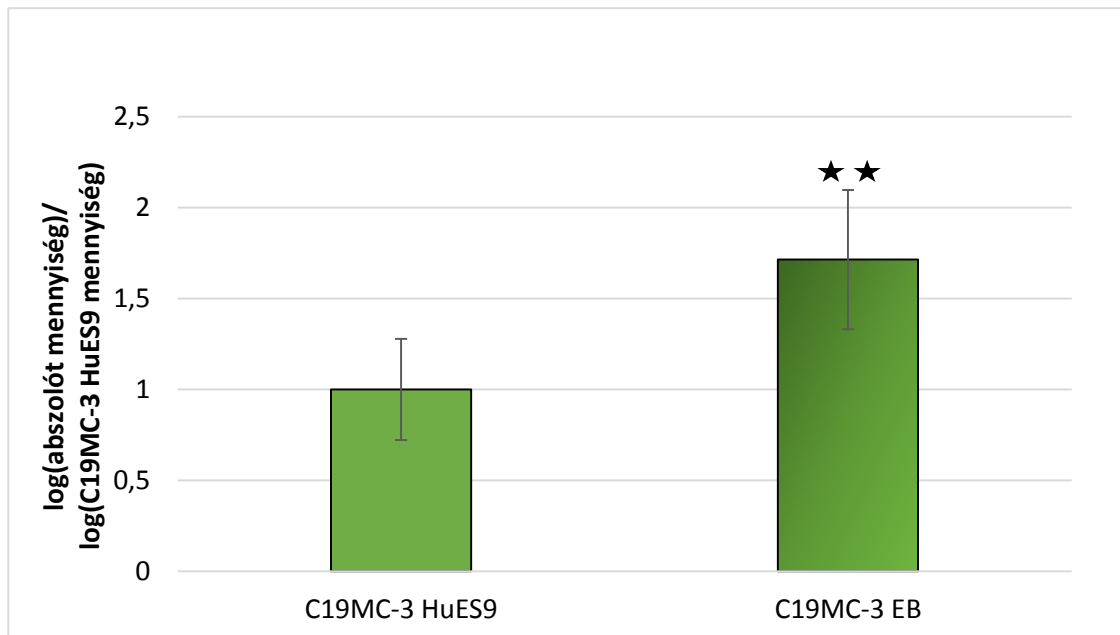
18. ábra: A C19MC pri-miRNS-ének három primer párral (C19MC-1 (kék), C19MC-2 (sárga), C19MC-3 (zöld)) HuES9-ben mért mennyisége, a klaszter elejére specifikus primerekkel (C19MC-1) mért mennyiségre normalizálva. (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,001$)

A 18. 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.



19. 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 (19. 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.



20. 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 20. ábrán a differenciáció során a klaszter végén bekövetkező transzkripciós aktivitás változására mutatok rá. A C19MC-3 primer párral mért harmadik régió mennyisége megnő a differenciáció során (20. ábra), ezzel szemben az első és a középső régió expressziója szignifikánsan nem különbözik HuES9 és EB állapot között. Ebből következik, hogy a 19. ábrán látható, a klaszter eleje és vége közti kiegyenlítődés a harmadik régió transzkripciós aktivitásának növekedésének eredménye.

8. Diszkusszió

Munkám első célja a C19MC összejspecifitásának validálása volt HuES9 humán összejtvonalon. Ennek elérése érdekében egy nagyátersztő-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 szűrés feltételek után a C19MC klaszter egy részének sikeresen validáltam összejspecifitását. A szűrés 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 célom 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 legegységesebb 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 expresszálnódó 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 lévőké sokkal alacsonyabb. Ennek egy lehetséges oka a C19MC-2 transzkripció 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 transzkripció 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 régióknak 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 diplomaterv-témabejelentőben leírt feladatokat szem előtt tartva, 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.

Köszönetnyilvánítások

Köszönöm témavezetőmnek, Orbán Tamásnak a szakmai segítséget és a lehetőséget, hogy a laborjában dolgozhatom. Köszönöm a segítséget Schamberger Anitának és a labor többi dolgozójának. Továbbá köszönöm Erdei Zsuzsának és Apáti Ágotának a HuES9 mintákat, melyeken a vizsgálataimat végeztem.

Irodalomjegyzék

- [1] R. C. Lee, R. L. Feinbaum, and V. Ambros, “The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*,” *Cell*, vol. 75 5, pp. 843–854, 1993.
- [2] M. Ghildiyal and P. D. Zamore, “Small silencing RNAs: an expanding universe,” *Nature Reviews Genetics*, vol. 10, no. 2, pp. 94–108, 2009.
- [3] R. C. Lee and V. Ambros, “An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*,” *Science*, vol. 294, no. 5543, pp. 862–864, 2001.
- [4] miRBase, Release 21: <http://www.mirbase.org>
- [5] Stefan L. Ameres and Phillip D. Zamore, „Diversifying microRNA sequence and function,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14, 475–488, 2013.
- [6] K. Miyoshi, T. Miyoshi, and H. Siomi, “Many ways to generate microRNA-like small RNAs: non-canonical pathways for microRNA production,” *Molecular genetics and genomics MGG*, vol. 284, no. 2, pp. 95–103, 2010.
- [7] Y. Lee, M. Kim, J. Han, K.-H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek, and V. N. Kim, “MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II,” *the The European Molecular Biology Organization Journal*, vol. 23, no. 20, pp. 4051–4060, 2004.
- [8] J. Han, Y. Lee, K. Yeom, Y. Kim, H. Jin, and V. N. Kim, “The Drosha – DGCR8 complex in primary microRNA processing,” *Genes & Development*, pp. 3016–3027, 2004.
- [9] M. T. Bohnsack, K. Czapinski, and D. Gorlich, “Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs,” *Rna New York Ny*, vol. 10, no. 2, pp. 185–191, 2004.
- [10] V. N. Kim, J. Han, and M. C. Siomi, “Biogenesis of small RNAs in animals,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 10, no. 2, pp. 126–139, 2009.
- [11] K. Okamura, M. D. Phillips, D. M. Tyler, H. Duan, Y. Chou, and E. C. Lai, “The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3’ UTR evolution,” *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 15, no. 4, pp. 354–363, 2008.
- [12] A. Kozomara and S. Griffiths-Jones, “miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data,” *Nucleic Acids Research*, vol. 39, no. Database issue, pp. D152–

7, 2011.

- [13] J.-S. Yang and Lai, “Alternative miRNA Biogenesis Pathways and the Interpretation of Core miRNA Pathway Mutants,” *Molecular Cell*, vol. 43, no. 6, pp. 892–903, 2011.
- [14] J. G. Ruby, C. H. Jan, and D. P. Bartel, “Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing,” *Nature*, vol. 448, no. 7149, pp. 83–86, 2007.
- [15] K. Okamura, J. W. Hagen, H. Duan, D. M. Tyler, and E. C. Lai, “The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*,” *Cell*, vol. 130, no. 1, pp. 89–100, 2007.
- [16] J. E. Babiarz, J. G. Ruby, Y. Wang, D. P. Bartel, and R. Blelloch, “Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs,” *Genes & Development*, vol. 22, no. 20, pp. 2773–2785, 2008.
- [17] J. O. Westholm and E. C. Lai, “Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing,” *Biochimie*, vol. 93, no. 11, pp. 1897–904, 2011.
- [18] E. Berezhikov, W.-J. Chung, J. Willis, E. Cuppen, and E. C. Lai, “Mammalian mirtron genes,” *Molecular Cell*, vol. 28, no. 2, pp. 328–336, 2007.
- [19] C. R. Sibley, Y. Seow, S. Saayman, K. K. Dijkstra, S. El Andaloussi, M. S. Weinberg, and M. J. A. Wood, “The biogenesis and characterization of mammalian microRNAs of mirtron origin,” *Nucleic Acids Research*, vol. 40, no. 1, pp. 1–11, 2011.
- [20] A. Schamberger, B. Sarkadi, and T. I. Orban, “Human mirtrons can express functional microRNAs simultaneously from both arms in a flanking exon-independent manner,” *RNA Biology*, vol. 9, no. 9, pp. 1177–1185, Sep. 2012.
- [21] A. S. Flynt, J. C. Greimann, W.-J. Chung, C. D. Lima, and E. C. Lai, “MicroRNA biogenesis via splicing and exosome-mediated trimming in *Drosophila*,” *Molecular Cell*, vol. 38, no. 6, pp. 900–907, 2010.
- [22] J. Liu, M. A. Carmell, F. V Rivas, C. G. Marsden, J. M. Thomson, J.-J. Song, S. M. Hammond, L. Joshua-Tor, and G. J. Hannon, “Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi,” *Science*, vol. 305, no. 5689, pp. 1437–1441, 2004.
- [23] E. C. Lai, “Micro RNAs are complementary to 3’ UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation,” *Nature Genetics*, vol. 30, no. 4, pp. 363–364, 2002.
- [24] S. Yekta, I.-H. Shih, and D. P. Bartel, “MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA,” *Science*, vol. 304, no. 5670, pp. 594–596, 2004.
- [25] Megraw,M., Sethupathy,P., Corda,B. and Hatzigeorgiou,A.G., „miRGen: a database for

- the study of animal microRNA genomic organization and function.," *Nucleic Acids Res.*, 35, D149–D155., 2007.
- [26] Bentwich I, Avniel A, Karov Y, et al., „Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs.," *Nat Genet*, 37: 766–770., 2005
 - [27] I. Flor and J. Bullerdiek, “The dark side of a success story: microRNAs of the C19MC cluster in human tumours.," *J. Pathol.*, vol. 227, no. 3, pp. 270–4, Jul. 2012.
 - [28] Zhang R, Wang YQ, Su B, „Molecular evolution of a primate- specific microRNA family.," *Mol Biol Evol*, vol. 25, pp. 1493–1502, 2008.
 - [29] Vergoulis, T. I. Vlachos, P. Alexiou, G. Georgakilas, M. Maragkakis, M. Reczko, S. Gerangelos, N. Koziris, T. Dalamagas, AG Hatzigeorgiou; „Tarbase 6.0: Capturing the Exponential Growth of miRNA Targets with Experimental Support.," *Nucl. Acids Res.* 40 (D1): D222-D229., 2012.
 - [30] Cao H, Yang CS, Rana TM., „Evolutionary emergence of microRNAs in human embryonic stem cells.," *PLoS One*, 3: e2820., 2008.
 - [31] M.-L. Bortolin-Cavaillé, M. Dance, M. Weber, and J. Cavaillé, “C19MC microRNAs are processed from introns of large Pol-II, non-protein-coding transcripts.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, no. 10, pp. 3464–73, Jun. 2009.
 - [32] C. Bellemer, M.-L. Bortolin-Cavaillé, U. Schmidt, S. M. R. Jensen, J. Kjems, E. Bertrand, and J. Cavaillé, “Microprocessor dynamics and interactions at endogenous imprinted C19MC microRNA genes.," *J. Cell Sci.*, vol. 125, no. Pt 11, pp. 2709–20, Jun. 2012.
 - [33] M. Noguier-Dance, S. Abu-Amero, M. Al-Khtib, A. Lefèvre, P. Coullin, G. E. Moore, and J. Cavaillé, “The primate-specific microRNA gene cluster (C19MC) is imprinted in the placenta.," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 19, no. 18, pp. 3566–82, Sep. 2010.
 - [34] Tsai KW, Kao HW, Chen HC, et al, „Epigenetic control of the expression of a primate-specific microRNA cluster in human cancer cells.," *Epigenetics*, vol. 4, pp. 587–592, 2009.
 - [35] Saito Y, Jones PA, „Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells.," *Cell Cycle*, vol. 5, pp. 2220–2222, 2006.
 - [36] Y. Saito, H. Suzuki, H. Tsugawa, I. Nakagawa, J. Matsuzaki, Y. Kanai, and T. Hibi, “Chromatin remodeling at Alu repeats by epigenetic treatment activates silenced microRNA-512-5p with downregulation of Mcl-1 in human gastric cancer cells.," *Oncogene*, vol. 28, no. 30, pp. 2738–44, Jul. 2009.

- [37] Wu, S., Huang, S., Ding, J., Zhao, Y., Liang, L., Liu, T., Zhan, R., and He, X, "Multiple microRNAs modulate p21Cip1/Waf1 expression by directly targeting its 3'untranslated region.," *Oncogene*, vol. 29, pp. 2302–2308, 2010.
- [38] S. M. Tan, R. Kirchner, J. Jin, O. Hofmann, L. McReynolds, W. Hide, and J. Lieberman, "Sequencing of Captive Target Transcripts Identifies the Network of Regulated Genes and Functions of Primate-Specific miR-522.," *Cell Rep.*, vol. 8, no. 4, pp. 1225–1239, Aug. 2014.
- [39] Keklikoglou I, Koerner C, Schmidt C, et al. MicroRNA-520/373 family functions as a tumor suppressor in estrogen receptor negative breast cancer by targeting NF-κB and TGFβ signaling pathways. *Oncogene* 2011; [Epub ahead of print 12 Dec 2011. DOI: 10.1038/onc.2011.571]
- [40] Lv SQ, Kim YH, Giulio F, et al, „Genetic alterations in microRNAs in medulloblastomas.," *Brain Pathology*, vol. 22, pp. 230–239, 2012.
- [41] Li M, Lee KF, Lu Y, et al, „Frequent amplification of a chr19q13.41 microRNA polycistron in aggressive primitive neuroectodermal brain tumors.," *Cancer Cell*, vol. 16, pp. 533–546, 2009.
- [42] Butz H, Liko I, Czirjak S, et al, "Down-regulation of Wee1 kinase by a specific subset of microRNA in human sporadic pituitary adenomas.," *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 95, pp. 181–191, 2010.
- [43] Schepeler T, Reinert JT, Ostensfeld MS, et al, "Diagnostic and prognostic microRNAs in stage II colon cancer.," *Cancer Res*, vol. 68, pp. 6416–6424, 2008.
- [44] Fornari F, Milazzo M, Chieco P, et al, „In hepatocellular carcinoma miR-519d is upregulated by p53 and DNA hypomethylation and targets CDKN1A/p21, PTEN, AKT3 and TIMP2.," *J Pathol*, 2012.
- [45] Kim TH, Kim YK, Kwon Y, et al, "Deregulation of miR-519a, 153, and 485-5p and its clinicopathological relevance in ovarian epithelial tumours.," *Histopathology*, vol. 57, pp. 734–743, 2010.
- [46] Liu P, Wilson MJ, "miR-520c and miR-373 upregulate MMP9 expression by targeting mTOR and SIRT1, and activate the Ras/Raf/MEK/Erk signaling pathway and NF-κB factor in human fibrosarcoma cells.," *J Cell Physiol*, vol. 227, pp. 867–876, 2012.
- [47] Li X, Pan YZ, Seigel GM, et al, "Breast cancer resistance protein BCRP/ABCG2 regulatory microRNAs (hsa-miR-328, -519c and -520h) and their differential expression in stem-like ABCG2+ cancer cells.," *Biochem Pharmacol*, vol. 81, pp. 783–792, 2011.

- [48] Wang F, Xue X, Wei J, et al, “hsa-miR-520h downregulates ABCG2 in pancreatic cancer cells to inhibit migration, invasion, and side populations.,” *Br J Cancer*, vol. 103, pp. 567–574. 2010.
- [49] A. L. Kasinski and F. J. Slack, “Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy.,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 11, no. 12, pp. 849–64, Dec. 2011.
- [50] S. S. Jeffrey, “Cancer biomarker profiling with microRNAs.,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 26, no. 4, pp. 400–1, Apr. 2008.
- [51] F. Chen, H. Zhu, L. Zhou, S. Wu, J. Wang, and Z. H. I. Chen, “Inhibition of c-FLIP expression by miR-512-3p contributes to Taxol-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells,” pp. 1457–1462, 2010.
- [52] M. Petersen, C. B. Nielsen, K. E. Nielsen, G. A. Jensen, K. Bondensgaard, S. K. Singh, V. K. Rajwanshi, A. A. Koshkin, B. M. Dahl, J. Wengel, and J. P. Jacobsen, “The conformations of locked nucleic acids (LNA).,” *Journal of molecular recognition JMR*, vol. 13, no. 1, pp. 44–53, 2000.
- [53] C. R. Sibley, Y. Seow, H. Curtis, M. S. Weinberg, and M. J. a Wood, “Silencing of Parkinson’s disease-associated genes with artificial mirtron mimics of miR-1224.,” *Nucleic acids research*, vol. 40, no. 19, pp. 9863–75, Oct. 2012.
- [54] Anna Git, Heidi Dvinge, Mali Salmon-Divon, Michelle Osborne, Claudia Kutter, James Hadfield, Paul Bertone, Carlos Caldas, „Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression.,” *RNA*, 16, 5:991–1006., 2010.
- [55] „R: A Language and Environment for Statistical Computing”, <http://www.R-project.org>
- [56] Rosenbloom KR, Sloan CA, Malladi VS, Dreszer TR, Learned K, Kirkup VM, Wong MC, Maddren M, Fang R, Heitner SG, Lee BT, Barber GP, Harte RA, Diekhans M, Long JC, Wilder SP, Zweig AS, Karolchik D, Kuhn RM, Haussler D, Kent WJ., „ENCODE data in the UCSC Genome Browser: year 5 update.,” *Nucleic Acids Res.*, 41(Database issue):D56-63, 2013 Jan.