

XXXII. OTDK Biológia szekció

Nyúl miRNS-ek azonosítása és expressziójának vizsgálata különböző korú embriókban és őssejtekben

Készítette: Németh Kinga

Eötvös Loránd Tudományegyetem
Természettudományi Kar, Biológus MSc II.

Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet

Témavezető: Dr. Gócza Elen

Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet

Belső konzulens: Dr. Vellai Tibor

ELTE-TTK Genetikai Tanszék



Budapest

2014

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
1. BEVEZETÉS.....	5
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	12
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	13
3.1. Kísérleti állatok	13
3.2. RNS minták gyűjtése	13
3.2.1. Embriók gyűjtése	13
3.2.2. PGC sejtek gyűjtése	13
3.2.3. Fibroblaszt sejtek gyűjtése.....	13
3.2.4. Az embrionális sejtrétegek különválasztása	14
3.3. SOLID szekvenálás	14
3.4. Felhasznált adatbázisok.....	14
3.5. RNS izolálás és koncentráció mérés.....	14
3.5.1. TRIZOL reagensbe felvett minták	14
3.5.2. RNAzol reagensbe felvett minták	15
3.5.3. Koncentráció mérés	15
3.6. Az RNS minőségének ellenőrzése.....	15
3.7. Reverz transzkripció	15
3.8. Kvantitatív real-time PCR TaqMan™ Array Plate segítségével	15
3.9. In situ hibridizáció	15
3.10. Konfokális mikroszkóp	16
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKEKELÉSÜK.....	17
4.1. Nyúl miRNS szekvenciák azonosítása	17
4.2. A TaqMan Array Plate tervezése	17
4.3. Az azonosított szekvenciák helyének és egymáshoz való elhelyezkedésének meghatározása a nyúl genomban	19
4.4. A szekvenálás során kapott találatok és az expressziós értékek összehasonlítása	22
4.5. Az RNS izolálási technikák összehasonlítása.....	23
4.6. A miRNS-ek expressziójának vizsgálata különböző mintákban	23
4.6.1. A miR-290 klaszter expressziója	23
4.6.2. A miR-302 klaszter expressziója	24
4.6.3. A miR-17-92 klaszter, és 6 további miRNS expressziója	25

4.7. A miRNS-ek expressziójának vizsgálata a blasztocisza állapotú embrió különböző csíralemezeiben	26
4.8. Két miRNS expressziójának igazolása <i>in situ</i> hibridizációval	28
5. ABSZTRAKT.....	29
6. SUMMARY	30
7. IRODALOMJEGYZÉK	31
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	40
TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS	41

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

dpc	days <i>post coitum</i>
EMT	epitheliális-mezenchimális átmenet
Epi	epiblaszt
ESC, ES sejt	embrionális őssejt
FCS	fetal calf serum
FM	fibroblaszt médium
hCG	Human Chorionic Gonadotropin hormon
hsa	<i>Homo sapiens</i>
Hypo	hipoblaszt
iPSC, iPS sejt	indukált pluripotens őssejt
MEF	egér embrionális fibroblaszt
miRNS, miR	mikroRNS
mmu	<i>Mus musculus</i>
ocu	<i>Oryctolagus cuniculus</i>
PGC	primordial germ cell, ősvarsejt
PMSG	Pregnant Mare Serum Gonadotropin hormon
rabEF	nyúl embrionális fibroblaszt
SOLID	Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection
Tropho	trofoblaszt
UTR	untranslated region, nem transzlálódó rész

1. BEVEZETÉS

Az utóbbi időben a humán betegségek vizsgálatának egyre kedveltebb modellállata a nyúl (*Oryctolagus cuniculus*), mivel a korai embrionális fejlődése, így a nyúl őssejt vonalak jellemzői is, sokkal jobban hasonlítanak az emberéhez, mint az egér embrió fejlődése illetve az egér őssejt vonalak tulajdonságai (Fischer et al., 2012). Régóta szolgál olyan humán betegségek modellezésére, mint az atherosclerosis (érelmeszesedés), osteoarthritis (degeneratív ízületi gyulladás), tuberkulózis, az Alzheimer kór, vagy a diabétesz (cukorbetegség) (Narayanaswamy et al., 2000; Lin et al., 2007; Winiarska et al., 2008; Woodruff-Pak, 2008; Ramin et al., 2010; Zahn et al., 2010; Kang and Grossniklaus, 2011; Thieme et al., 2012).

Az orvosbiológia területén egyre nagyobb igény mutatkozik célzott genetikai módosítást hordozó nyulak előállítására, hogy ezáltal lehetővé tegyünk a jelenleg, megfelelő modell híján nehezen vizsgálható betegségek lefolyásának és öröklődésének tanulmányozását, valamint gyógyszerek és gyógymódok kidolgozását és tesztelését.

Ahhoz, hogy egyes betegségeket modell állatokon tudjunk vizsgálni, elengedhetetlenül fontos, hogy képesek legyünk az állat tulajdonságainak célzott módosítására. Ehhez megfelelő pluripotens őssejt vonalra van szükség, amely segítségével olyan kiméra állatok hozhatóak létre, melyek ivarsejtjeibe is képes integrálódni a transzgén, ezáltal lehetővé téve az új tulajdonság örökíthetőségét.

Az első nyúl embrionális őssejt (ES sejt) vonalat Újzélandi fehér nyúl blasztociszta állapotú embriójából alapították (Fang et al., 2006; Wang et al., 2007a), majd 2010-ben létrehozták az első, élve született, igazoltan ES sejt kiméra nyulat. Ennek ivarsejtjei között azonban nem volt a transzgenikus ES sejtekből származó ivarsejt, tehát utódaira nem tudta átörökíteni az új tulajdonságot (Zakhartchenko et al., 2011). Azóta is számos kutatás irányult nyúl pluripotens sejtek tenyésztésben való fenntartására (Wang et al., 2008a; Honda et al., 2009; Intawicha et al., 2009; Hsieh et al., 2011; Catunda et al., 2008), melyek ugyan hozzájárultak ahhoz, hogy egyre többet tudjunk meg az őssejteket befolyásoló faktorok szerepéről, de a megfelelő, valóban pluripotens sejtvonallal létrehozása mindmáig senkinek sem sikerült.

Mindezek nyomán, célunk olyan nyúl embrionális őssejt vonal alapítása, amelyből célzott genetikai módosítást hordozó, ivarsejt kiméra nyulak hozhatóak létre. Ehhez elengedhetetlenül szükséges, hogy megismerjük azokat a faktorokat, melyeknek szerepe van az embriófejlődésben, a sejtek pluripotens állapotának fenntartásában, az önmegújításban, és a

differentiálódás megindításában. Ez közelebb vihet minket ahhoz, hogy kiderítsük, hogy milyen faktorokra lenne szükség ahhoz, hogy a nyúl őssejtek pluripotens állapotát fenn tudjuk tartani hosszabb idejű tenyésztés során is.

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

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

A mikróRNK-eknek (miRNK) fontos szerepük van a pluripotencia fenntartásában, illetve a sejtek differenciálódásának beindításában, amit első sorban az úgynevezett pluripotencia gének (pl. Oct4, Sox2, Nanog) poszttranszkripcionális szabályozásával érnek el.

Az utóbbi évtizedek kutatásai során derült fény a miRNK-ek létezésére, és az általuk végzett fontos génregulációs mechanizmusokra. A miRNK-ek olyan, ~22 nukleotid hosszú, fehérjét nem kódoló, egyszálú RNS molekulák, amelyek alapvető szabályozó funkciók érzékeny beállításában vesznek részt (Bartel, 2004).

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

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

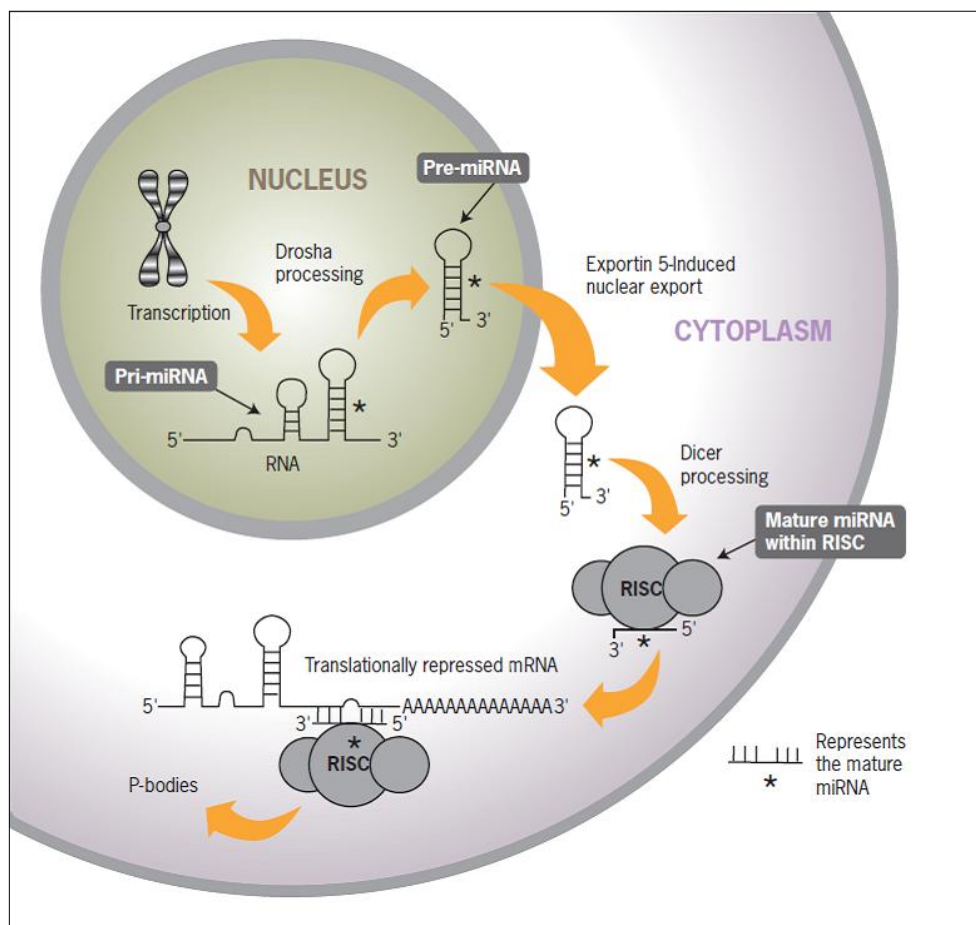
Azóta számos növényi és állati miRNS funkcióját vizsgálták. Bizonyítottan igen fontos szerepük van az állati sejtosztódás, sejthalál, sejt differenciálódás, és a zsír-anyagcsere szabályozásában (Ambros, 2004; Bartel, 2004; Brennecke et al., 2003; Xu et al., 2003), növényekben pedig a levél és a virág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

A miRNS-ek bioszintézisének kanonikus útvonala során (1.ábra) az RNS polimeráz II. enzim segítségével, a sejtmagban, endogén génről történik meg a transzkripció. Ennek eredményeként egy hosszú, több kanyarulatból álló molekula jön létre, a primer-miRNS (pri-miRNS), melyből a DGCR8 kofaktorrall rendelkező Drosha endoribonukleáz képes egy kb. 70 nukleotid hosszúságú hurok (stem loop) kihasítására, ez a prekursor-miRNS (pre-miRNS), amely az Exportin5 segítségével jut a citoplazmába. Itt a Dicer ribonukleáz a pre-miRNS egyik karjáról kihasítja a kb. 22 nukleotid hosszúságú, érett miRNS-t. Ez, az Argonaute család egyik tagjával együtt egy RISC nevű komplexet (RNA-induced silencing complex) alkotva képes az mRNS 3' végén lévő nem transzlálódó régióhoz (Untranslated Region, UTR) kapcsolódni (Cullen, 2004; Lee et al., 2002; Tomari and Zamore, 2005), ahol a transzlációt gátolja, vagy az mRNS degradációját okozza (Lim et al., 2005). A miRNS-ek szabályozó szerepüket tehát poszttranszkripcionális módosítás révén fejtik ki.

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

A miRNS-ek sejt differenciálódással kapcsolatos szerepe legjobban talán úgy vizsgálható, ha feltérképezzük, hogy mely miRNS-ek jellemzőek az egyes sejttípusokra és fejlődési állapotokra, és hogy ezek expressziós szintje hogyan változik az egyedfejlődés során. Elvégezhető továbbá a miRNS-ek funkcionális analízise, amely során *in vitro*

túlexpresszáltatjuk, illetve gátoljuk az egyes miRNS-eket, és figyeljük, hogy ennek milyen hatása van más gének expressziójára, és az egyedfejlődés menetére.



1. ábra A miRNS-ek biogenezisének kanonikus útvonala (Kuo et al., 2012).

Ennek fényében kezdtük vizsgálni a miRNS-ek expresszióját különböző korú embriókban, embrionális őssejtekben, és ősvarsejtekben (primordial germ cell, PGC). A nyúl embrionális őssejtek tápláló sejtrétegeként inaktivált egér fibroblaszt sejteket használunk, ezért ennek, és a nyúl embrionális fibroblasztnak az analízisét is elvégeztük. Ez utóbbi sejttípust használják fel az indukált pluripotens sejtek létrehozásakor.

Mivel nyúl esetében vizsgálataink megkezdésekor még nem közöltek miRNS szekvenciákat, első lépésként SOLID technológiával megszekvenáltattunk különböző nyúl szövetekből, sejtekből származó RNS mintákat, majd az így kapott szekvencia adatokban kerestem már ismert egér, humán és szarvasmarha miRNS-ek homológjait. Az így azonosított ocu-miRNS szekvenciákat real-time PCR-t alkalmazva validáltam.

Azt, hogy a miRNS-ek szekvenciájukat tekintve erősen konzerváltak, feltehetően a fontos szabályozó szerepüknek köszönhetik. Okkal feltételezhetjük tehát, hogy funkcionális

konzerváltság is jellemezheti azokat. Ennek megfelelően olyan miRNS-eket választottam ki a további analízisre, melyekről irodalmi adatok alapján feltételeztük, hogy őssejt-specifikusak, szerepük lehet a pluripotens állapot megtartásában, vagy éppen a differenciálódás megindításában.

Három ES sejt specifikus klasztert, a miR-290, a miR-302 és a miR-17-92 klasztert választottam ki a validáláshoz.

A miR-290 klaszter miRNS-eiről tudjuk, hogy az egér embrionális őssejtekben erősen expresszálódnak (Houbaviy et al., 2003), és gátolják a differenciálódást (Zovoilis et al., 2009). Ezen felül fontos szerepe van a *de novo* DNS metiláció szabályozásában a differenciálatlan ES-sejtekben (Benetti et al., 2008; Sinkkonen et al., 2008), és a sejtciklus szabályozásában azáltal, hogy gátolja a G1-S átmenetet (Lichner et al., 2011; Wang et al., 2008b). A klaszter promotere olyan, a pluripotens állapotért felelős transzkripciós faktorok célszekvenciáit tartalmazza, mint a Oct4 (Pou5f1), a Sox2, és a Nanog (Marson et al., 2008).

A miR-302 klaszter szintén erősen expresszálódik az egér és a humán embrionális őssejtekben, és expressziójuk csökken a differenciálódás során (Chen et al., 2007). A miR-290-hez hasonlóan ez a klaszter is sejtciklus-regulátor. Humán embrionális őssejtekben írták le, hogy a klaszter tagjai elősegítik a sejtek önmegújítását a ciklinD1 és a cdk4 poszttranszkripcionális szabályozása révén (Card et al., 2008). Ez a klaszter feltehetőleg pozitívan szabályozza a Nodal/Activin útvonalat, amely hozzájárul a pluripotencia fenntartásához (Barroso-del Jesus et al., 2009). A miR-302 gén promotere maga is olyan transzkripciós faktorok targetje, mint a Nanog, az Oct4, a Rex1, és a Sox2 (Barroso-delJesus et al., 2008; Card et al., 2008).

A harmadik vizsgált klaszter (miR-17-92) szintén erősen expresszálódik a humán embrionális őssejtekben (Houbaviy et al., 2003; Laurent et al., 2008; Morin et al., 2008).

Emberben a miR-99a, a miR-let7c, és a miR-125b egy klaszterbe rendeződnek a 21-es kromoszómán. Ebből a klaszterből a miR-99a és a miR-125b első sorban tumor szupresszor hatású (Nam et al., 2008; Liang et al., 2010; Li et al., 2011a; Sun et al., 2011). A miR-99a szabályozza továbbá a TGF- β által vezérelt epitheliális-mezenchimális átmenetet (EMT), valamint megállítja a sejtciklust a G1 fázisban (Cui et al., 2012; Turcatel et al., 2012). A miR-125b-nek a humán embrionális őssejtekben szerepe van a mezodermális irányú differenciálódás megindításában (Wong et al., 2012).

A let-7 géncsalád a humán embrionális őssejtekben alacsony szinten fejeződik ki, majd a differenciálódó sejtekben és a legtöbb felnőtt sejttypusban megnő a szintje (Lakshmipathy et al., 2007; Gu et al., 2008).

Kimutatták, hogy a miR-145-nek fontos szerepe van a differenciálódás megindításában, és a pluripotencia gátlásában azáltal, hogy olyan pluripotencia-faktorokat gátol, mint az Oct4, a Sox2, és a Klf4 (Xu et al., 2009).

Egy másik, korai differenciálódásért felelős miRNS a miR-1, ami specifikusan expresszálódik az izomszövetekben (Zhao et al., 2005; Xie et al., 2011), és az egér embrionális őssejtekbe való juttatása erősíti a szívizom irányú differenciálódást (Glass and Singla, 2011).

Napjainkig az egér embrionális őssejtekből létrehozott sejtvonalt az egyetlen olyan őssejt vonal, amely a pluripotencia minden kritériumának megfelel. A legújabb kutatások rámutattak arra, hogy az eddig pluripotensnek tartott sejteken belül is különböző állapotokat különíthetünk el. Úgy gondoljuk, hogy az egér embrionális őssejtek egy korábbi fejlődési stádiumot, ún. „naív” állapotot képviselnek, míg a késői egér epiblasztból alapított sejtvonalt sejtjei már fejlettebb, differenciálódottabb állapotban vannak, osztódásuk fenntartásához más növekedési faktorra van szükség. Ezutóbbi sejtek ivarsejt kiméra létrehozására nem alkalmasak, így ezeket „primed”, más néven „érett” állapotban levő embrionális őssejteknek nevezzük (Nichols and Smith, 2009).

A jelenleg ismert humán és nyúl embrionális őssejt vonalak az egér epiblaszt sejtvonalakhoz hasonlítanak, vagyis úgy tűnik, hogy már ebben a későbbi, „primed” állapotban lévő őssejteknek feleltethetőek meg.

Azon kívül, hogy a miRNS-eknek fontos szerepük van az ES sejtek fenntartásában, egyre több publikáció jelenik meg arról, hogy igen jelentősek lehetnek az indukált pluripotens (iPS) sejtek létrehozása során is (Judson et al., 2009; Anokye-Danso et al., 2011; Li et al., 2011b; Miyoshi et al., 2011; Subramanyam et al., 2011; Yang et al., 2011). Judson és mtsi. (2009) kimutatták, hogy az egyik Yamanaka faktor (Takahashi and Yamanaka, 2006), a c-Myc, helyettesíthető a miR-290 klaszter egyetlen tagjával és ez egerekben erősíti a szomatikus sejt-iPS sejt átalakulást (Judson et al., 2009). A legújabb kutatások kimutatták, hogy a miR-302 klaszter lentivírus vektor segítségével való bejuttatásával, illetve a let-7 miRNS klaszter expressziójának gátlásával (Worringer et al., 2014) mind az emberi, mind az egér szomatikus sejtek visszaprogramozhatóak az eredeti Yamanaka faktorok nélkül (Anokye-Danso et al., 2011). Érdekes módon az egér és a humán sejtek is visszaprogramozhatóak az érett, dupla szálú miRNS-ek segítségével, anélkül, hogy bármilyen vektor alapú géntranszfert kellene használnunk (Miyoshi et al., 2011). Ez a módszer számos új lehetőséget nyit meg az iPS sejtek létrehozására, és kiküszöböli azokat, az aggályokat felvető lépéseket, hogy vírusok vagy onkogének bejuttatása szükséges a visszaprogramozáshoz.

Elképzeléseink szerint, ha a nyúl őssejtek pluripotenciáját sikerülne megtartanunk, vagy visszaprogramoznunk őket a „naiv” állapotba, és így valóban pluripotens sejtvonalatokat létrehozunk, akkor ezek a sejtek már alkalmasak lehetnének ivarsejt kiméra nyulak létrehozására, melynek kimagasló jelentősége lenne az egyes öröklődő humán betegségek vizsgálatában.

Ezen állapotok pontosabb megértése érdekében külön is megvizsgáltam az egyes csíralemezek (epiblaszt, hipoblaszt, trofoblaszt) miRNS expressziós mintázatát, majd néhány miRNS kifejeződését *in situ* hibridizációval is igazoltam.

További munkám során tervezem még több miRNS *in situ* hibridizációs vizsgálatát, valamint a miRNS-ek targetjeinek bioinformatikai úton való predikcióját, és ezt követően kísérletes igazolását is. Szeretném elvégezni az expressziós adatok alapján fontosnak tűnő miRNS-ek funkcionális analízisét, vagyis *in vitro* túlexpresszáltatása és gátlása révén vizsgálni, hogy milyen hatása van az embriófejlődésre és a sejt differenciálódásra. A funkcionális analízis során szeretném vizsgálni a feltételezett target szintjének változását is, és mindkettő kifejeződését *in situ* hibridizációval igazolni.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során a következő célokat tűztem ki:

1. Új nyúl miRNS-ek azonosítása, SOLID szekvenálással kapott nyúl szekvenciákat egér, humán és szarvasmarha miRNS adatbázisokban található szekvenciákkal összehasonlítva.
2. A legfontosabb, feltételezhetően a nyúl embriókban és pluripotens sejtekben kifejeződő miRNS klaszterek azonosítása és feltérképezése a nyúl genomban.
3. A real-time PCR-el kapott expressziós adatok összehasonlítása a korábban SOLID szekvenálás során, az adott szekvenciákra kapott találatszámokkal.
4. A további real-time PCR-es vizsgálatok megkezdése előtt a különböző RNS izolálási technikákat, a kinyert RNS intaktsága és a frakciók tisztasága alapján összehasonlítva megtalálni a legalkalmasabb RNS és miRNS izolálási módszert.
5. A szekvencia adatok alapján azonosított nyúl miRNS szekvenciák validálása, és expressziójuk vizsgálata nyúl embriókban, őssejtekben, és embrionális szövetekben kvantitatív real-time PCR-rel.
6. A 6 napos nyúl embrióban expresszáldó miRNS-ek kimutatása *in situ* hibridizációval.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Kísérleti állatok

Kísérleteimhez Újzélandi fehér nyulat (házi nyúl, *Oryctolagus cuniculus*) (Tetrabbit Ltd., Kartal, Magyarország), és CD1/EGFP törzsből származó egereket használtam, melyek tartását, a rajtuk alkalmazott kísérleti eljárásokat, és a belőlük nyert embriók kezelését az „Állatkísérlet végzésére szóló rendelet”-nek megfelelően végeztem. Kutatócsoportunk legfrissebb állatkísérleti engedélye, a legújabb Európai Unió szabályozáshoz igazodik, 2018.02.13-ig érvényes. Az engedély száma: PEI/001/303-4/2013.

3.2. RNS minták gyűjtése

A mintákat az RNS épségének megőrzése érdekében RNAlater-be vettem fel, és -20°C-on tároltam, majd közvetlenül az izolálás előtt tettem át az alkalmazott RNS izolálási technikának megfelelő reagensbe (TRIZOL, RNAzol Reagens).

3.2.1. Embriók gyűjtése

A megfelelő számú embrió eléréséhez a nőstény nyulakat 3-4 hónapos korban PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin), majd 72 óra elteltével hCG (Human Chorionic Gonadotropin) kezeléssel szuperovuláltattuk, és Újzélandi fehér bakoktól frissen nyert spermával mesterségesen termékenyítettük.

A 6 és 7 napos embriókat kb. 10 ml 20% FCS-t tartalmazó PBS oldattal a petevezető irányából mostuk ki (Besenfelder et al., 1998), majd random poolozva az RNS izolálásig RNAlater-ben -20°C-on tároltuk. A real-time PCR vizsgálatokhoz kb. 50db 6 napos embriót használtunk fel.

A 14 napos embriókat császármetszéssel nyertük ki az anyaméhéből, majd PBS-sel mostuk. Ezután az RNS izolálásig RNAlater-ben -20°C-on tároltuk. A real-time PCR vizsgálatokhoz 2db 14 napos embriót pooloztunk.

3.2.2. PGC sejtek gyűjtése

A PGC sejteket (primordial germ cell) tartalmazó ivarlécet 14 napos nyúl embrióból nyertük. A real-time PCR vizsgálatokhoz egy embrió mindkét ivarlécét használtuk.

3.2.3. Fibroblaszt sejtek gyűjtése

A fibroblaszt sejtekről először eltávolítottam az elhasznált tápoldatot, majd miután PBS-sel mostam a sejteket, tripszinben 37°C-on, 5%-os CO₂ koncentráció mellett 10 percen át inkubáltam. Ezután fibroblaszt médiummal (FM) leállítottam a tripszint és 7 percen át 4°C-on,

1400 rpm-en centrifugáltam. A felülúszó leszívása után a pelletet PBS-ben felfuszpendáltam és két részre osztottam, majd az előbbi módon ismét centrifugáltam. A PBS eltávolítása után a pelletet -70°C-on tároltam.

3.2.4. Az embrionális sejtrétegek különválasztása

Ahhoz, hogy a trofoblasztban, az embrióblasztban, és annak két rétegében (epiblaszt, hipoblaszt) vizsgálni tudjuk a sejttípus-specifikus expressziós mintázatot, a blasztocisztát körülvevő zóna pellucidát mechanikusan távolítottuk el, majd izoláltuk az embrióblasztot a trofoblaszttól. Később kidolgoztuk azt a technikát is, amelyben epiblasztot és a trofoblasztot is külön tudtuk választani (Schmaltz-Panneau et al., 2014). Az izolált sejteket felhasználásig -70°C-on tároltuk.

3.3. SOLID szekvenálás

A szekvenálást a Bay Zoltán Közhasznú Nonprofit Kft. Növénygenomikai, Humán Biotechnológiai és Bioenergiai Intézetében (BAYGEN) végezték (www.baygen.hu).

Hét mintát szekvenáltattunk meg: 14 napos nyúl embrióból származó fibroblaszt és PGC sejtek, egyszer passzált nyúl embrionális őssejtek, 14 napos egér embrióból származó fibroblaszt, valamint 6, 7 és 14 napos nyúl embriók. Az analízishez 5db 6 napos, 10db 7 napos és 3db 14 napos embriót használtunk fel.

3.4. Felhasznált adatbázisok

A humán és egér miRNS szekvenciákat a miRbase (www.mirbase.org) szabadon hozzáférhető, online miRNS adatbázisból vettem (Griffiths-Jones, 2004; Griffiths-Jones et al., 2006, 2008; Kozomara and Griffiths-Jones, 2011, 2014).

A teljes genomokban való keresést a BLAT (Blast-Like Alignment Tool) online szoftverrel végeztem (oryCun2, <http://genome.ucsc.edu>).

3.5. RNS izolálás és koncentráció mérés

3.5.1. TRIZol reagensbe felvett minták

A mintákat RNAlater-ből TRIZol (SIGMA) reagensbe raktam át (a pelletként lefagyasztott sejtek esetén egyszerűen hozzáadtam a reagenst) és 5 perc elteltével az oldatot felfuszpendáltam. További 5 percig szobahőmérsékleten állni hagytam majd újra szuszpendáltam. A mintákat a gyártó utasítása szerint vagy azonnal izoláltam, vagy a későbbi izolálásig -70°C-on tároltam.

3.5.2. RNAzol reagensbe felvett minták

A mintákat RNAlater-ből RNAzol reagensbe (CSERTEX) raktam át (a pelletként lefagyasztott sejtek esetén egyszerűen hozzáadtam a reagenst) és alaposan felszuszpendáltam. Az izolálást a gyártó utasításának megfelelően végeztem. Későbbi izolálás esetén a mintát -70°C-on tároltam.

3.5.3. Koncentráció mérés

Az RNS minták koncentrációját Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer-rel mértem.

3.6. Az RNS minőségének ellenőrzése

Az RNS minták tisztaságát és intaktságát Agilent 2100 bioanalyzerrel (Agilent Technologies) ellenőriztem.

3.7. Reverz transzkripció

A cDNS szintézist TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit-el végeztem (Applied Biosystems), a gyártó ajánlása alapján. A reakcióhoz a TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription (RT) Assay-eket (Applied Biosystems) poolozva alkalmaztam.

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

3.8. Kvantitatív real-time PCR TaqMan™ Array Plate segítségével

A miRNS-ek expressziójának meghatározásához az általunk tervezett Custom TaqMan™ Array Plate-eket használtam, melyek mindegyike 23 rászárított miRNS próbát tartalmazott. Egy plate egy minta mérésére szolgál, illetve minden minta mellett szerepel a 6 napos embrió, mint belső kontroll minta (interplate control, IPC).

A reakciót TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG felhasználásával, Eppendorf Mastercycler® ep realplex4 készüléken végeztem. Belső kontroll génként a miR-191-et, belső kontroll mintaként pedig a 6 napos embriót használtam.

Az adatok analízisét GenEx qPCR adat analizáló szoftverrel (<http://www.multid.se>) végeztem.

3.9. In situ hibridizáció

Az *in situ* hibridizációhoz miRCURY LNA™ microRNA Detection próbákat (EXIQON) alkalmaztam.

Az embriók fixálását és az *in situ* hibridizációt az Exiqon cég ajánlása alapján végeztem (Thisse et al., 1993, 2004), fluoreszcens próbát alkalmazva. A sejtmagok festéséhez propidium-jodidot használtam.

3.10. Konfokális mikroszkóp

Az *in situ* hibridizáció eredményét Leica TCS SP8 konfokális mikroszkóp segítségével elemeztem.

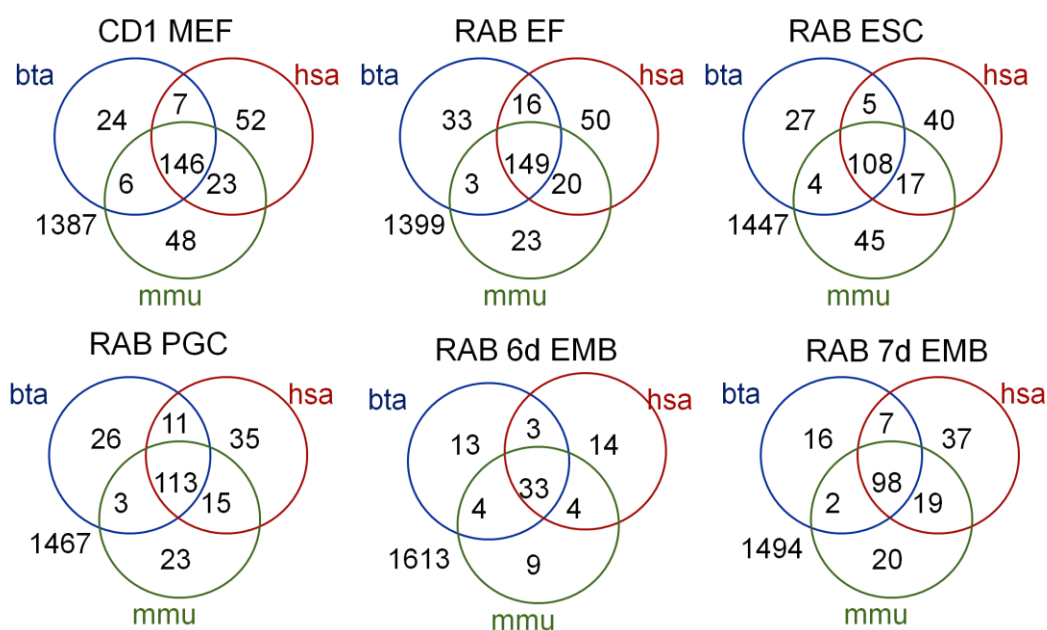
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1. Nyúl miRNS szekvenciák azonosítása

SOLID új generációs szekvenálási technikával hét mintát szekvenáltattunk meg: 14 napos nyúl embrióból származó fibroblaszt (rabEF) és PGC sejtek, nyúl embrionális őssejtek (rabES), 14 napos egér embrióból származó fibroblaszt (MEF), valamint 6, 7 és 14 napos nyúl embriók (dpc, days post coitum).

Ezekben az adatokban a miRbase online adatbázis alapján kerestünk már ismert egér, humán, és szarvasmarha miRNS-ek homológjait.

Összesen 1693 nyúl miRNS szekvenciát azonosítottunk, melyekről megállapítható, hogy alapvetően nagyobb hasonlóságot mutatnak a humán szekvenciákkal, mint az egérrel vagy a szarvasmarhával (2. ábra).



2. ábra A talált miRNS szekvenciák fajok közti hasonlósága az egér (CD1 MEF) és nyúl fibroblasztban (rabEF), az ES (rabESC) és PG (rabPGC) sejtekben, valamint a 6 (rab 6d emb) és 7 (rab 7d emb) napos nyúl embriókban.

4.2. A TaqMan Array Plate tervezése

Azt, hogy a miRNS-ek szekvenciájukat tekintve ennyire konzerváltak, feltehetően a fontos szabályozó szerepüknek köszönhetik. Okkal feltételezhetjük tehát, hogy funkcionális konzerváltság is jellemezheti őket. Ennek megfelelően olyan miRNS-eket választottam ki a további analízisre, melyekről irodalmi adatok alapján feltételeztük, hogy őssejt-specifikusak, szerepük lehet a pluripotens állapot megtartásában, vagy éppen a differenciálódás megindításában.

A válogatáshoz alapul vettem továbbá a SOLID szekvenálás során kapott talátszámokat is, mivel kezdetben úgy véltük, hogy ezek iránymutatást adhatnak arra vonatkozóan, hogy egy-egy miRNS milyen erősen fejeződik ki az adott mintában (1.táblázat).

1.táblázat A kiválasztott miRNS-ek talátszámai a 7 mintában.

miRNS	MEF	rabEF	rabES	PGC	6dpc	7dpc	14dpc
miR-294-3p	0	0	0	1	19	405	1
miR-292-3p	0	0	0	0	46	309	0
miR-290-5p	1	1	2	9	160	4841	9
miR-520e	0	0	0	0	0	37	0
miR-498	0	1	0	2	30	28	0
miR-512-5p	0	0	0	0	32	1104	0
miR-302b-3p	0	0	3	0	4	25	4
miR-302c-3p	0	0	0	0	0	0	0
miR-302a-3p	0	0	8	0	0	19	2
miR-302d-3p	0	0	3	0	0	32	5
miR-367-3p	0	0	0	0	0	0	0
miR-99a-5p	915	442	84	106	0	17	11640
miR-let-7c	116	12	17	3	0	2	123
miR-125b-5p	3582	1820	696	89	9	18	13055
miR-17-3p	0	4	0	3	0	0	149
miR-92-3p	143	516	95	1441	53	415	6919
miR-let-7b-5p	472	124	73	8	1	29	345
miR-145-5p	9907	2753	1466	215	29	182	5809
miR-1	0	0	0	0	0	0	58
miR-191-5p	794	737	171	136	12	252	5342

A legfontosabb miRNS szekvenciák felhasználásával az általunk tervezett miRNS plate (TaqMan Custom Array Plate) segítségével, 23 miRNS expressziója vizsgálható egyszerre egy mintából. Minden miRNS esetén három párhuzamos méréssel dolgoztam, és természetesen negatív kontrollt is alkalmaztam. Minden esetben, a platen a 6 napos embrióból mintát is vizsgáltam kontroll mintaként, annak érdekében, hogy a különböző futások során kapott expressziós értékek összehasonlíthatóak legyenek (3.ábra). Minden plate esetén azonos Ct (threshold cycle) értéket állítottam be.

Sikerült azonosítanom a nyúl szekvenciákban három, más fajokban összejt specifikusnak leírt klaszter, a miR-290, a miR-302 és a miR-17-92 klaszter tagjait. Ezek mellett vizsgáltam a miR-99a, a miR-let7c, és a miR-125b miRNS-eket, melyek emberben a 21-es kromoszómán helyezkednek el, és szerepük van a sejtciklus szabályozásában. A miR-125b-ről nemrégiben derült ki, hogy a humán embrionális összejtekben szerepe van a mezodermális irányú differenciálódás megindításában is (Wong et al., 2012). Vizsgáltam a let7 géncsalád egy másik tagját is, a miR-let-7b miRNS-t, mivel erről a családról más fajokban leírták, hogy az embrionális összejtekben alacsonyan expresszálódik, de a differenciálódás

során megnő a szintje és fontos szerepe lehet a differenciálódás kezdetének szabályozásában (Lakshmipathy et al., 2007; Gu et al., 2008). A miR-145-ről korábban kimutatták, hogy a humán embrionális őssejtekben fontos szerepe van a differenciálódás megindításában, és a pluripotencia gátlásában azáltal, hogy olyan pluripotencia-faktorokat gátol, mint az Oct4, Sox2, KLF4 (Xu et al., 2009). Egy másik korai differenciálódásért felelős miRNS a miR-1, ami specifikusan expresszálódik a szívizomban, valamint a sima-, és vázizomban egyaránt (Zhao et al., 2005; Xie et al., 2011).

Mindezeket figyelembe véve terveztük meg a plate-ek felépítését (3.ábra).

A miR-191 a miR-423 és az snoRNS-135 belső kontrollként szerepelt a plate-en.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	302a	302a	302a	294	294	294	99a	99a	99a	191	191	191
B	320b	302b	302b	512	512	512	125b	125b	125b	423	423	423
C	302c	302c	302c	498	498	498	145	145	145	302a	302a	302a
D	302d	302d	302d	520e	520e	520e	miR-1	miR-1	miR-1	292	292	292
E	367	367	367	let-7b	let-7b	let-7b	191	191	191	294	294	294
F	m-290	m-290	m-290	let-7c	let-7c	let-7c	423	423	423	512	512	512
G	o-290	o-290	o-290	17	17	17	sno135	sno135	sno135	92	92	92
H	292	292	292	92	92	92	191	191	191	145	145	145
	MINTA						NTC			6d emb IPC		

3. ábra A TaqMan Array Plate-ek felépítése. A piros szín jelöli azokat a „lukakat”, ahová a vizsgált minta kerül, a zöld a negatív kontrollt, míg a lila a 6 napos embrió mintát. Minden esetben 3 párhuzamos mérést végeztem.

Az expressziós vizsgálatához kiválasztott miRNS szekvenciákat visszakerestem a nyúl genomában, és meghatároztam, hogy melyik kromoszómán pontosan hol, és milyen irányultságban helyezkednek el, valamint ellenőriztem a szekvencia pontosságát.

4.3. Az azonosított szekvenciák helyének és egymáshoz való elhelyezkedésének meghatározása a nyúl genomában

Az egér miR-290 klaszter a 7-es kromoszómán helyezkedik el, és 14 érett miRNS keletkezik róla (Houbaviy et al., 2003, 2005). Ezen klaszter humán homológja a hsa-miR-371 klaszter. Ennek 4 tagja van, melyek a 19-es kromoszómán helyezkednek el, és szintén az embrionális őssejtekben expresszálódik (Houbaviy et al., 2003; Suh et al., 2004; Laurent et al., 2008).

Az ocu-miR-290 klaszternek három tagja van: az ocu-miR-294-3p, ocu-miR-292-3p, és az ocu-miR-290-5p, melyek negatív irányultságban helyezkednek el a chrUn0226 kontigon. Ugyan ezen a kontigon helyezkedik el az ocu-miR-512, az ocu-miR-520e, és az ocu-miR-498 (2.táblázat).

2. táblázat A miR-290 és a miR-512 (C19MC klaszter) elhelyezkedése a nyúl genomban.

miRNS	hossz	érett miRNS szekvencia	krsz.	irány	kezdet	vége
ocu-miR-294-3p	22	AAAGTGCTTCCCTTTGTGTGT	Un0226	-	215979	216000
ocu-miR-292-3p	22	AGTGCCGCCAGGTTTGAGTGT	Un0226	-	216438	216459
ocu-miR-290-5p	22	ACTCAAACCGTGGGGGCACTTT	Un0226	-	216476	216497
ocu-miR-520e	21	AAAGTGCTTCCCTTTTGAGTGT	Un0226	-	224117	224137
ocu-miR-498	23	TTCAAGCTGGGGGTGTTTTG	Un0226	-	224331	224353
ocu-miR-512-I-5p	22	ACTCAGCCTTGGGGGCACTTCC	Un0226	-	225955	225976
ocu-miR-512-3p	22	AAGTGCCGTCAAGTTGAGCTT	Un0226	-	225916	225937
ocu-miR-512-II-5p	22	ACTCAGCCTTGGGGGCACTTCC	Un0226	-	228779	228800
ocu-miR-512-3p	22	AAGTGCCGTCAAGTTGAGCTT	Un0226	-	228740	228761

Ez alapján felrajzolhatjuk a miR-290 (újabb nevén C19MC) klaszter tagjainak elrendeződését a nyúl genomban (4. ábra).



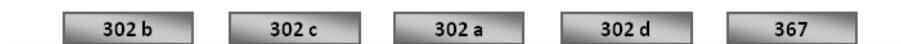
4. ábra Az ocu-miR-290 (C19MC) klaszter elrendeződése a nyúl genomban.

A policisztronos miR-302 klaszter emberben a 4-es kromoszómán helyezkedik el, és 10 érett miRNS keletkezik róla (Houbaviy et al., 2003; Suh et al., 2004). Egér homológja a 3-as kromoszómán található, és mind a 10 érett miRNS homológja megtalálható. Nyúlban is megtaláltam a miR-302 klaszter tagjait, méghozzá pozitív irányultságban a 15-ös kromoszómán (3.táblázat). A klaszter felépítése és tagjainak sorrendje megegyezik az egér és humán homológéval.

3. táblázat A miR-302 klaszter tagjainak elhelyezkedése a nyúl genomban.

miRNS	hossz	érett miRNS szekvencia	krsz.	irány	kezdet	vége
ocu-miR-302b-5p	22	ACTTTAACATGGAGGTGCTTTC	15	+	36769637	36769658
ocu-miR-302b-3p	23	TAAGTGCTTCCATGTTTAGTCG	15	+	36769680	36769702
ocu-miR-302c-5p	22	TTTAACATGGGGGTACCTGCTG	15	+	36769777	36769798
ocu-miR-302c-3p	23	TAAGTGCTTCCATGTTTCAGTGG	15	+	36769812	36769834
ocu-miR-302a-5p	23	ACTTAAACGTGGATGTACTTGCT	15	+	36769951	36769973
ocu-miR-302a-3p	20	TAAGTGCTTCCATGTTTGGTGA	15	+	36769989	36770008
ocu-miR-302d-5p	22	ACTTTAACATGGAGGCACTTGC	15	+	36770114	36770135
ocu-miR-302d-3p	23	TAAGTGCTTCCATGTTTGAGTGT	15	+	36770152	36770174
ocu-miR-367-5p	22	ACTGTTGCTAATATGCAACTCT	15	+	36770238	36770259
ocu-miR-367-3p	22	AATTGCACTTAGCAATGGTGA	15	+	36770276	36770297

Ezek alapján felrajzolhatjuk a miR-302 klaszter elrendeződését is a nyúl genomban (5. ábra).



5. ábra Az ocu-miR-302 klaszter tagjainak elrendeződése a nyúl genomban.

A miR-17-92 klaszternek két tagját találtam meg a nyúl szekvenciákban, az ocu-miR-17-5p-t, és az ocu-miR-92a-1-3p-t, amelyek szekvenciája 100%-ban megegyezik az emberivel. Nyúlban a 8-as kromoszómán, pozitív irányultságban helyezkednek el (4.táblázat).

Emberben a miR-99a, a miR-let7c, és a miR-125b egy klaszterbe rendeződnek a 21-es kromoszómán. Ezen három miRNS nyúl homológja, az ocu-miR-99a-5p, az ocu-miR-let-7c, és az ocu-miR-125b-5p pozitív irányban helyezkedik el a nyúl genomban a 14-es kromoszómán (4.táblázat). Mindhárom miRNS szekvenciája 100%-ban megegyezik a humán homológjával.

Az ocu-miR-let-7b-5p egy rövid kontigon (chrUn0230) pozitív irányultságban helyezkedik el (4.táblázat).

Mind az ocu-miR-145-5p, mind az ocu-miR-1 100%-os szekvenciális egyezést mutat a humán szekvenciákkal, és a nyúl genomban a 3-as (pozitív irányban), illetve a 9-es (negatív irányban) kromoszómán helyezkednek el (4.táblázat).

4. táblázat A miRNS-ek elhelyezkedése a nyúl genomban.

miRNS	hossz	érett miRNS szekvencia	krsz.	irány	kezdet	vége
ocu-miR-17-5p	24	CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGT	8	+	93067688	93067771
ocu-miR-92-1-3p	21	TATTGCACCTTGCCCGGCCTGT	8	+	93068461	93068482
ocu-miR-99a-5p	22	AACCCGTAGATCCGATCTTG	14	+	144547521	144547542
ocu-let-7c	22	TGAGGTAGTAGTTGTATGGTT	14	+	144548251	144548272
ocu-miR-125b-5p	22	TCCCTGAGACCTAACTTGTA	14	+	144598484	144598505
			1	+	95926707	95926728
ocu-let-7b-5p	22	TGAGGTAGTAGTTGTGTGGTT	Un0230	+	74189	74210
ocu-miR-145-5p	23	GTCCAGTTTTCCAGGAATCCCT	3	+	31259937	31259959
ocu-miR-1	22	TGGAATGTAAAGAAGTATGTAT	9	-	63183544	63183565

Ezt követően, az expressziós vizsgálatokhoz a nyúl genomi szekvenciák alapján is igazolt szekvenciák segítségével terveztük meg a nyúl specifikus miRNS primereket. Mielőtt azonban nekikezdtém volna a nagyobb szabású génexpressziós vizsgálatoknak, kisebb metodikai kitérőt tettem. Részben azért, hogy validáljam a szekvenálás során megtalált szekvenciák egy részét real-time PCR-rel is, vagyis igazoljam, hogy a talált szekvenciák valóban kifejeződnek az adott mintákban, másrészt pedig arra a kérdésre kerestem a választ, hogy a SOLID szekvenálás során kapott találatszámok használhatóak-e génexpresszió

becslésre. Ezen felül szerettem volna megtalálni azt az RNS izolálási módszert, mellyel a legtisztább mintákat, s így a mérés során a legpontosabb eredményeket kaphatom.

4.4. A szekvenálás során kapott találatszámok és az expressziós értékek összehasonlítása

Még a megtervezett plate-ekkel végzett expressziós vizsgálatok előtt szerettem volna tesztelni azt a hipotézist is, miszerint a SOLID szekvenálás során kapott találatszámok alkalmasak a génexpresszió becslésére. Ennek érdekében real-time PCR-rel vizsgáltam a szekvencia adatok alapján azonosított hat miRNS expresszióját három mintában, és összehasonlítottam a szekvenálás során kapott találatzámaikkal.

Először egér és nyúl fibroblaszt sejtekben és 14 napos embrióban vizsgáltam a következő miRNS-ek expresszióját: miR-302a, miR-367, miR-92a, miR-125b, miR-145, let7b.

Az összehasonlítás során azt tapasztaltam, hogy a SOLID szekvenálással kapott találatszámok egy az egyben nem hasonlíthatóak össze a real-time PCR analízis során kapott relatív expressziós értékekkel, pontos génexpressziós mintázat általuk nem írható le. Bár egyes esetekben nagyságrendi becslést végezhetünk, tehát igaz, hogy a nagyon magas találatszámú miRNS-ek nagyon erősen expresszálódnak és a nagyon alacsony találatszámúak nagyon gyengén, de a szélsőértékektől távolodva ez a különbség teljesen elmosódik, felborul, így általánosságban nem igaz, hogy az a miRNS, amely nagyobb találatzámmal fordul elő egy mintában, annak az expressziója valóban erősebb.

Felvettem, hogy talán pontosabb összehasonlítást tenne lehetővé az RNAzol reagensbe felvett RNS minták alkalmazása, ahol a korábbi, TRIzolához képest, külön izolálható a kis RNS frakció. Ennek köszönhetően, a miRNS expresszióját a teljes (bemért) kis RNS koncentrációhoz viszonyíthatnánk, mely összehasonlítást a találatszámok esetén is megtehetjük, hiszen bioinformatikai módszerekkel sikerült meghatároznunk, hogy az összes találatzámból mennyi lehet a kis RNS-ek mennyisége. Sajnos az RNAzollal izolált minták esetében is ugyan arra az eredményre jutottunk, vagyis a kapott találatszámok egy az egyben nem hasonlíthatóak össze a real-time PCR analízis során kapott relatív expressziós értékekkel.

Mindezek mellett voltak olyan miRNS-ek, melyeket a SOLID szekvenálás, eddig ismeretlen okokból, nem tudott kimutatni, holott kifejeződését, a vártak megfelelően, real-time PCR-rel igazoltuk. Más kutatókkal konzultálva kiderült, hogy ez nem egyedi jelenség. Azóta nagyszabású kutatások indultak az új generációs szekvenálások során kapott találatszámok elemzésére, melyek eredményei szintén alátámasztják az általunk kapott eredményeket (Mestdagh et al., 2014; Dalmay, 2014).

Összességében elmondható, hogy a SOLID szekvenálás kiválóan alkalmas új miRNS szekvenciák azonosítására, de a génexpresszió becslésére nem használható. Segítségünkre lehet továbbá az egyes minták „feltérképezésében”, segítségével kiválaszthatjuk a számunkra érdekes miRNS-eket a további analízisre.

4.5. Az RNS izolálási technikák összehasonlítása

Két RNS izolálási technikát hasonlítottam össze egér ES sejtből származó minta felhasználásával. Egy lemezen tenyésztett sejteket felszuszpendálva és ketté osztva nyertem biológiai párhuzamos mintákat, melyeket ezután két különböző pufferbe felvéve, különbözőképpen izoláltam.

Ezután Agilent 2100 Bioanalyzer segítségével megmértem az RNS-ek pontos koncentrációját, és ezt összevetettem a NanoDroppal mért értékekkel, így következtetve a DNS szennyezés mértékére. Megmértem a minták kisRNS-, és miRNS tartalmát, valamint az RNS-ek intaktságát.

Azt tapasztaltam, hogy az RNAzol reagenssel izolált mintákban, a vártak megfelelően, sokkal nagyobb a kisRNS-ek és a miRNS-ek aránya is. A TRIZolos minták esetében nagyobb mértékű DNS szennyeződést mértem, valamint az RNS-ek intaktsága jobban sérült, az RNAzolos mintákhoz képest.

A párhuzamos, de különbözőképpen izolált minták real-time PCR-rel való vizsgálata során egyértelműen kimutatható volt, hogy az RNAzolos minták C_T értékei alacsonyabbak, így a kisebb koncentrációban jelen lévő miRNS-eket is kimutathatjuk vele, így csökkentve a fals negatív eredmény valószínűségét.

Mindezek alapján a további vizsgálataim során az RNS izoláláshoz RNAzol reagenst alkalmaztam.

4.6. A miRNS-ek expressziójának vizsgálata különböző mintákban

A miRNS-ek expressziójának mérését az általunk tervezett TaqMan Custom Array Plate-ek segítségével, kvantitatív real-time PCR-rel végeztem. Először hat mintában (plusz a 6 napos embrió, mint kontroll) vizsgáltam az említett 20 (plusz 3 belső kontroll) miRNS expresszióját. Ezek a minták az egér és nyúl fibroblaszt sejtek, nyúl embrionális őssejt vonal és indukált pluripotens sejt vonal, nyúl PGC, és 14 napos nyúl embrió voltak.

4.6.1. A miR-290 klaszter expressziója

A miR-290 klaszter, az egérhez és az emberhez hasonlóan nyúlban is őssejt specifikusan expresszálódik. Bár alacsony szinten fejeződik ki, mégis egyértelműen látszik,

hogy az őssejtekben jelenik meg, míg a fibroblasztokban és az embrióban egyáltalán nem. Egyedüli kivétel ez alól a miR-498, amely az összes mintában magasan fejeződik ki. Ez a miRNS, bár a miR-290 klaszterbe tartozik, nem őssejt specifikus (6.ábra).

	miR-294	miR-292	miR-290	miR-520e	miR-498
MEF	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.4338
rabEF	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1599
rab ES	0.0003	0.0003	0.0001	0.0002	0.1153
rab iPS	0.0251	0.0216	0.0213	0.0120	0.1334
14d PGC	0.0003	0.0005	0.0002	0.0001	0.3038
14d emb	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1018

6. ábra A miR-290 klaszter expressziója a hat mintában. A citromsárga cella jelzi, ha nincs expresszió, a narancssárga gyenge expresszióra utal, míg az egyre pirosabb cella erősödő expressziót jelöl. A cellákban a pontos expressziós értékek vannak feltüntetve.

Míg a PG sejtekben és az ES sejtekben hasonló mértékű expressziót tapasztaltunk, szembevetendő, hogy a klaszter tagjai jóval erősebben fejeződnek ki az indukált pluripotens őssejt vonalban.

Ez azt mutatja, hogy a vizsgált nyúl iPS sejt vonal inkább hasonlít a pluripotens egér őssejtekhez, mint a vizsgált nyúl ES sejt vonal. A későbbiekben, munkám folytatásaként, szeretném összehasonlítani más nyúl ES és iPS sejt vonalak miRNS expressziós mintázatát is, hogy információt kapjak arról melyik sejt vonal hasonlít jobban a valódi (naiv) embrionális őssejt vonalakhoz, ezáltal információt nyerhetünk arról, mely sejt vonal lehet alkalmas ivarsejt kiméra nyulak létrehozására.

4.6.2. A miR-302 klaszter expressziója

	miR-302b	miR-302c	miR-302a	miR-302d	miR-367
MEF	0.0003	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
rabEF	0.0008	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000
rab ES	0.1587	0.2372	0.1249	0.1779	0.1325
rab iPS	1.2518	1.0063	0.8117	1.1843	1.0098
14d PGC	0.0005	0.0005	0.0001	0.0004	0.0000
14d emb	0.0008	0.0008	0.0001	0.0009	0.0000

7. ábra A miR-302 klaszter expressziója a hat mintában. A citromsárga cella jelzi, ha nincs expresszió, a narancssárga gyenge expresszióra utal, míg az egyre pirosabb cella erősödő expressziót jelöl. A cellákban a pontos expressziós értékek vannak feltüntetve.

A miR-302 klaszter expressziójáról elmondható, hogy a miR-290-hez hasonlóan, szintén őssejt specifikus, ahogy egérben és emberben is az. Ezen klaszter specificitása azonban sokkal kevésbé kifejezett, egyes tagjai más mintákban is megjelennek, a PG sejtekben mutatott

mintázatuk pedig inkább az embrióéra hasonlít, mintsem az őssejtekére. Bár a miR-367 seed szekvenciája eltér a klaszter többi tagjától, expressziós mintázatban követi azokat (7.ábra).

Ennél a klaszternél is jól megfigyelhető a nyúl iPS sejtvonalba kapott kiugróan magas expresszió.

4.6.3. A miR-17-92 klaszter, és 6 további miRNS expressziója

	miR-17	miR-92
MEF	0.2169	0.1941
rabEF	0.4368	0.4104
rab ES	1.4379	1.0935
rab iPS	0.8760	1.3232
14d PGC	1.3204	0.8016
14d emb	1.9507	0.5759

8. ábra A miR-17-92 klaszter expressziója a hat mintában. A citromsárga cella jelzi, ha nincs expresszió, a narancssárga gyenge expresszióra utal, míg az egyre pirosabb cella erősödő expressziót jelöl. A cellákban a pontos expressziós értékek vannak feltüntetve.

A miR-17 és a miR-92 szintje a fibroblaszt szövetekben viszonylag alacsony, míg a többi mintában jóval jelentősebb, az előbbi két klaszter tagjainál erősebben fejeződik ki (8.ábra). Ezen klaszter esetében szövet specifitás nem figyelhető meg, ebben tehát nem hasonlít a humán és egér homológjához.

	miR-99a	miR-let-7c	miR-125b		miR-let-7b	miR-145	miR-1
MEF	1904.2405	14462.2059	3756.0486	MEF	831.7465	2288.2041	1.6876
rabEF	1568.3154	932.5259	1230.4753	rabEF	148.5701	1944.2527	63.7786
rab ES	328.3294	106.4476	109.0616	rab ES	5.8726	13.5385	13.6327
rab iPS	44.9111	318.2463	201.4112	rab iPS	25.3515	60.0878	8.6879
14d PGC	346.3291	264.2940	71.3084	14d PGC	21.2001	120.7601	32.9225
14d emb	893.9188	418.4757	211.4247	14d emb	33.3358	28.9201	117.7024

9. ábra A miRNS-ek expressziója a hat mintában. A citromsárga cella jelzi, ha nincs expresszió, a narancssárga gyenge expresszióra utal, míg az egyre pirosabb cella erősödő expressziót jelöl. A cellákban a pontos expressziós értékek vannak feltüntetve.

A 14-es kromoszómán elhelyezkedő miR-99a, a miR-let7c, és a miR-125b minden mintában magas szinten fejeződik ki, egyértelmű mintázatot nehéz megállapítani. Egyedül a miR-let-7c esetében látható kiugróan magas expresszió az egér fibroblasztban, és mintha az őssejtekben valamivel alacsonyabb lenne a klaszter kifejeződése, különösen a miR-99a szintje az iPS sejt mintában (9.ábra).

A miR-let-7b és a miR-145 esetében azt kaptuk, hogy az ES sejtekben fejeződik ki a legalacsonyabban, míg a fibroblasztokban igen magas a szintje, különösen a miR-145-é

(9.ábra). Ez összhangban áll a korábbi irodalmi adatokkal, miszerint ezen miRNS-ek szintje a differenciálódás során megnő (Lakshmipathy et al., 2007; Gu et al., 2008).

A miR-1 alacsony expressziót mutatott a fibroblasztokban és a differenciálatlan sejtekben is, szintje csak az embrióban volt valamivel magasabb (9.ábra). Ez azzal magyarázható, hogy lehetséges, hogy az egérhez hasonlóan (Zhao et al., 2005; Xie et al., 2011), nyúlban is főként az izom szövetre jellemző miRNS-ről van szó, amely így az embrió mintában fejeződik ki erősebben.

Összefoglalásként megállapítható tehát, hogy az általam vizsgált, más fajokban összejt specifikusnak leírt miRNS klaszterek tagjai a nyúl mintákban is kifejeződnek, a háromból kettő nyúlban is összejt specifikusnak mondható. Érdekes megfigyelni ezen klaszterek esetén a különböző differenciálatlan sejttypusok közti különbséget. A PG sejtek, a vártak megfelelően, az ES sejtekhez hasonlítanak, míg az iPS sejtek még erőteljesebben fejezik ki a pluripotencia markereket. Ez összefüggésben állhat a miRNS-ek sejtciklusban betöltött funkciójával is a vizsgált iPS sejt vonal sejtjei ugyanis jóval gyorsabban osztódtak a vizsgált nyúl ES sejt vonal sejtjeihez képest.

Eredményeim alapján az is egyértelműen látható, hogy az iPS sejtek sokkal jobban hasonlítanak az ES sejtekre, és alig emlékeztetnek az iPS sejtek létrehozásakor felhasznált nyúl fibroblaszt sejtek expressziós értékeire, amely egyértelműen jelzi a visszaprogramozás sikerességét.

A differenciálódási markerek esetén, a vártak megfelelően azt tapasztaltam, hogy míg az összejtekben alacsony a szintjük, a fibroblasztokban és az embrióban erősen expresszálódnak.

4.7. A miRNS-ek expressziójának vizsgálata a blasztocisza állapotú embrió különböző csíralemezeiben

Szintén TaqMan Array Plate-ek segítségével vizsgáltam a hat napos embrió különböző sejttréttípusaiban (trofoblaszt, epiblaszt, hipoblaszt) a már említett miRNS-ek expresszióját, majd a miR-191 és a miR-302 kifejeződését *in situ* hibridizációval is igazoltam.

	miR-294	miR-292	miR-290	miR-520e	miR-498
6d Epi	0.4374	0.3093	0.3821	0.1003	0.4904
6d Hypo	0.1736	0.1754	0.2331	0.1587	0.6639
6d Tropho	0.6156	0.4308	0.5285	0.7605	7.4643

10. ábra A miR-290 klaszter expressziója a 6 napos embrió különböző csíralemezeiben.

A miR-290 klaszter esetében nem tapasztaltam egyértelmű szövet specificitást, a klaszter egyes tagjai azonban a hipoblasztban valamivel alacsonyabban fejeződnek ki. Itt is

azt láttam, mint a többi mintánál, hogy a miR-498 nem teljesen követi a klaszter többi tagja által „rajzolt” mintázatot, különösen a trofoblasztban kiugróan magas a szintje.

	miR-302b	miR-302c	miR-302a	miR-302d	miR-367
6d Epi	1.2414	0.5184	0.7433	0.6229	0.6316
6d Hypo	0.9993	0.3961	0.5525	0.4810	0.3709
6d Tropho	0.8556	0.4491	0.4204	0.4175	0.4460

11. ábra A miR-302 klaszter expressziója a 6 napos embrió különböző csíralemezeiben.

A miR-302 a miR-290 klaszterhez hasonlóan szintén nem mutat egyértelmű specificitást, de az epiblasztban a klaszter minden tagja valamivel erősebben van jelen. Ez igaz a miR-302b-re is, amely a klaszter többi tagjánál jóval erősebben fejeződik ki mindhárom mintában.

	miR-17	miR-92
6d Epi	0.7830	0.9540
6d Hypo	0.5901	0.8403
6d Tropho	0.9862	0.9075

12. ábra A miR-17-92 klaszter expressziója a 6 napos embrió különböző csíralemezeiben.

A miR-17-92 klaszter a korábbi mintákhoz hasonlóan, a 6 napos embrióban sem mutat szövet specificitást, a miR-17 expressziója a trofoblasztban ugyan valamivel magasabb, de a miR-92 szintje közel azonos a mintákban.

	miR-99a	miR-let-7c	miR-125b		miR-let-7b	miR-145	miR-1
6d Epi	3.1755	2.1243	1.8239	6d Epi	0.1239	0.4803	0.2360
6d Hypo	1.8264	5.2379	0.5621	6d Hypo	0.3709	2.8167	1.8201
6d Tropho	1.3241	0.4075	0.1901	6d Tropho	0.0358	0.1229	3.2266

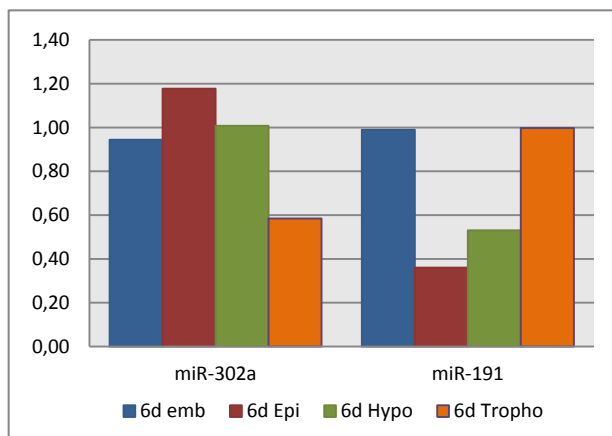
13. ábra A miRNS-ek expressziója a 6 napos embrió különböző csíralemezeiben.

A differenciálódási markereket vizsgálva egyértelmű, hogy míg a miR-1 a trofoblasztban, a miR-99a az epiblasztban a miR-145 és a miR-let-7c pedig a hipoblasztban mutat specifikusan erős expressziót.

További munkám során ezen sajátosságokat figyelembe véve funkcionális analízis során szeretném megnézni, hogy az egyes sejttípusokra jellemző miRNS-ek túlexpresszáltatása, illetve gátlása hogyan hat az *in vitro* tenyésztett embrió fejlődésére. Eltolható-e például az epiblasztta, illetve hipoblasztta differenciálódó sejtek aránya, változik-e a pluripotens sejtek mennyisége, és létrehozhatóak-e ezáltal naiv embrionális őssejtek, melyek tenyésztetbe vihetők és ott stabilan fenntarthatóak? Mely sejtek adnak inkább kimérát, és mely sejtek lehetnek alkalmasak ivarsejt kiméra állatok létrehozására, „pluripotensebbek-e” a mesterségesen létrehozott IPS sejtek a nyúl embrióból izolálható ES sejteknél?

4.8. Két miRNS expressziójának igazolása *in situ* hibridizációval

A real-time PCR analízis alapján tudjuk, hogy míg a 6 napos teljes embrióban a miR-191 és a miR-302 expressziója nagyon hasonló, az epiblasztot, hipoblasztot és trofoblasztot külön vizsgálva ezek szintje jelentős különbséget mutat. Általánosságban elmondható, hogy a miR-302a szintje az epiblasztban és a hipoblasztban magasabb, mint a trofoblasztban, a miR-191 ezzel szemben a trofoblasztban fejeződik ki a legerősebben, míg a hipoblasztban és az epiblasztban kevésbé (14. ábra).



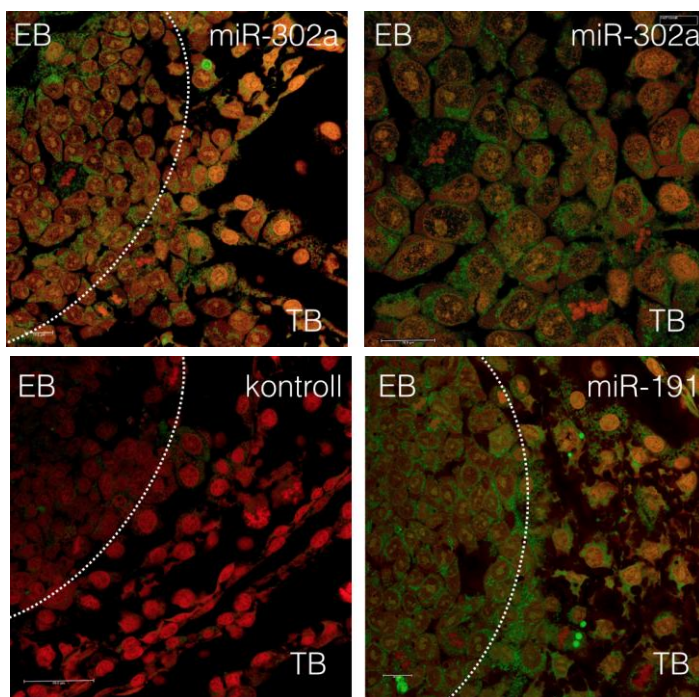
14. ábra A miR-302a és a miR-191 expressziója a blasztociszta állapotú embrió különböző sejttypusaiban (epiblaszt, hipoblaszt, trofoblaszt), illetve a teljes embrióban (6d emb).

Az *in situ* hibridizáció során sikerült igazolnom a miR-191 és a miR-302 jelenlétét a 6 napos embrióban.

Azt tapasztaltam, hogy a miR-302a az embrioblasztban (epiblaszt és hipoblaszt) fejeződik ki erősebben (15. ábra, felül), mely összhangban áll a real-time PCR-rel mért eredményeimmel.

A miR-191 trofoblasztban lévő magasabb expressziója nem olyan egyértelmű, ennek biztos igazolásához további vizsgálatok szükségesek, jelenléte azonban egyértelműen kimutatható volt a hat napos embrióban.

A továbbiakban szeretném több miRNS expresszióját igazolni *in situ* hibridizációval több mintában, illetve bioinformatika módszerekkel szeretném meghatározni az újonnan azonosított miRNS-ek lehetséges targetjeit, majd ezek egy részét kísérletesen is validálni.



15. ábra A miR-191 és a miR-302a expressziójának vizsgálata *in situ* hibridizációval 6 napos embrióban.

5. ABSZTRAKT

A miRNS-ek olyan, ~22 nt hosszú, egyszálú RNS-ek, melyek alapvető szabályozó funkciók érzékeny beállításában vesznek részt. Szerepüket a génexpresszió poszttranszkripcionális módosítása révén fejtik ki úgy, hogy az mRNS 3' UTR-jéhez kötődve a translációt gátolják, vagy az mRNS degradációját okozzák. Fontos szerepük van a pluripotencia fenntartásában, és a differenciálódás megindításában.

Célunk olyan nyúl embrionális őssejt vonal alapítása, amelyből célzott genetikai módosítást hordozó ivarsejt kiméra nyulak hozhatóak létre. Ehhez szeretnénk feltérképezni, hogy milyen miRNS-ek fordulnak elő a különböző korú nyúl embriókban és őssejtekben, és hogy ezeknek milyen szerepe lehet az embriófejlődésben, majd ennek megfelelően milyen módosításokra lenne szükség az őssejtek pluripotens állapotának fenntartásához.

Mivel nyúl esetében vizsgálataink megkezdésekor még nem közöltek miRNS szekvenciákat, első lépésként SOLID technológiával megszekvenáltattunk különböző nyúl mintákat. Az így kapott szekvenciák között kerestem már ismert egér, humán és szarvasmarha miRNS-ek homológjait.

1693 új szekvenciát sikerült így azonosítani, melyek közül három, más fajokban őssejt specifikusnak leírt klaszter tagjait, és néhány differenciálódási markert választottam ki a további analízisre. Összehasonlítottam különböző RNS izolálási technikákat az RNS tisztasága és intaktsága alapján, és teszteltem azt a hipotézist, miszerint a SOLID szekvenálás génexpresszió becslésre is alkalmas.

Meghatároztam a vizsgált miRNS-ek elhelyezkedését a genomban, és meghatároztam a nyúlban azonosítható klasztereket. Ezt követően real-time PCR analízist alkalmazva vizsgáltam a miRNS-ek expresszióját először hat mintában, majd a 6 napos embrióban, és annak különböző csíralemezeiben is. Megállapítottam, hogy az ocu-miR-290 és az ocu-miR-302 klaszter őssejt-specifikus, az ocu-miR-17-92 klaszter esetében viszont nem találtam szövet specificitást. A PG sejtek, a vártak megfelelően, az ES sejtekhez hasonlítanak, míg az iPS sejtekben a pluripotencia markerek esetében magasabb expressziót találtam.

Kimutattam, hogy az iPS sejtek inkább az ES sejtekre hasonlítanak, mintsem a létrehozásukkor használt fibroblasztra, mely egyértelműen jelzi a visszaprogramozás sikerességét.

Végül a miR-191 és a miR-302 miRNS-ek kifejeződését *in situ* hibridizációval is igazoltam a 6 napos embrióban. Megállapítottam, hogy a miR-302a a real-time PCR-rel mért adatokkal összhangban, az embrioblasztban erősebben fejeződik ki, mint a trofoblasztban.

6. SUMMARY

MiRNAs are ~22nt long, non-coding RNAs, which have important regulatory role in several fundamental biological processes by posttranscriptional targeting the 3' UTR of mRNAs causing translational repression or the degradation of the mRNA. They are very important in maintenance of the pluripotency and promoting cell differentiation.

Our aim is to establish a real embryonic stem cell line from rabbit, to obtain germline chimaeras. With this goal we started to investigate which miRNAs can be found in different developmental stages of rabbit embryos, and in stem-like cells. It would be important to understand their role in embryo development and to know which kind of modifications would be necessary to maintain the pluripotency of the stem-like cells.

Because of no published rabbit miRNA sequences was available at the beginning of our study, samples derived from different stages of rabbit embryos and stem cells were sequenced by using SOLID platform. The results were checked for new rabbit miRNA sequences according to known human, mouse and bovine miRNAs.

1693 new rabbit sequences were identified. From these sequences three clusters were chosen to further analysis, known to be stem-cell specific in mouse and human, and some extra miRNA known to have important role in early differentiation. I compared two different methods to RNA isolation based on RNA purity and integrity. I tested the hypothesis whether the read numbers of the SOLID sequencing are suitable for predicting the gene expression level.

I identified where these miRNAs are localised in the rabbit genome, and clarified the structures of these clusters. Then I measured the expression of these miRNAs first in 6 samples by real-time PCR, and then in 6 day embryo, epiblast, hypoblast and trophoblast cells too. I found that ocu-miR-290 and ocu-miR-302 clusters are stem cell specific, but no specificity were found regarding the ocu-miR-17-92 cluster. Not surprisingly, PGCs are really similar to ESCs, while iPSCs express the pluripotency markers at a very high level.

I proved that iPSCs are more similar to ESCs than to rabbit fibroblast, which is the origin of these induced pluripotent cells. This clearly shows the success of the reprogramming.

At last, I examined the expression of the miR-191 and miR-302 miRNAs in 6-day embryo by *in situ* hybridization. I found that the miR-302 show higher expression in embryoblast than in trophoblast, which is consistent with our real-time PCR data.