

FEJLŐDÉSSPECIFIKUS mikroRNS-EK FELTÉRKÉPEZÉSE NYÚLEMBRIÓKBAN

Mapping of Development-Specific MicroRNAs in Rabbit Embryos

DÉVAI GRÉTA

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Genetika és Biotechnológia Intézet



Konzulensek:

DR. GÓCZA ELEN

tudományos tanácsadó, tanszékvezető
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Genetika és Biotechnológia Intézet
Állatbiotechnológia Tanszék

TOKODYNÉ SZABADI NIKOLETT

tudományos segédmunkatárs
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Genetika és Biotechnológia Intézet
Állatbiotechnológia Tanszék

**Tudományos Diákköri Konferencia
pályamunka**

**Gödöllő
2023**

TARTALOMJEGYZÉK

I. BEVEZETÉS	3
II. CÉLKITŰZÉS	4
III. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
- III/1. A nyúl mint modellállat	5
• III/1.1. A nyúl preimplantációs embrionális fejlődése	5
• III/1.2. A nyúl modellállatként való alkalmazhatóságát elősegítő biológiai jellemzői	7
- III/2. A mikroRNS-ek általános bemutatása	8
• III/2.1. A mikroRNS-ek biogenezeise és a géncsendesítés mechanizmusa	8
• III/2.2. A mikroRNS-ek stabilitását lehetővé tévő extracelluláris vezikulák	10
• III/2.3. A pluripotencia fenntartásában szerepet játszó őssejtspecifikus mikroRNS-ek, valamint a nyúl epiblaszt- és hipoblaszt-specifikus markereinek bemutatása	11
IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	13
- IV/1. A használt mikroRNS- és őssejtspecifikus marker-primerek megválasztása	13
- IV/2. Az állatok tartásának körülményei és a munka etikai háttere	13
- IV/3. A donornőstények termékenyítése és az embriómosás	14
- IV/4. Mintavétel	16
- IV/5. Előzetes tesztek	17
- IV/6. RNS-izolálás	17
• IV/6.1. RNS-izolálás a PicoPure™ RNA Isolation Kit használatával	18
• IV/6.2. RNS-izolálás az RNAqueous™-Micro Total RNA Isolation Kit használatával	18
- IV/7. cDNS-írás	19
- IV/8. RT-qPCR	20
- IV/9. Adatok kiértékelése – MultiD GenEx	21
- IV/10. SOLiD-szekvenálás	22
V. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	23
- V/1. Embriómosás	23
- V/2. Előzetes tesztek	23
- V/3. Relatív mikroRNS-expresszió összehasonlítása egyedileg tenyésztett embriómintákban	26
- V/4. Relatív mikroRNS-expresszió összehasonlítása egyedileg tenyésztett embriók tenyésztőmédiüm-mintáiban	31
- V/5. Relatív expresszió összehasonlítása csoportosan tenyésztett embriómintákban	35
VI. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	37
VII. ÖSSZEFOGLALÁS	39
Irodalomjegyzék	41
Rövidítésjegyzék	45
Táblázatok és ábrák jegyzéke	46
- A dolgozatban szereplő ábrák	46
- A dolgozatban szereplő táblázatok	46
Köszönetnyilvánítás	47
Mellékletek	48

I. BEVEZETÉS

Az utóbbi évtizedekben a humán asszisztált reprodukciós technológiák (ART) fejlődésével egyre nagyobb szükségét láttuk olyan módszerek kidolgozásának, mely segítségével az *in vitro* fertilizációval (IVF) létrehozott és továbbtenyésztett embriók minősége és életképessége még a transzfert megelőzően, hatékonyan és noninvazív úton megítélhető. Erre nagyszerű lehetőséget ad az embriótenyésztő-médium mikroRNS (miRNS)-tartalmának vizsgálata.

A miRNS-ek olyan rövid, átlagosan 22-25 nukleotid hosszúságú, nemkódoló RNS-molekulák, melyek poszt-transzkripcionális génexpresszió-szabályozás és géncsendesítés útján számos kulcsfontosságú biológiai folyamat irányítására, finomhangolására képesek. A humán embriók preimplantációs fejlődéséhez elengedhetetlen géneket szabályozó, fejlődésspecifikus miRNS-ek tenyésztőmédiumban történő detektálása és expressziós szintjének megállapítása olyan mértékű betekintést nyújthat az *in vitro* fejlődő embriók aktuális állapotába, mely a humán *in vitro* fertilizáció és embriótranszfer (IVF-ET) eljárás részeként a jövőben soha nem látott hatékonysággal segítheti a legéletképesebb embriók transzferre történő kiválasztását, s ezen keresztül nagyban megnövelheti a sikeres beágyazódás és az egészséges terhesség létrejöttének és megtartásának esélyét.

A nyúl egyike azon fontos kísérleti állatfajoknak, melyeken – az emberéhez hasonló anatómiai, fejlődésbiológiai és genetikai jellemzőinek köszönhetően – számos humán rendszerre is vonatkoztatható szaporodás- és fejlődésbiológiai jelenség tanulmányozható. Ez alapján a fejlődő embriók által a tenyésztőmédiumba kibocsátott miRNS-ek által mutatott expressziós mintázat megbízható mérési és értékelési módszerének kidolgozása, valamint az embrió életképességének és minőségének megállapítására alkalmas, új fejlődésspecifikus miRNS-ek kutatása is folyhat nyúlembriókon végzett kísérletek során. Emellett az állatmodell lehetővé teszi azt is, hogy adott miRNS-ek kifejeződését ne csak a tenyésztőközegben, de magában az embrióban is vizsgálhassuk.

Az embrióminőség biomarkereként alkalmazható fejlődésspecifikus miRNS-csoportok gondos összeállítása, valamint a gyors, megbízható, embrióra nézve biztonságos és ideálisan költséghatékony miRNS-detektálási eljárások kifejlesztése felbecsülhetetlen értékűnek bizonyulhat a humán asszisztált reprodukciós technológiák forradalmasításában.

II. CÉLKITŰZÉS

Munkánk célja egyrészt egy olyan finomabb RNS-detektálási protokoll kidolgozása, mely alkalmas lehet a nyúlembriók tenyésztőmédiumában (illetve magukban az embriókban) igen kis mennyiségben jelen lévő miRNS-ek kimutatására, másrészt pedig hét humán fejlődésspecifikus miRNS esetén annak megállapítása, hogy azok alkalmasak lehetnek-e *in vitro* tenyésztett preimplantációs nyúlembriók életképességének noninvazív megítélésére.

Az új RNS-izolálási és -detektálási eljárás, illetve a fejlődésspecifikus miRNS-ek biomarkerekként való használhatóságának nyúlembriók esetén történő megerősítése reményeink szerint végső soron a humán asszisztált reprodukciós eljárások tervezésében és kivitelezésében is jelentős segítséget nyújthatnak.

III. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

III/1. A NYÚL MINT MODELLÁLLAT

*Már a 19. század végén, az első embriológiai és szaporodásbiológiai kutatások idején is klasszikus modellállatnak számított a laboratóriumi körülmények között tenyésztett és gondozott nyúl, az *Oryctolagus cuniculus* (Fischer és mtsai., 2012). A faj képviselői számos olyan anatómiai- és fejlődésbiológiai sajátossággal bír, mely kifejezetten alkalmassá teszi a sokszor emberi szervezetre is vonatkoztatható szaporodás- és fejlődésbiológiai jelenségek tanulmányozására. Ebben a fejezetben ezek közül emelek ki néhány, a preimplantációs nyúlembrió miRNS-profiljának tanulmányozása szempontjából jelentős tulajdonságot, az összefüggések átlátásának megkönnyítése érdekében azonban először röviden ismertetem és jellemzem a nyúlembrió korai (beágyazódást megelőző) fejlődési stádiumait.*

III/1.1. A NYÚL PREIMPLANTÁCIÓS EMBRIONÁLIS FEJLŐDÉSE

A nőtény nyúl úgynevezett kettős méhvel rendelkezik, azaz egyetlen hüvelyből két méhnyakon keresztül két különálló méhszarv nyílik, ezek kapcsolódnak a jobb- és baloldali petevezetőn keresztül az azonos oldali petefészekhez. Az ovulációt a párzás indukálja (ld. III/1.2. fejezet) (Fischer és mtsai., 2012). A párzást (vagy mesterséges inszeminációt) követően a petesejt megtermékenyülése nagyjából a 10-12. órában következik be, ennek szembetűnő jele a 14. óra környékén már láthatóvá váló második sarki test. A következő osztódások 7-8 óránként következnek be, az összsejtszám (közel-) exponenciális növekedését eredményezve (Fischer és mtsai., 2012; Harper, 1961).

A petevezetőben, a méh felé történő vándorlás során az embrió külső felszínére, a zona pellucida köré, vastag mucin (mucoprotein) réteg rakódik, mely jelentős szerepet játszik a sikeres beágyazódásban és az embrió túlélésében. Éppen emiatt, amennyiben a transzferálandó embrió kora erre még lehetőséget ad, a recipiensbe ültetéskor érdemes az embriót a méh helyett a petevezetőbe helyezni, ahol a külső mucin-burok még ki tud alakulni a méhszarvba érkezést és a beágyazódást megelőzően (Murakami és Imai, 1996).

2,5-3 nap elteltével, az ekkor nagyjából 32 sejtből álló, szedercsíra (morula) állapotú embrió átesik az úgynevezett kompakció folyamatán (Fischer és mtsai., 2012), melynek során a sejtek

felszínén különböző adhéziós molekulák jelennek meg. Ezek segítségével a sejtek igen szorosan egymáshoz tapadnak, – ebben a kompakt formában az egyéni sejthatárok már szinte észlelhetetlenek, – és sejtmembránjaikon ioncsatornák alakulnak ki, különböző típusú sejt-sejt kapcsolatokat kialakítva. A kompaktió, s az így kialakult szoros sejtkapcsolatok eredményeképpen tehát megindul a kommunikáció az embrió sejtei között, mely a differenciálódási folyamatok megkezdését teszi lehetővé (*Fischer és mtsai., 2012*).

Csupán néhány órával ezután végbemegy a sejtek embrioblasztot (ICM) és trophoblasztot alkotó sejttypusokká történő differenciálódása. Az embrioblaszt két rétegből, az epiblasztból (primitív ektoderma) és a hipoblasztból (primitív endoderma) tevődik össze, s nyulak esetében egy lapos, csupán két sejtrétegből álló korongként, úgynevezett embriódiszkként van jelen közvetlen a trophoblaszt rétege alatt. Az embrió belsejében emellett fokozatosan kialakul egy nagy kiterjedésű, folyadékkal telt üreg, a blasztocöl is (*Idkowiak és mtsai., 2004*). Ezen differenciálódási lépések eredménye tehát a blasztociszta állapotú embrió kialakulása, mely nyulak esetében a 4. napon már az 1 mm-es nagyságot is elérheti. 4-napos korban megtörténik a zona pellucida enzimatisz emésztése is, ezt az 5. naphoz közelítve az úgynevezett neozona burok váltja fel, emellett pedig a mucin réteg is egyre vékonyodik, folytonossága megszakad (*Denker és Gerdes, 1979; Fischer és mtsai., 1991*). Nem sokkal a beágyazódás előtt az embriókorongot fedő poláris trophoblaszt (Raubert trophoblaszt) leválk, így az epiblaszt sejtei szabaddá válnak az embrió felszínén (*Tscheudschilsuren és mtsai., 1999; Williams és Biggers, 1990*).

A 6. naphoz érve, még a beágyazódást megelőzően megkezdődik a három fő testtengely – az anteroposterior-, a craniocaudalis- és a jobb-bal tengelyek – kialakulása, valamint a három csíralemez, az ektoderma, a mezoderma és az endoderma elkülönülése. Ezt a folyamatot gasztrulációnak nevezzük (*Fischer és mtsai., 2012*) (a trophoblaszt sejtekből a későbbi embrionális fejlődés során a méhlepény embrionális része; a hipoblaszt sejtekből a szikzacskó külső fala; az epiblaszt sejtekből pedig a szikzacskó magzat felőli része, az amnion, és a fejlődő magzat embrionális szövetei alakulnak ki). A 6,5-7. napon bekövetkező beágyazódáskor a nyúlembrió összsejtszáma már a 100.000-et is meghaladhatja (*Fischer és mtsai., 1986*).

III/1.2. A NYÚL MODELLÁLLATKÉNT VALÓ ALKALMAZHATÓSÁGÁT ELŐSEGÍTŐ BIOLÓGIAI JELLEGZETESSÉGEI

A nyulak (Lagomorpha) és főemlősök (Primates), illetve a rágcsálók (Rodentia) és főemlősök között húzódó filogenetikai távolság igen hasonló, azonban a rágcsálók meglehetősen gyors evolúciója miatt – a gének szekvenciáit tekintve – a nyúl (pl. az *Oryctolagus cuniculus*) nagyobb hasonlóságot mutat az emberrel, mint a rágcsáló fajok képviselői, például a kísérletekben szintén széles körben alkalmazott házi egér (*Mus musculus*), vagy laborpatkány (*Rattus norvegicus domestica*) (Graur és mtsai., 1996). Olyan genetikai megfigyelések esetén, mint a preimplantációs embrió miRNS-profiljának tanulmányozása tehát jelentősen megnövelheti a vizsgálatok sikerességét és a kapott eredmények relevanciáját humán rendszerre nézve, ha a modellállat génszekvenciája minél közelebb áll az emberéhez.

Emellett fontos tulajdonsága a nyúlnak, hogy egyike annak a kevés emlős fajnak (pl. a macska és a vadászgörény mellett), mely esetében az ovuláció folyamatát a párzás (pontosabban az ondóplazma hüvelybe jutása) indukálja. Ezt nevezzük reflex-ovulációnak, s az ovulációra az indukáló hatást követően a 10-12. órában kerül sor. Ennek köszönhetően a vemhesség stádiumai és az embrió kora pontosan meghatározható a párzástól, vagy a mesterségesen végzett inszeminációtól számítva (dpc = days post coitum). Ezek hiányában pedig – megfelelő hormonális kezeléssel (pl. LH-, vagy hCG-injekcióval) – álvemhesség alakítható ki. Emellett, a magas termékenységi ráta (7-8 utód/nőstény/párzás), illetve ennek hormonális szuperovuláltatással történő továbbnövelése, lehetővé teszi a donor nőstények számának hatékony csökkentését is (Fischer és mtsai., 2012; Yang és mtsai., 2019).

Az expandált blasztociszta állapotú nyúlembrió a legnagyobb gömbalakú blasztocisztaként tartják számon az emlősök körében, mely tulajdonság szintén kifejezetten alkalmazhatóvá teszi különböző morfológiai és molekuláris elemzések alanyaként, nemcsak mint teljes embrió, de akár az embrioblaszt és trophoblaszt rétegek külön egységekként történő vizsgálata során is, emellett pedig meglehetősen nagy méretének köszönhetően kivitelezhetőbbé válnak az esetleges mikromanipulációs beavatkozások is (Fischer és mtsai., 2012; Navarrete Santos és mtsai., 2008).

III/2. A mikroRNS-EK ÁLTALÁNOS BEMUTATÁSA

A mikroRNS-ek (miRNS-ek) olyan endogén, átlagosan 22-25 nukleotid hosszúságú, nemkódoló RNS-molekulák, melyek a poszt-transzkripcionális génexpresszió-szabályozás és géncsendesítés útján számos kulcsfontosságú biológiai folyamat – úgymint proliferáció, sejtciklus-szabályozás, differenciáció, apoptózis stb. – befolyásolására képesek (Maraghechi és mtsai., 2023). A következőkben röviden bemutatom a miRNS-ek biogenezisének két fő típusát és az RNS-interferencia mechanizmusát, valamint a miRNS-ek testfolyadékokban és szövetekben való stabil jelenlétét lehetővé tevő kisméretű extracelluláris vezikulákat. A fejezet végén szót ejtek az összejspecifikus miRNS-ek, illetve az epiblaszt- és hipoblaszt-specifikus markerek embrionális fejlődésben betöltött szerepéről is.

III/2.1. A mikroRNS-EK BIOGENEZISE ÉS A GÉNCSENDESÍTÉS MECHANIZMUSA

A miRNS-gének számos esetben más kódoló gének intronjain, vagy egyéb nem transzlálódó régióin (UTR) lokalizáltak, s így a gazdagén saját expressziós regulátorai szabályozzák átíródásukat (Maraghechi és mtsai., 2023). Ezzel ellentétben az intergénikus régiókon kódolt miRNS-ek saját promóterrel rendelkeznek (Kim és Kim, 2007). Számos miRNS egy klaszter tagja, vagyis több különböző miRNS-sel azonos kromoszómán, viszonylag szoros közelségben (kb. 10 kbp-nál kisebb távolságban) található meg (Guo és mtsai., 2014). Egymáshoz közeli elhelyezkedésük gyakran lehetővé teszi, hogy a klaszter tagjai egyetlen policisztronos transzkripttá íródjanak (Baskerville és Bartel, 2005). Nem ritka, hogy az egy klaszterbe tartozó miRNS-ek magrégiója is megegyezik, vagy csak kis mértékben tér el, ebből adódóan pedig azonos cél-mRNS-sel rendelkeznek, s így egyazon biológiai funkcióra lehetnek szabályozó hatással (Seitz és mtsai., 2004). Ahhoz, hogy a miRNS-génekből funkcióképes miRNS molekulák készüljenek, a transzkripciót követően egy többlépcsős érési folyamaton is át kell esniük. Az érési folyamat menetében azonban jelentős eltéréseket tapasztalhatunk, így adott miRNS biogenezeise történhet klasszikus-, vagy alternatív útvonalat követve (Hammond, 2015).

A klasszikus miRNS-biogenezis útvonal során a génről az RNS-polimeráz II (Pol II) enzim ír egy hosszabb primer transzkriptumot, ezt nevezzük RNS-primernek (pri-miRNS) (Hammond, 2015), ami először a fehérjekódoló génekről íródó mRNS-ekhez hasonló érési lépéseken – esetleges intronok kivágása (splicing), m⁷G sapka 5' végre helyezése (capping) és poliA-farok 3' végre építése (poliadeniláció), – megy keresztül, s felvesz egy speciális,

úgynevezett hajtű (hairpin) szerkezetet. Ezt a szerkezetet egy Drosha-ból (ribonukleáz III enzim) és DGCR8-ből (RNS-kötő fehérje) felépülő mikroprocesszor komplex ismeri fel. A Drosha hasítja a primer molekulát, így egy rövidebb hairpin szerkezetű miRNS-prekurzor, más néven pre-miRNS jön létre (*Catalanotto és mtsai., 2016*). A prekuzort az Exportin-5 (EXP-5) szállítómolekula a sejtmagból a citoplazmába szállítja, ahol egy újabb átalakuláson megy keresztül (*O'Brien és mtsai., 2018*): a Dicer nevű endonukleáz enzim lehasítja a hairpin szerkezet végén található hurkot, így egy kettősszálú RNS-duplex keletkezik. A két szál közül az AGO2 fehérje az 5' végen szereplő nukleotid és a duplex végeinek termodinamikai stabilitása alapján az egyik szálat megköti, ez lesz a guide-miRNS, a másik szál pedig (star-/passenger-miRNS) lebontásra kerül (*Catalanotto és mtsai., 2016; O'Toole és mtsai., 2006*).

A Dicer, az AGO2 és a guide-miRNS összeépüléséből jön létre az úgynevezett RNS-indukált géncsendesítő komplex, röviden RISC, vagy miRISC. A komplex felkeresi a beépült miRNS szekvenciájával komplementer (vagy részben komplementer) szekvenciát a megcélzott mRNS 3' nem transzlálódó régióján (3'UTR). Különösen a miRNS kb. 6 nukleotidból álló, erősen konzervált, úgynevezett „mag” (seed) régiója játszik nagyon fontos szerepet a célmolekula felismerésében és megkötésében (*Bartel, 2009; Catalanotto és mtsai., 2016*). A cél-mRNS sorsát a guide-miRNS és a megcélzott mRNS régió nukleotid-szekvenciája közti komplementaritás mértéke határozza meg. Teljes illeszthetőség esetében a kapcsolódás indukálja az AGO2 endonukleáz aktivitását, s a hasítást követően az mRNS degradálódik. Kisebb mértékű komplementaritás esetén, az mRNS nem kerül lebontásra, de transzlációját a RISC megakadályozza (*Jo és mtsai., 2015*). Az RNS-interferencia hatására tehát az adott miRNS céljául szolgáló mRNS molekula az említett két lehetséges csendesítési út egyikén keresztül működésképtelenné válik, s az általa kódolt géntermék nem készül el.

Ezen kívül számon tartunk egyéb, alternatív biogenezis-útvonalakat is. Az egyik jelentős alternatív miRNS-biogenezis útvonal során (pl. az intronokról származó miRNS-ek, az úgynevezett mirtronok előállításakor) a Drosha-ból és a DGCR8-ből felépülő mikroprocesszor komplex által kivitelezett feldolgozási lépés kimarad (ezt nevezzük Drosha/DGCR8-független biogenezis útvonálnak), s az intronokból még a sejtmagban egy spliceoszóma és egy „debranching” enzim aktivitása útján alakulnak ki a transzlokációra és Dicer-féle feldolgozásra kész mirtron molekulák (*Berezikov és mtsai., 2007*). A miRNS-ek egy másik csoportja esetén a Drosha-hasítás olyan miRNS-prekuzort eredményez, mely alkalmatlan a Dicer által végzendő feldolgozásra. Emiatt ezeket a pre-miRNS molekulákat az AGO2 köti meg, s bekövetkezik az AGO2-függő hasítás (*Yang és Lai, 2010*).

III/2.2. A mikroRNS-EK STABILITÁSÁT LEHETŐVÉ TÉVŐ EXTRACELLULÁRIS VEZIKULÁK

Sokáig úgy gondolták, hogy a szervezet valamennyi szövete által szekretált extracelluláris vezikulák (EV-k) egyetlen szerepe a sejtekben felgyülemelő, feleslegessé vált anyagok, esetleg mérgeanyagok eltávolítása azok extracelluláris térbe történő ürítése útján. Mára azonban tudjuk, hogy ezek az apró szállítóegységek elengedhetetlen részei a sejtek közötti kommunikációnak, mely alapvető feltétele a többsejtű létnek (*Kamijo és mtsai., 2022*).

Az exoszómák olyan kisméretű (30-150 nm átmérőjű) extracelluláris vezikulák (röviden sEV-k), melyek az úgynevezett multivezikuláris testek (MVB-k, másnéven kései endoszómák) plazmamembránnal történő fúziójakor alakulnak ki és jutnak az extracelluláris térbe (*Théry és mtsai., 2009*), majd receptor-ligandum interakció, membránfúzió, vagy endocitózis útján lépnek kapcsolatba a célsejttel (*Urbanelli és mtsai., 2013*). Ezek a kisméretű EV-k számos molekulatípus – úgymint lipidek, fehérjék és nukleinsavak – intercelluláris szállítását végezhetik, melyek közül a miRNS-ek sem kivételek (*Esfandiyari és mtsai., 2021; Yáñez-Mó és mtsai., 2015*). A miRNS-ek csaknem minden szövetünkben és testfolyadékunkban jelen vannak (pl. vérplazma, nyál, könny, agy-gerincvelői folyadék, vizelet, anyatej, magzatvíz, ondófolyadék, stb. - *Weber és mtsai., 2010*), s az ezekben természetesen megtalálható RNS-bontó enzimekkel szembeni ellenállóképességüket és stabilitásukat részben ezek a kisméretű extracelluláris vezikulák biztosítják (ezen kívül lipoproteinekhez, vagy fehérjékhez kötötten is jelen lehetnek a miRNS-ek az extracelluláris közegben) (*Rayner és Hennessy, 2013*).

Az anya és embrió (később anya és magzat) közötti párbeszéd biztosítása elengedhetetlen a sikeres beágyazódás és a terhesség fenntartása szempontjából. Egyre több tanulmány születik azzal kapcsolatban, hogy egyes miRNS-ek éppen ezt a molekuláris kommunikációt teszik lehetővé a fejlődő embrió és az anyai endometrium között, s a közegre érzékeny molekulák két fél közötti biztonságos és fenntartható átjárása jelentős részben az exoszómák által válik lehetségessé (*Saadeldin és mtsai., 2015*). A miRNS-eket szállító kisméretű extracelluláris vezikulák jelenlétét emellett az *in vitro* tenyésztett korai embriók tenyésztőmédiumában is kimutatták (*Mellisho és mtsai., 2017; Melo-Baez és mtsai., 2020; Rosenbluth és mtsai., 2014*), melyek izolálása és miRNS-tartalmának vizsgálata fontos információkkal szolgálhat az embrió minőségére, valamint élet- és beágyazódási képességére nézve.

III/2.3. A PLURIPOTENCIA FENNTARTÁSÁBAN SZEREPET JÁTSZÓ ÖSSEJTSPECIFIKUS mikroRNS-EK, VALAMINT A NYÚL EPIBLASZT- ÉS HIPOBLASZT-SPECIFIKUS MARKEREINEK BEMUTATÁSA

A korai embrionális fejlődés során a trophoblaszt és a belső sejtöteg sejtjeinek számára kulcsfontosságú a differenciációt gátló és az önmegújító képesség fenntartását elősegítő miRNS-ek megfelelő szintű expressziója (*Pendzialek és mtsai., 2019*). Ilyen például egerek esetében az mmu-miR-290 klaszter (*Houbaviy és mtsai., 2003; Zovoilis és mtsai., 2009*), vagy az ezzel homológ humán hsa-miR-371 klaszter (*Suh és mtsai., 2004*), mely magas expressziót mutat a még pluripotenciával rendelkező embrionális őssejtekben (ESC), s melynek promóter régióját olyan kulcsfontosságú ESC transzkripció faktorok célozzák, mint az emberben, főemlősökben, egérben és más emlősökben, valamint madarakban is erősen konzervált OCT4- (génje: *POU5F1*), illetve NANOG epiblaszt-specifikus, vagy a SOX2 őssejtspecifikus transzkripció faktorok (*Card és mtsai., 2008; Marson és mtsai., 2008*). Hasonló módon, a sejtciklus szabályozásában részt vevő miR-302 klaszter is jelentős mértékben expresszál humán és egér embrionális őssejtekben is, szintje a differenciáció kezdetekor lecsökken a fejlődő embrió sejtjeiben, s szintén a fent említett faktorok szabályozása alatt áll (*Barroso-delJesus és mtsai., 2008; Card és mtsai., 2008; Chen és mtsai., 2007*).

Maraghechi és mtsai. (2013) nyúl esetében is megvizsgálták ezeknek a pluripotencia fenntartásában szerepet játszó miRNS-eknek a jelenlétét a korai fejlődési stádiumú embriókban. Az ocu-miR-302 klaszter tagjai (miR-302a-5p, miR-302a-3p, miR-302b-5p, miR-302b-3p, miR-302c-5p, miR-302c-3p, miR-302d-5p, miR-302d-3p, miR-367-5p, miR-367-3p) a párzástól számított 3,5. fejlődési naptól kezdtek expresszálódni, fokozatosan növekvő szintet mutatva a blasztocishta fejlődési stádiumban, valamint a klaszter vélt promóter régióján az említett transzkripció faktorok kötőhelyei is kimutathatók voltak. Nyúlembrió esetén ez az időpont éppen egybeesik a trophectoderma és a belső sejtöteg kialakulásával, s a klaszter által ekkor mutatott megugró aktivitás alátámasztja azt a feltételezést, miszerint a miR-302 klaszter a nyúl esetében is ESC-specifikus, hasonlóan a humán (és egér) rendszerhez. Emellett azt is kimutatták, hogy a klaszter valamennyi -3p érett miRNS tagja azonos seed régióval rendelkezik, így a klaszterbe tartozó miRNS-ek feltehetőleg ugyanazokat az mRNS-eket szabályozzák (*Maraghechi és mtsai., 2013*).

Az ocu-miR-290 klaszter (a humán hsa-miR-371 klaszter megfelelője nyúlban) tagjai ezzel szemben már a négysejtes állapotban expresszálódni kezdenek, s a 3,5. napon már a legmagasabb szinten fejeződnek ki. Az OCT4 mRNS expressziós szintjének vizsgálatakor

megfigyelték, hogy az epiblaszt-specifikus faktor is ebben a 3,5 napos fejlődési szakaszban mutat ugrásszerű expresszióbeli növekedést, majd ez a szint folyamatosan tovább emelkedik. A klaszter tagjainak expressziója azonban a nyúl embrionális őssejt-szerű sejtekben jelentősen alacsonyabb mértékű. A GATA4 pedig egy hipoblaszt-specifikus transzkripciós faktor, melynek expressziója Maraghechi és mtsai. eredményei alapján a 6-napos embrióban emelkedik meg látványos mértékben (*Maraghechi és mtsai., 2013*).

Jouneau és mtsai. (2011) leírták, hogy a rágcsló embrionális őssejtek esetén megfigyelhető naív pluripotenciához, valamint a rágcsló epiblaszt őssejtek (EpiSC) és a humán embrionális őssejtek esetén tapasztalható primed pluripotenciához (*Nichols és Smith, 2009*) különböző miRNS expressziós profil köthető. Míg az előbbi esetben a miR-290 klaszter tagjai expresszálódnak a legmagasabb szinten (az OCT4 magas koncentrációja mellett), addig az utóbbi esetében a miR-302 klaszter expressziója az uralkodó (*Jouneau és mtsai., 2011*). A nyúl embrionális őssejt-szerű sejtekben megfigyelt magas ocu-miR-302 klaszter- és alacsony ocu-miR-290 klaszter expressziós szintet tekintve magalapozottnak látszik a sejtés, miszerint ezek a sejtek a nyúlembrió esetében primed pluripotens állapotban vannak (*Maraghechi és mtsai., 2013*) (feltehetőleg ennek köszönhető az a jelenség is, hogy nyúl, ember, illetve egyes gazdasági haszonállatok esetében nincs lehetőség embrionális őssejttelepek hosszútávú fenntartására – és így őssejtvonalak létrehozására sem – az igen hamar bekövetkező differenciáció okán).

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

IV/1. A HASZNÁLT mikroRNS- ÉS ÖSSEJTSPECIFIKUS MARKER-PRIMEREK MEGVÁLASZTÁSA

Azt a döntést, hogy kísérletünkben mely humán miRNS-eket vizsgáljuk meg a nyúlembriók esetében, szakirodalmi adatokra alapoztuk (*ld. III/2.3., és V/3. fejezetek*). Ezek az irodalmi források egyrészt a pluripotencia fenntartásában szerepet játszó miRNS-ekről számoltak be nyúl esetében: a miR-302b-3p fontos epiblaszt- és hipoblaszt-specifikus, a miR-371a-5p pedig fontos epiblaszt-specifikus marker. Másrészt jó és gyengébb minőségű embriókban, illetve azok tenyésztőmédiümában eltérő expressziós szintet mutató fejlődésspecifikus miRNS-ekről adtak hírt elsősorban ember, ritkábban szarvasmarha, sertés és egér esetében.

Ezen adatok alapján végül a következő hét miRNS primer-t szereztük be TaqMan Advance próbában: hsa-miR-24-3p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-191-5p, mmu-miR-302b-3p, hsa-miR-371a-5p és hsa-miR-378a-3p. A rendelt miRNS-primerek az adatlap alapján nyúl esetén is használhatók. A hét fejlődésspecifikus miRNS mellett pedig a GAPDH-hoz, a GATA4-hez (hipoblaszt-specifikus transzkripció faktor) és a POU5F1-hez (epiblaszt-specifikus transzkripció faktor) is beszereztünk mRNS-primereket [*M7. táblázat*].

IV/2. AZ ÁLLATOK TARTÁSÁNAK KÖRÜLMÉNYEI ÉS A MUNKA ETIKAI HÁTTERE

A donorként használt Új-zélandi fehér nyulakat az Innovo Kft. biztosította. Az állatokat a MATE-GBI állatházában tartottuk, egyedi ketrecekben, állandó 20 °C-os hőmérsékleten, programozott (standard) 8:00 és 16:00 közötti megvilágítással, *ad libitum* ételmezési körülmények biztosítása mellett.

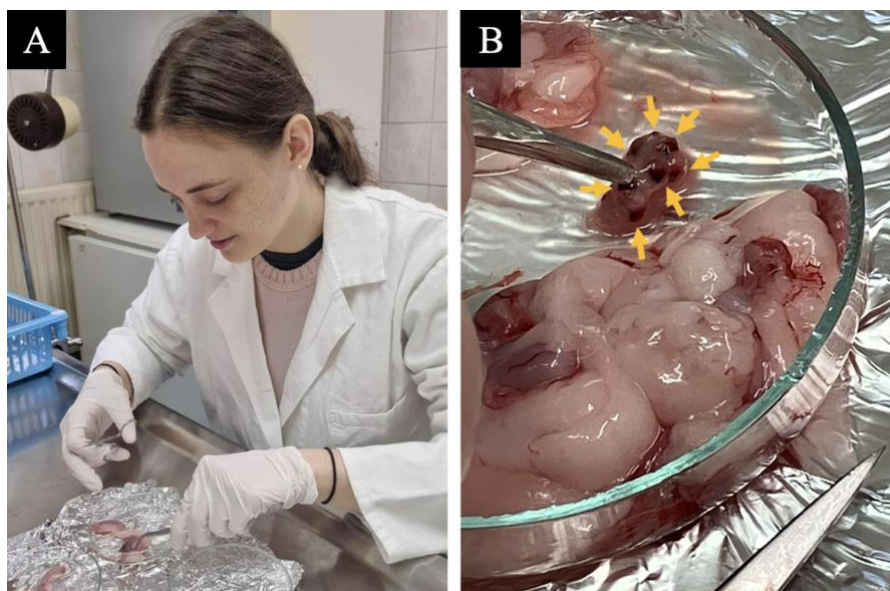
Az állatok magas életminőségének és jólétének fenntartásához szükséges intézkedéseknek minden lehetséges módon igyekeztünk eleget tenni, tartásuk, gondozásuk és kutatási célra való felhasználásuk minden esetben az erre vonatkozó magyar jogszabályoknak megfelelően történt.

IV/3. A DONORNŐSTÉNYEK TERMÉKENYÍTÉSE ÉS AZ EMBRIÓMOSÁS

A kísérleteinkhez 8 donor nyulat használtunk. A nőstényeket ivarérett állapotban, 16-20 hetes (átlagosan 3-3,5 kg-os) korban, mesterséges inszemináció útján termékenyítettük legalább 18-20 hetes bakoktól származó, friss termékenyítőanyaggal (mikroszkópos motilitás-ellenőrzést követően). Az embriók kinyerése egysejtes embriók esetében az inszeminációt követő 20., nyolcsejtes embriók esetében a 38-40. órában történt.

Az embriómosást megelőzően valamennyi donornőstényen taglózást (fejre mért hirtelen ütés) végeztünk. Az állat hasi területét ezután 70%-os etanollal sterilizáltuk, majd a peritoneumon bemetszést ejtve mindkét oldalról kiemeltük a petefészek, az azonos oldali petevezető és a méhszarv craniális szakasza alkotta egységeket. A kimetszett reproduktív szerveket 38,5 °C-on előmelegített, DPBS-t tartalmazó Petri-csészékbe helyeztük, majd igyekeztünk a környező zsírszövet minél alaposabb eltávolítására, ügyelve arra, hogy a szervek épek maradjanak [1/A. ábra].

A hialuronánt és humán szérumalbumint tartalmazó (kifejezetten time-lapse monitorozásra kifejlesztett) G-TL™ humán embriótenyésztő-médiumból [M1. táblázat] mikropapilláris segítségével 20 µL-es cseppeket vittünk fel egy nagyobb átmérőjű, steril sejtenyésztő csészébe. A cseppek steril ásványi olajjal [M1. táblázat] történő lefedése után (olajat a párolgás és a



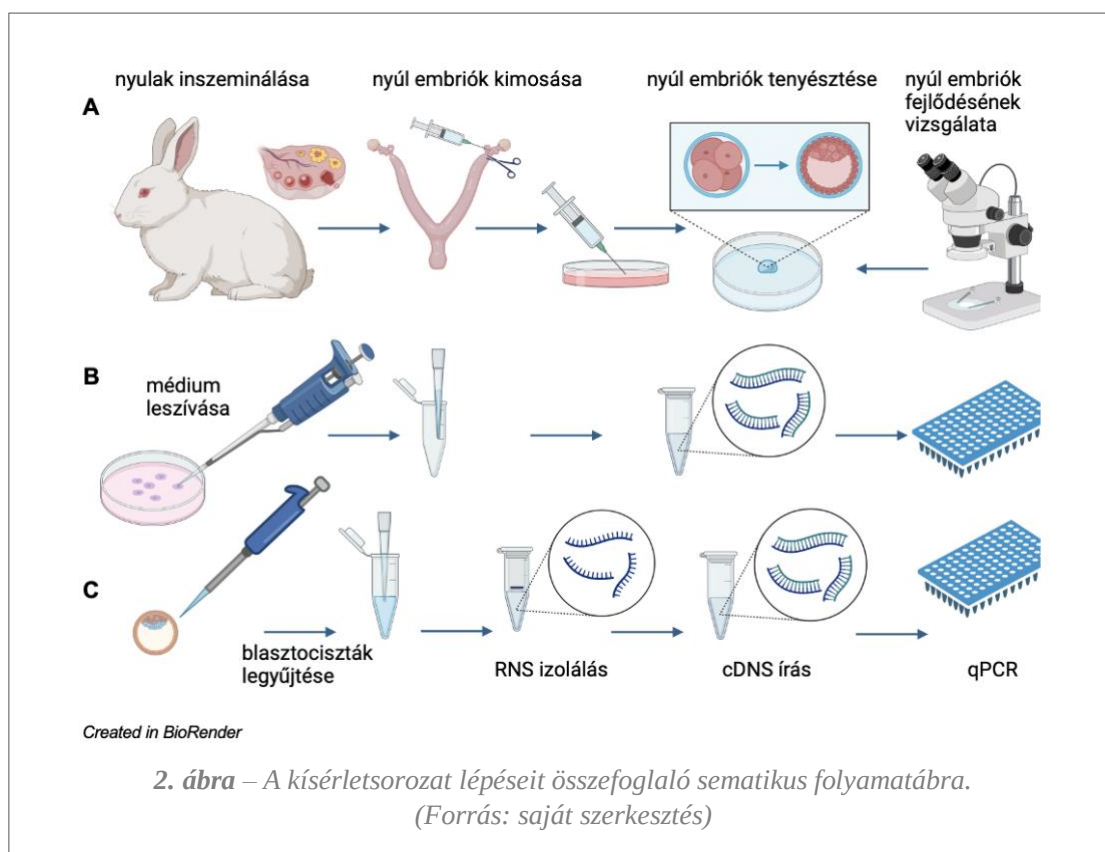
1. ábra – Az embriómosás folyamata. A nyúl petevezető zsírszövettől való megtisztítása és átmosása (A). A nyúl petefészkek átvizsgálása és a vérestestek (sárga nyilakkal jelölve) leszámolása (B). (Forrás: saját felvételek)

szennyeződések bejutásának elkerülése érdekében érdemes alkalmazni) az edényt inkubátorba helyeztük (5% CO₂; 38,5 °C).

79% DPBS, 20% heat-inactivated (hőkezelt) FBS és 1% Penicillin-Streptomycin elegy keverékét 0,22 µm-es membránon átszűrve (sterilizálva), frissen állítottuk össze a médiumot [M1. táblázat]. Ezután az egyik oldali kimetszett szervcsoportot egy EH 18-as injekciós tűvel felszerelt, 20 ml-es fecskendő segítségével, az összemért és 38,5 °C hőmérsékletűre előmelegített médiummal, a méhszarv felől óvatosan átmostuk, ügyelve a petevezető épségére. Az átfolyó médiumot három különálló, 35 mm-es Petri-csészében fogtuk fel (az esetek többségében a kimosott embriók jelentős százalékát az elsőként megtöltött csésze tartalmazza) és az edényeket 38,5 °C hőmérsékletű melegítőpárnára helyeztük. Ezután leszámoltuk az adott petefészek felületén látható vérestesteket (corpus haemorrhagicum), mely szám alapján közelítőleg előre jelezhető, mennyi embrió kimosódására számíthatunk az adott oldali szervcsoportból [1/B. ábra].

Ezt követően egy nagyobb csészébe 3-4 cseppet vittünk fel a G-TL™ humán tenyésztőmédiumból, s sztereomikroszkóp alatt, ezekben a cseppekben tisztítottuk meg a kimosott embriókat az esetleges szennyeződésektől, szövettörmeléktől (az embriókat ebben a szakaszban szájpipetta segítségével mozgattuk, ugyanis egyetlen embrió ezzel az eszközzel könnyebben kezelhetőnek bizonyult). Az egészséges (cumulus-sejtektől mentes és két, jól látható pronukleusszal rendelkező), tiszta embriókat a mosás előtt előkészített, olajjal lefedett G-TL™ médiumcseppekbe helyeztük át, majd a csészét visszatettük az inkubátorba (5% CO₂; 38,5 °C). Az embriók közül csak az egysejtes korban kimosottakat tenyésztettük tovább [M2. táblázat]. Az *in vitro* tenyésztés során egyes embriók, vagy embriócsoportok fejlődését time-lapse készülék segítségével követtük nyomon, valamint a mintavétel előtt fénymikroszkópos képek készítésével rögzítettük aktuális fejlődési állapotukat [M5. ábra].

A fejezetben ismertetett munkafolyamatot az 2. ábra foglalja össze.



IV/4. MINTAVÉTEL

A kimosott embriókat 4-napos, illetve 6-napos korukig tenyésztettük *in vitro* körülmények között, inkubátorban, 38,5 °C hőmérsékleten és 5% CO₂ koncentráció mellett. Az adott tenyésztési idő elteltével először cseppenként 9-9 µL tenyésztőmédium-mintát gyűjtöttünk le tiszta mikrocentrifuga csövekbe [2/B. ábra], majd pipettor segítségével az embriókat is áthelyeztük, 100-100 µL lízispuffert tartalmazó csövekbe (csoportosan tenyésztett embriók esetén azonos csövekbe) [2/C. ábra]. Lízispuffer alkalmazására feltárás céljából volt szükség: a guanidinium-tiocianátot (erősen kaotróp hatású só) tartalmazó lízisoldat károsítja a sejtmembránt és azonnal inaktíválja a ribonukleázokat.

A mintákat -80 °C-on tároltuk, embrióminták esetén az RNS izolálás, médiumminták esetén a cDNS-írás megkezdéséig.

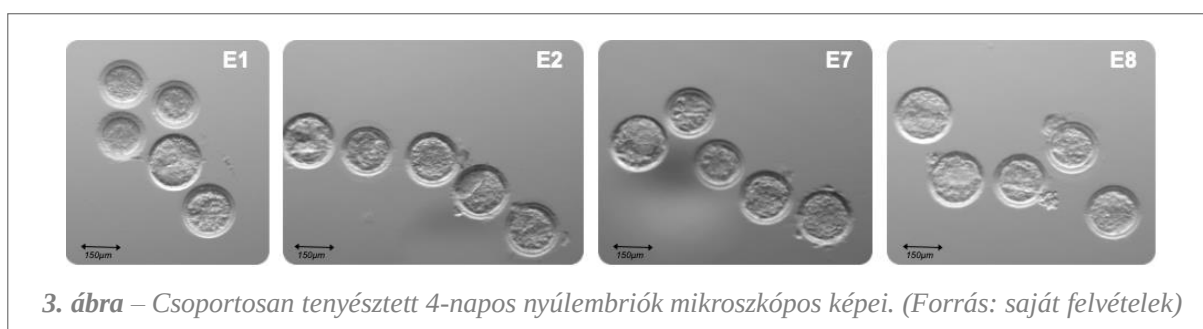
IV/5. ELŐZETES TESZTEK

A kísérleteinket megelőzően három előzetes tesztet végeztünk el.

Első lépésként összevetettünk két különböző RNS-izoláló kit-et azok izolálási hatékonysága alapján. A két kipróbált RNS-izoláló kit a PicoPure™ RNA Isolation Kit (katalógusszám: KIT0204), illetve az RNAqueous™-Micro Total RNA Isolation Kit (katalógusszám: AM1931) voltak. A tesztekhez két-két, csoportosan tenyésztett (pool-onként 5-5 embrió) embriómintát használtunk (E1, E2, E7 és E8 embriócsoportok, ld. *M2. táblázat, valamint 3. ábra*). Az így kapott izolátumok fehérje- és nem fehérje típusú szennyeződésektől (pl. sók, egyéb szerves anyagok) való tisztaságát NanoDrop (ND-1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, UV-Vis) spektrofotométer segítségével ellenőriztük és a 260/280 és 260/230 arányokkal jellemeztük (nukleinsavak, fehérjék és nem fehérje komponensek abszorpciós maximuma ebben a sorrendben: 260 nm, 280 nm és 230 nm).

Ezt követően 4- és 6-napos embriók tenyésztőműedium-mintái esetében vizsgáltuk azt, hogy a miR-92a-3p RNS-izolálást követően, vagy az izolálási lépés kihagyásával detektálható megbízhatóbban (a teszt során az embriómintákban, illetve nyúl embrionális fibroblaszt-mintában is mértük a miR-92a-3p expresszióját). Ezzel együtt az embriótenyésztéshez használt G-TL™ humán tenyésztőműediumot is teszteltük miRNS-mentességére nézve. A humán médium esetében nem végeztünk miRNS-izolálást. A miR-92a-3p alapvetően egy igen széles körben expresszálandó miRNS, ezért választottuk ezt az előzetes tesztek elvégzéséhez.

Végül teszteltük a megrendelt hét miRNS-primer működését 4-napos embrió-, illetve médiummintán, valamint nyúl embrionális fibroblaszt-tenyészetén.



IV/6. RNS-IZOLÁLÁS

Az RNS-izolálás lépését (a főkísérletekben) csak az embriókat tartalmazó mintákon végeztük el, a tenyésztőműedium-minták esetén ezt a szakaszt kihagytuk [2/B és 2/C. ábrák].

IV/6.1. RNS-IZOLÁLÁS A PicoPure™ RNA Isolation Kit HASZNÁLATÁVAL

A PicoPure™ RNA Isolation Kit (a továbbiakban: PicoPure kit) segítségével piko-nagyságrendű mintákból is preparálható RNS-tartalom (ez akár egyetlen sejtet is jelenthet).

A kit gyári utasításait követve a mintáinkhoz 10-10 µL extrakciós puffert adtunk, majd 30 percig, 42 °C hőmérsékleten inkubáltuk. Az oszlop membránját eközben 250 µL kondicionáló pufferrel előkezeltük, 5 percig szobahőmérsékleten inkubálva, majd 1 percen keresztül 16.000 x g-n centrifugálva. Az extraktált mintákhoz 10-10 µL etanolt adtunk és óvatos pipetázással elegyítettük (szigorúan centrifugálás nélkül!), majd vittük fel az előkezelt oszlopmembránra. Ezt 2 percig 100 x g-n, majd közvetlen ezután 30 mp-ig 16.000 x g-n történő centrifugálás követte.

A mosási folyamatot 1x100 µL 1-es számú és 2x100 µL 2-es számú mosóoldattal végeztük, az egyes mosási lépések között 1-1 perc centrifugálással (8.000 x g). A harmadik mosóoldat-mennyiség hozzáadása után 2 percig centrifugáltuk 16.000 x g-n, végül a gyűjtőcső tartalmának kiürítése után 1 percen keresztül száraz centrifugálást végeztünk.

Az oszlopot tiszta csőbe helyeztük és a rajta megkötött RNS-tartalmat 15 µL eluáló puffer membránra pipetázásával (a pipettahegy membránhoz érintésével biztosítottuk az eluáló oldat hatékony felszívódását), majd 1 perc szobahőmérsékleten való inkubálási időt követően 1 perc 1.000 x g-n (az oldat eloszlatása érdekében) és újabb 1 perc 16.000 x g-n történő centrifugálással igyekeztünk leoldani a gyűjtőcsőbe.

Az így kapott RNS-izolátumot a cDNS-írás megkezdéséig -80 °C-on tároltuk.

IV/6.2. RNS-IZOLÁLÁS AZ RNAqueous™-Micro Total RNA Isolation Kit HASZNÁLATÁVAL

A RNAqueous™-Micro Total RNA Isolation Kit (a továbbiakban: RNAq kit) szintén kisméretű filterrel rendelkezik, így meglehetősen kis mennyiségű RNS eluálására is lehetőséget nyújt, a standard tisztítást követően igen koncentráltan juthatunk hozzá a mintából származó RNS-tartalomhoz, s ezáltal megkönnyíti az izolálást követő RT-qPCR-mérések kivitelezését.

A kit gyári leírása alapján előkészítettük a mosóoldatokat (100%-os etanol hozzáadásával), majd az izolálási protokollt követve a 100 µL mennyiségű mintákhoz (az egyedi, illetve csoportosan tenyésztett embriók esetében is) 50-50 µL 100%-os etanolt adtunk. Az egyenként

150 μL keveréket szilikagél-alapú Micro Filter oszlopokra pipettáztuk, melyek az ezt követő centrifugálás (10 mp, 13.000 x g, 4 °C) során megkötötték az RNS-tartalmat.

Az RNS-tisztítást 1x180 μL 1-es számú- és 2x180 μL 2/3-as számú mosóoldattal végeztük, minden mosási lépés után 10-10 mp-es centrifugálással (13.000 x g, 4 °C). Az utolsó mosási lépést, majd a gyűjtőcső kiürítését követően egy újabb (száraz) centrifugálással (30 mp, 13.000 x g, 4 °C) törekedtünk a mosóoldat leghatékonyabb eltávolítására.

A filtert ezt követően tiszta csőbe helyeztük, s az előzetesen 75 °C-ra előmelegített eluáló oldatból 6 μL -t mértünk a filter közepére. 1 perc szobahőmérsékleten történő inkubálás után 30 mp-ig centrifugáltuk a mintát (13.000 x g, 4 °C), majd újabb 6 μL eluáló oldat hozzáadásával megismételtük az eluálási folyamatot.

A kapott RNS-izolátumot a cDNS-írás megkezdéséig -80 °C-on tároltuk.

IV/7. cDNS-ÍRÁS

Az embriómintákból izolált, valamint a médiummintákban található miRNS-ekről az Applied Biosystems™ TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (katalógusszám: A28007) segítségével írtunk cDNS-t. Első lépésként az érett miRNS-eket a 3' végen poli(A) farokkal, az 5' végen pedig adapter szekvenciával hosszabbítottuk meg, ugyanis előbbi a reverz transzkripciót indító univerzális primer köti meg, utóbbi pedig a forward primer kötőhelyeként szolgál. A reverz transzkripciót (RT) követően egy miR-Amp reakció során amplifikáltuk a miRNS-ekről íródó cDNS-ek mennyiségét.

A poliadenilációs reakcióelegyet az *M6/A. táblázat* alapján állítottuk össze. Valamennyi mintából 2 μL -es mennyiségeket mértünk ki, ehhez adtunk 3-3 μL -t a reakciómixből. Rövid vortexelés után sor került az első hőciklusos inkubálásra, melynek során a poliadeniláció 37 °C-on, 45 perc alatt ment végbe.

Az adapter ligálásához a reakciómixet az *M6/B. táblázat* szerint mértük össze. Ebből 10-10 μL mennyiséget adtunk az előző lépés után kapott reakciótermékhez. Alapos vortexelést követően újabb hőciklusos inkubálás során 16 °C-on 60 perc alatt zajlott le az adapter ligálási folyamata.

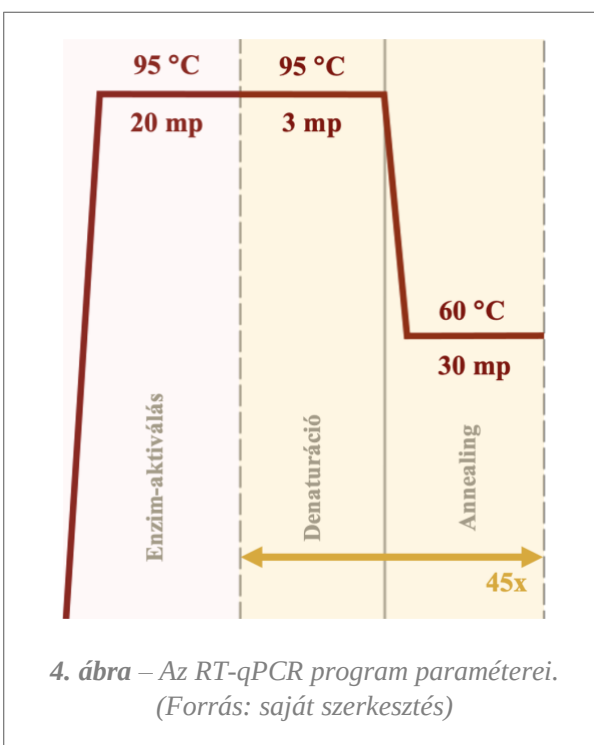
A következő lépésben a reverz transzkripció (RT) reakcióelegyet állítottuk össze az *M6/C. táblázat* alapján, melyből 15-15 μL -t mértünk az előbbi reakció termékéhez. Az inkubálás során 42 °C-on, 15 perc alatt történt meg a reverz transzkripció.

Utolsó lépésként elvégeztük a miRNS-amplifikációt. Az ehhez szükséges reakcióelegyet az *M6/D. táblázat* szerint készítettük el. A mix-ből 45 μL mennyiségeket mértünk tiszta Eppendorf-csövekbe és ezekhez 5-5 μL -t adtunk a reverz transzkripció reakció termékéből. Rövid vortexelést követően sor került az utolsó hőciklusos inkubálásra. Ennek során megtörtént az enzim aktiválása (5 perc, 95 °C), valamint 14 egymást követő cikluson keresztül a denaturáció (3 mp, 95 °C) és a lánchosszabbítás (30 mp, 60 °C). Ezzel a lépéssel elkészült a cDNS-írás végleges reakcióterméke, mellyel a következő szakaszban elvégezhetjük az RT-qPCR-t.

IV/8. RT-qPCR

A PCR-plate összeállítása előtt a cDNS mintákat RNáz-mentes víz hozzáadásával 1:10 arányban hígítottuk. A PCR reakcióelegy miRNS-primerenkénti összemérését [*M3. táblázat*] és alapos vortexelést követően a plate valamennyi (reakcióhoz felhasznált) pozíciójába 15-15 μL mennyiségeket vittünk fel a megfelelő miRNS-primert [*M7. táblázat*] tartalmazó mix-ből, majd a mintákból 5-5 μL mennyiségeket adtunk hozzá. Minden minta esetében az öt vizsgált miRNS-re (miR-24, miR-92, miR-103a, miR-191-5p és miR-378) nézve 3-3 parallelben végeztük el a reakciót, valamint negatív kontrollként adott miRNS primer-hez csak a PCR reakciómix és 5-5 μL RNáz-mentes víz került.

A kész plate-et ezután gondosan lefedtük, majd 1 perc centrifugálás (300 x g), 10-20 mp thermomixer-rel történő elegyítés (100 x g) és újabb 1 perc centrifugálás (300 x g) következett. Végül a plate-et a Mastercycler ep realplex RT-qPCR készülékbe helyeztük és a programot a 4. ábrán látható paramétereknek megfelelően állítottuk be. A program végeztével a készülékhez tartozó RealPlex szoftver segítségével tekintettük meg a futás eredményeit.



IV/9. ADATOK KIÉRTÉKELÉSE – MultiD GenEx

Az RT-qPCR eredményeinket az Eppendorf RealPlex programja segítségével dolgoztuk fel. A PCR-plate összeállítása során minden mintából, minden miRNS-primerrel 3-3 paralelt készítettünk, melyek közül egyet minden alkalommal kizártunk az értékelésből. A kapott adatokat a MultiD GenEx qPCR-adatelemző (<http://www.multid.se>, 7.0-s verzió) szoftverébe importáltuk, s feldolgozásukat ennek segítségével végeztük el.

A szoftver korszerű adatfeldolgozásra, -elemzésre és -kezelésre ad lehetőséget. Több gén összehasonlításakor korrigálja a többszörös tesztelésből adódó esetleges ellentmondásokat. Több csoport összevetéséhez egyszempontos ANOVA varianciaanalízist használ. A referencia gén, vagy gének meghatározása is a GenEx program segítségével történt, mely lehetővé teszi, hogy bármilyen referencia génre, vagy akár referencia gén szettekre is normalizálhassunk. Lehetséges továbbá a normalizálás az összes gén átlagos expressziójához viszonyítva is. Ilyenkor a program minden minta esetén kiszámol egy globális átlag Ct értéket, s ebből kalkulálja a gének ΔCt értékeit. Ez lehetőséget adott arra, hogy megbízható háztartási gén hiányában is normalizálni tudjuk a vizsgált miRNS-ek esetén mért értékeinket. Heatmap készítésével az expressziók közti különbséget, illetve a minták közti korrelációkat tudjuk grafikusán szemléltetni. A Kohonen SOM (self-organizing map – önszervező csoportosítás) funkció pedig a minták közös expressziós mintázatok alapján történő osztályozására ad lehetőséget.

A kísérleteinkből származó adatokat a Ct, illetve ΔCt , értékek alapján értelmeztük. A Ct (cycle threshold) az az érték, amely megadja, hány PCR ciklust követően lépi át egy adott génre vonatkozó jel az általunk beállított küszöbértéket, míg a ΔCt az adott miRNS (vagy mRNS) és a háztartási gén Ct-értékének különbsége, mely korrekcióra azért van szükség, hogy a minta mennyisége, a cDNS-írás hatékonysága, illetve hasonló változók ne befolyásolják az expresszióra vonatkozó érték alakulását.

Az mRNS-ek (GATA4 és POU5F1), illetve a csoportosan tenyésztett embriók esetében vizsgált miRNS-ek expressziós értékeit a GAPDH háztartási génre normalizáltuk, az egyedi cseppekben tenyésztett embriók, s ezek médiummintái esetében viszont – megbízható háztartási gén hiányában – globális normalizálást végeztünk a GenEx program segítségével (a jelentős expressziót nem mutató minták adatainak kizárása nélkül).

Eredményeink feldolgozásakor egyrészt heatmap-ek készítésével, mintánként ábrázoltuk az adott miRNS-ek expressziós szintjét, valamint az ez alapján megállapítható korrelációt a minták között, majd a Kohonen önszervező csoportosítási funkció segítségével tettük szemléletesebbé mintáink csoportokba rendezését a miRNS-ek esetén számolt ΔC_t értékek alapján.

IV/10. SOLiD-SZEKVENÁLÁS

Az általam felhasznált, SOLiD-szekvenálásból származó adatok esetében a könyvtárak a csoportom által korábban, nyúlembriókból és embrionális nyúl fibroblasztból izolált totál RNS-minták felhasználásával készültek, és a Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közalapítvány Növénygenomikai, Humán Biotechnológiai és Bioenergetikai Intézetében, Szegeden kerültek megszekvenálásra a SOLiD 3 System (Applied Biosystems) használatával. A szekvenálás során kapott adatfájlok a <https://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/ERP002216> oldalon érhetők el az SRA Webin segítségével. A SOLiD szekvenálásból nyert adatok a SOLiD System Small RNA Analysis Pipeline Tool (RNA2MAP, 0.5-ös verzió) alkalmazásával kerültek kielemezésre, a szekvenciák annotációja a miRBase-ről (<https://mirbase.org>) letöltött, már ismert humán (hsa-), szarvasmarha (bta-), valamint egér (mmu-) miRNS-szekvenciák alapján történt.

Ezen adatbázisból kerestem ki az általam vizsgált ocu-miRNS szekvenciákat, illetve azok előfordulási arányát a 6- és 7-napos nyúlembriókban, illetve embrionális nyúl fibroblasztban.

V. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

V/1. EMBRIÓMOSÁS

A kísérleteinkben használt 8 donornősténytől összesen 61 embrióhoz jutottunk az embriómosások során. Ezek közül végül 47 olyan embriót kaptunk, mely elérte a blasztociszta állapotot [M4. táblázat], s mely esetében mind magából az embrióból, mind a hozzá tartozó tenyésztőmedium-cseppekből mintát tudtunk venni a méréseinkhez.

V/2. ELŐZETES TESZTEK

Két RNS-izoláló kitet hasonlítottunk össze, mely tesztek eredménye alapján az RNAq kitet választottuk saját kísérleteink elvégzéséhez. Habár a PicoPure kit esetében nagyobb koncentrációban kaptunk RNS-t a csoportosan tenyésztett embriókból, a spektrofotometriás tisztaság-ellenőrzéskor azt láttuk, hogy az RNAq kit esetén tudtunk megfelelő tisztaságú RNS-hez jutni [1. táblázat]. Ez az izolátum mind fehérje- (A260/A280), mind nem fehérje (A260/A230) típusú szennyeződésekkel kisebb mennyiségben tartalmazott (egy tisztának számító izolátum esetén mért A260/A280 arány kb. 2,0, míg a A260/A230 arány 2,0-2,2 között van).

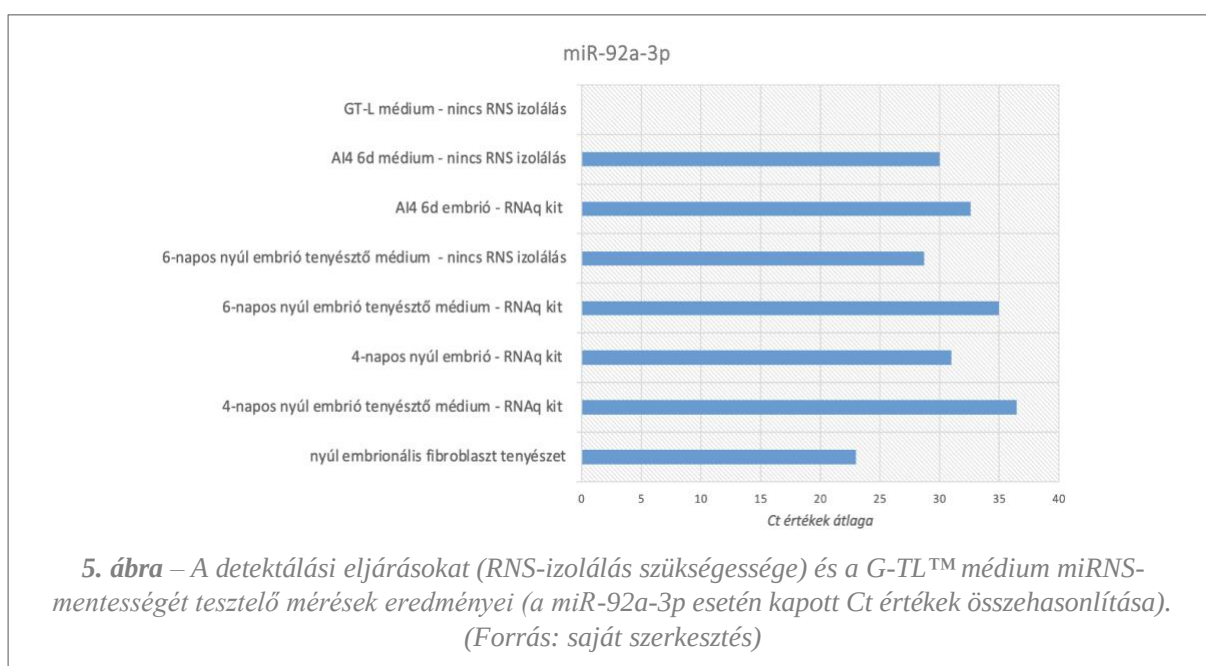
Mivel az előzetes tesztek eredményei alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az RNAq kit tisztább RNS-izolálásra ad lehetőséget, ezért főkísérleteinkben már valamennyi embriómintából ennek a kitnek a segítségével végeztük az RNS-izolálást.

A detektálási eljárásokat tesztelő mérések eredményéből azt láttuk, hogy a tenyésztőmedium-minták esetében az RNS-izolálási lépést kihagyva meglehetősen

1. táblázat – Az RNS-izoláló kit-ek hatékonyságának összehasonlítása. (Forrás: saját munka)

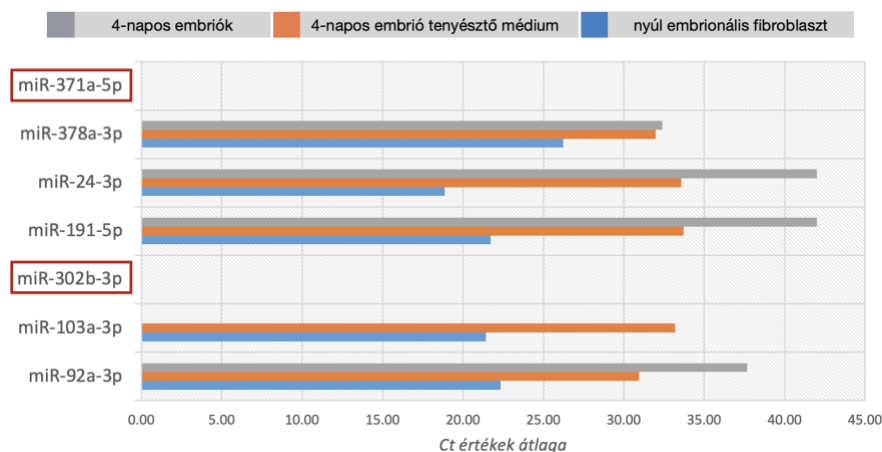
Izoláló kit	Embrió-csoportok	Embriók száma	RNS-konc. (ng/μL)	A260/A280	A260/A230
RNAq	E1	5	2,681	1,844	0,179
RNAq	E2	5	2,649	1,850	1,705
PicoPure	E7	5	5,763	1,564	0,301
PicoPure	E8	5	6,145	1,606	0,271

alacsonyabb volt a miR-92a-3p Ct-értéke (Ct = 30,98 és 28,71), azaz nagyobb mennyiségben kaptuk meg a miRNS-t ezekben az esetekben, mint az RNS-izolálás elvégzését követően (Ct = 36,45) [5. ábra]. A főkísérleteinkben ezért már egyik médiumminta esetében sem végeztünk RNS-izolálást. Emellett azt is megállapíthattuk, hogy az *in vitro* embriótenyésztéshez használt G-TLTM humán médium esetén nem mutatható ki a miR-92a-3p (Ct = 0,00) [5. ábra].



A főkísérleteink előtt a megrendelt hét humán miRNS-primert 4-napos embrió-, illetve médiummintán, valamint nyúl embrionális fibroblaszt tenyészetten teszteltük. Az eredmények alapján azt láttuk, hogy a miR-371a-5p és a miR-302b-3p expressziója nem volt kimutatható ezekben a mintákban [6. ábra].

A jelenség okának felderítéséhez egy 6- és 7-napos embriók esetén végzett SOLiD-szekvenálásból származó adatsort vizsgáltam meg, melyhez az adatokat témavezetőim bocsátották rendelkezésemre. Az adatsorban először elvégeztem az *in vivo* fejlődő nyúlembriókból izolált miRNS-ek read-mennyiségének összes read-számhoz történő arányosítását és ez alapján a miRNS-ek expressziós szint szerinti rangsorolását. A SOLiD-szekvenálás eredményének feldolgozása után azt láttam, hogy az általunk vizsgált hét miRNS közül öt (miR-24-3p, miR-92a-3p, miR-103a-3p, miR-191-5p, miR-371a-5p) megjelent a 6- és 7-napos embriók esetén legtöbb read-et adó miRNS-ek között. A két kivétel egyike a miR-302b-3p volt, ezért feltételezzük, hogy ezt a miRNS-t valóban azért nem tudtuk detektálni, mert nem, vagy csak nagyon kis mennyiségben volt jelen a saját mintáinkban (a másik kivétel



6. ábra – A hét miRNS-primer tesztelésének eredményei. Az ábrán jól látható, hogy a miR-371a-5p és a miR-302b-3p nem detektálható a mintákban. (Forrás: saját szerkesztés)

a miR-378a-3p, ez azonban saját méréseink során is mutatott mérhető expressziót). A miR-371a-5p azonban a SOLiD-szekvenálási adatok alapján, az arányosítás után az összes read 18,07%-át adta (a legnagyobb read számmal rendelkező miRNS-ként!), ezért feltételeztük, hogy azt, hogy ez a miRNS nem volt detektálható a mintáinkban, nem a miRNS expressziójának hiánya okozta.

A jelenség valószínűsíthető okát végül a szekvencia ellenőrzésekor találtuk meg. A probléma feltehetőleg abban rejlett, hogy míg kísérletünkben hsa-miR-371a-5p primerrel, tehát humán miRNS-primerrel dolgoztunk, addig a SOLiD-szekvenáláskor a 6- és 7-napos nyúlembriókban látható miRNS ocu-miR-371-5p, azaz nyúl miRNS volt. Mint láttuk, a legtöbb primerünk esetében ez nem jelentett gondot, a hsa-miR-371a-5p azonban egyetlen bázisban eltér a nyúlban található megfelelőjétől [2. táblázat]. Mivel ez a C/U báziskülönbség a szekvencia középső szakaszán, azaz feltehetőleg a seed-régióban, vagy ahhoz nagyon közel helyezkedik el, ezért azt feltételezzük, hogy ez az eltérés a humán primer nyúl-miRNS-en való működőképtelenségét vonja maga után.

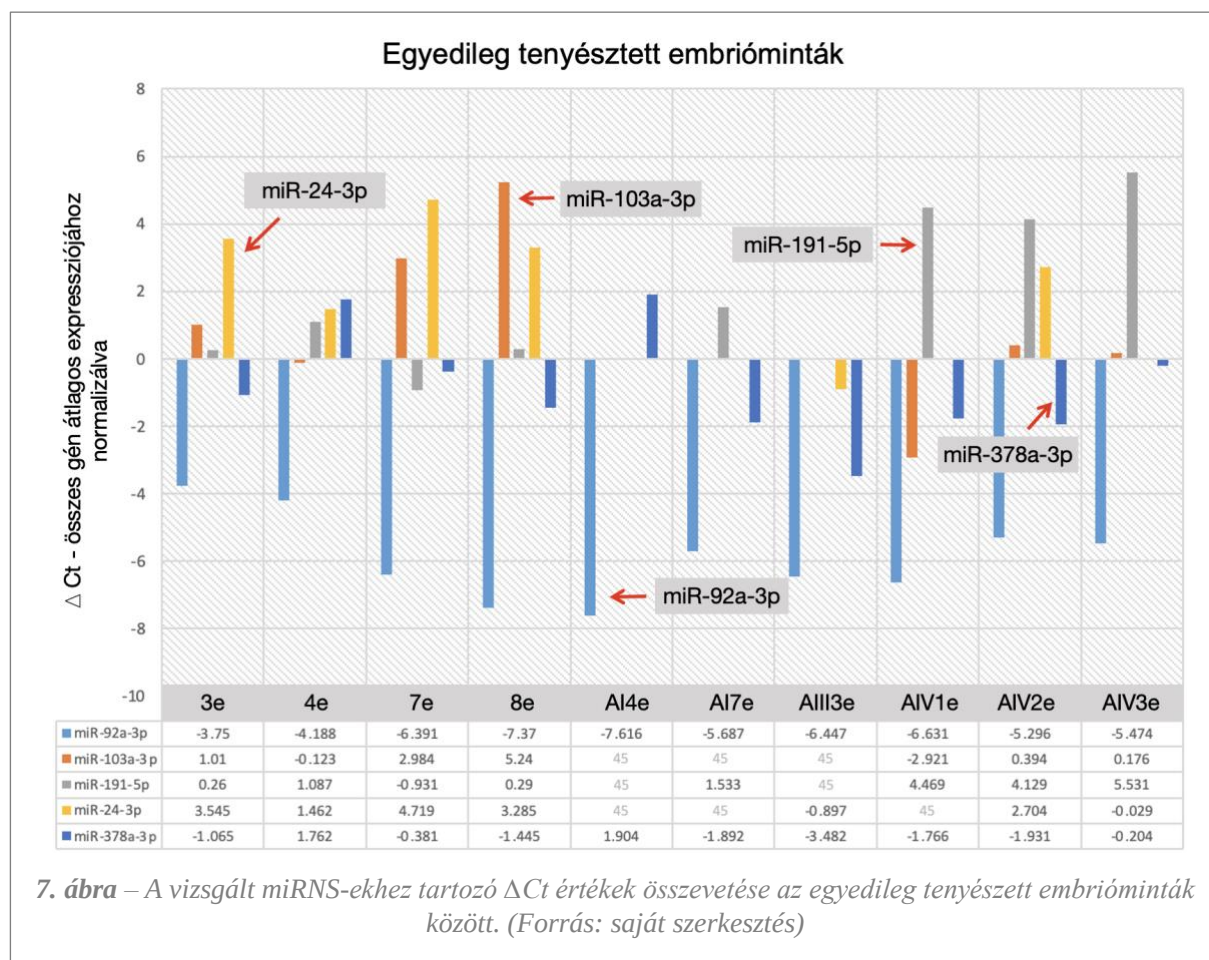
Mivel a miR-371a-5p-t és a miR-302b-3p-t a teszt során nem tudtuk detektálni a mintáinkban, a főkísérleteinkben már csak a másik öt miRNS (miR-24-3p, miR-92a-3p, miR-103a-3p, miR-191-5p és miR-378a-3p) expresszióját vizsgáltuk.

2. táblázat – A hsa-miR-371a-5p és ocu-miR-371a-5p szekvenciája közti, egyetlen bázisnyi különbség. (Forrás: saját szerkesztés)

miRNS	szekvencia
ocu-miR-371-5p	ACUCAAAAC C GUGGGGGGCACU UU
hsa-miR-371a-5p	ACUCAAAAC U GUGGGGGGCACU

V/3. RELATÍV mikroRNS-EXPRESSZIÓ ÖSSZEHAISONLÍTÁSA EGYEDILEG TENYÉSZTETT EMBRIÓMINTÁKBAN

Az egyedileg tenyésztett embriók közül 4 db 4-napos (3, 4, 7 és 8) és 6 db 6-napos (AI4, AI7, AIII3, AIV1, AIV2 és AIV3) embrió esetén [M2. táblázat] vetettük össze az öt vizsgált miRNS-re adott expressziós értékeket, melyeket a GenEx szoftver NormFinder funkciójának segítségével normalizáltunk [7. ábra].



Az adatokból azt láttuk, hogy a miR-92a-3p alapvetően minden minta esetén negatív ΔCt értéket adott, azaz ez volt a legmagasabb szinten és legegységesebben expresszáldó miRNS ebben a mintacsoportban. A 3-as ($\Delta Ct = -3,750$) és 4-es ($\Delta Ct = -4,188$) embrióknál (3e és 4e minták) jól látszik [7. ábra], hogy a miR-92a-3p alacsonyabb szinten expresszáldott a többi embrióhoz képest. A miR-92a-val kapcsolatban McCallie és mtsai. (2010) tettek fontos megállapítást, amikor policisztás ovárium szindrómában (PCOS) szenvedő nőktől, illetve egészséges petesejt-donoroktól származó blasztociszták esetén vizsgálták a miRNS-tartalmat. Megfigyelték, hogy a miR-92 (néhány más miRNS-hez hasonlóan) szignifikánsan csökkent

expressziós szintet ($P < 0.05$) mutat a PCOS-betegektől származó blasztocisztákban, mely valószínűsíthetőleg az embrió alapvető életképességével és minőségével hozható kapcsolatba. Emellett az eltérően expresszáldó miRNS-ek esetében célgén-bebecslést is végeztek, s az ezekhez köthető biológiai folyamatok alapján valószínűsíthető, hogy a miR-92 olyan funkciók szabályozásában vesz részt, mint a transzkripció, különböző jelátviteli folyamatok és sejtek közötti kommunikáció, valamint sejtnövekedés és -fejlődés (McCallie és mtsai., 2010). McCallie és mtsai. megfigyelése alapján tehát kísérletünkben az alacsonyabb miR-92a-3p-expresszió utalhat a 3-as és 4-es embriók enyhén gyengébb minőségére, mely megállapítás az embriók morfológiai tulajdonságai alapján is indokoltnak tűnik [M5/A. ábra].

A másik négy miRNS expressziós szintje azonban igen változatos mintázatot és egyes minták esetén szembetűnő eltéréseket mutat, s érdekes, hogy ezek a különbségek leginkább akkor szembetűnőek, amikor a 4-napos embriók eredményeit vetjük össze a 6-napos embriókéval.

A miR-103a-3p és a miR-24-3p például a minták döntő többségében magasabb expressziót mutatott a 4-napos embriók esetében, mint a 6-naposokéban, mely utóbbinál sok esetben a 45 PCR-ciklus alatt egyáltalán nem jött fel ez a két miRNS [7. ábra].

Zhang és mtsai. (2021) igazolták, hogy a miR-103a-3p megnövekedett koncentrációja a tüszőfolyadékban egy fontos fehérje, a BDNF szintjének csökkenésével és ezen keresztül a petesejt éretlen állapotával hozható kapcsolatba (Zhang és mtsai., 2021), mely mintázat feltehetőleg a korai, 4-napos embriók fejlődési folyamatára is vonatkoztatható. Ez alapján a 4-napos embrióknál látható magasabb miR-103a-3p-expresszió kapcsolatban állhat a 6-napos embriókhoz viszonyított kevésbé fejlett állapotukkal.

Kropp és Khatib (2015) miR-24-expresszióval kapcsolatos megfigyelései azonban már kevésbé támasztják alá az általunk mért eredményeket. Az említett kísérletben a kutatók morula állapotból továbbfejlődni képtelen szarvasmarha embriók tenyésztőmédiumában mutattak ki a miR-24 esetében szignifikánsan magasabb ($P < 0.004$) expressziót az egészséges blasztocisztákéhoz képest, majd a miRNS hatását tovább vizsgálva azt is megállapították, hogy az egyik miR-24 által szabályozott gén a *CDKN1b*, mely korlátozza a sejtciklust és gátolja a proliferációt, elősegítve az apoptózis folyamatát. A miR-24 túlzott jelenléte tehát összefüggésbe hozható a *CDKN1b* csökkent expressziós szintjével, így az apoptózis korlátozásával és az elégtelen embrióminőséggel is. Kropp és Khatib emellett a kontroll csoport embriói esetében részletesebben is elemezték a miR-24 kifejeződését a morula és blasztociszta fejlődési állapotok közötti időszakban, s azt látták, hogy a morula korú embriók

tenyésztőmédiában szignifikánsan ($P < 0.02$) magasabb volt a vizsgált miRNS expressziója, mint a blasztocisztákéban. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy a miR-24 időben, a morula állapottól a blasztociszta felé haladva, egyre jelentősebb mértékben alulszabályozódik, s ebben az érzékeny időszakban a genetikai szabályozás megváltozása (pl. ha a miR-24 expressziós szintje nem csökken megfelelő mértékben) az embrió rendellenes fejlődéséhez, vagy a növekedés teljes leállításához is vezethet (Kropp és Khatib, 2015). Kísérleteinkben a 6-napos embriók esetében a miR-24-3p szemmel láthatóan magasabb expressziót mutatott a 4-naposokéhoz viszonyítva. Az ellentmondásos eredményeket egyelőre nem tudjuk magyarázni. A miR-103a-3p és miR-24-3p esetén mért expressziós szintek alapján a 4-napos embriók közül a 4-es (4e minta) mondható a legfejlettebbnek ($\Delta C_{t\text{miR-103a-3p}} = -0,123$; $\Delta C_{t\text{miR-24-3p}} = 1,462$), míg a 6-napos embriók csoportjából az AI4-es és AI7-es minták mutatnak egyértelműen visszamaradt fejlődésre utaló jeleket ($\Delta C_{t\text{miR-103a-3p}}$ és $\Delta C_{t\text{miR-24-3p}} > 45$) [7. ábra].

Adataink alapján a miR-191-5p szintjében is láthatunk egyfajta általános eltérést a 4- és 6-napos embriócsoportok között, ugyanis az adatok szerint a 6-napos embriók többsége esetében alacsonyabb szinten expresszál az említett miRNS a 4-naposokhoz képest. Amikor Acuña-González és mtsai. (2021) sikeresen beágyazódó és terhességet eredményező, valamint erre nem képes embriók tenyésztőmédiáinak miRNS-profilját elemezték embrióminőséggel korreláló miRNS-ek után kutatva, a vizsgált miRNS-ek közül a miR-191-5p expressziós szintje szignifikánsan magasabbnak ($P \leq 0.001$) bizonyult a jó implantációs képességgel bíró embriók tenyésztőmédiájában az inkompetens embrióknál mérthez képest. Azt is megállapították, hogy a miR-191-5p többek között az IGF2BP1 és IGF2R fehérjék expresszióját is szabályozza, ezek a fehérjék pedig kapcsolatban állnak az endometrium-szövet decidualizációjával, illetve a beágyazódási ablakkal (Acuña-González és mtsai., 2021). Ez alapján feltételezhető, hogy a fejlődő embrió a miR-191-5p szekrécióján keresztül befolyással van az endometrium receptivitására, mely nagyszerű példa a terhesség létrejöttéhez és fenntartáshoz elengedhetetlen, embrió és anya szervezete között folyó molekuláris párbeszédre.

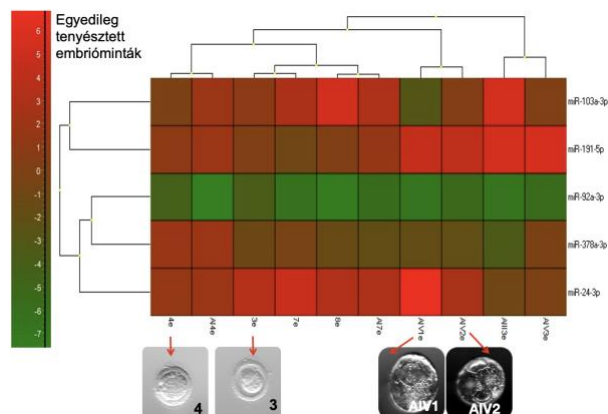
Az említett publikáció eredménye olyan szempontból egybehangzik a saját embriómintáink esetén kapott értékek alakulásával, hogy 6-napos korban az embriók feltehetően már valóban beágyazódásra felkészültebb állapotban vannak, s az erre utaló alacsonyabb miR-191-5p szintet a 6-napos embrióink többségénél valóban tapasztalhattuk. A miR-191-5p kifejeződési szintjét értékelve a 4-napos embriók közül ismét a 4-es embrió (4e minta) mondható a legfejlettebbnek ($\Delta C_t = 1,087$), míg a 6-napos embriók közül az AI4e és az AIII3e esetén egyáltalán nem jelenik meg a miRNS, amely szintén azok rendellenes fejlődésére utalhat [7. ábra].

A miR-378a-3p expressziós szintje igen nagy változatosságot mutat a mintáink esetében, mégis általánosságban megfigyelhető, hogy több 6-napos embrióban is viszonylag magas kifejeződési szintet tapasztalunk, míg ez a 4-napos embriókról nem mondható el. Pavani és mtsai. (2022) a hatching (zona pellucida elhagyása) kivitelezésére képes és erre képtelen szarvasmarha embriók tenyésztőmédiúmában vetették össze a miR-378a-3p expressziós szintjét, s megállapították, hogy a sikeres hatching-re és a blasztocisza állapotba történő továbbfejlődésre képes embriók médiúmában szignifikánsan emelkedett szinten expresszáldott (emellett pedig érdekes további megfigyelés, hogy a miR-378 mimic molekulájának extracelluláris jelenlétében az embrió minősége jelentős javulást mutatott: megnőtt az összsejtszám és az ICM-sejtszám és javult a hatching-képesség) (Pavani és mtsai., 2022).

Tekintve, hogy a miR-378a-3p a hatching-képességgel áll kapcsolatban, melyre egészséges nyúlembriók esetén már a 6. fejlődési napon sor kerülhet, a 6-napos embriók esetében általánosan tapasztalható magasabb szintű miR-378a-3p expresszió összefügghet a zona pellucidából való kibújás előkészítésével, és feltételezhető, hogy a miRNS a hatching megkezdéséig fokozatosan egyre nagyobb mértékben fejeződik ki az embrióban. Mintáink közül a legmagasabb miR-378a-3p-expresszióval az AIII3-as embrió rendelkezett ($\Delta C_t = -3,482$) [7. ábra], melynek mikroszkópos képén [M5/B. ábra] valóban a hatching kezdeti stádiumai láthatók.

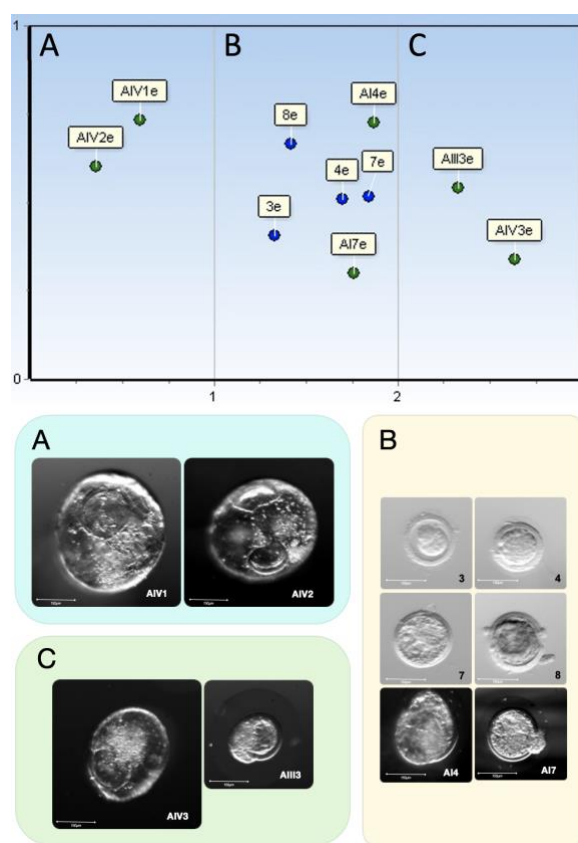
Azt, hogy a miRNS-expressziós adatok alapján az embriók közül melyek állnak közelebb egymáshoz a fejlettségi szintet és a minőséget tekintve, egy GenEx segítségével készített heatmap-en szemléltettük [8. ábra]. Az ábrát értelmezve azt látjuk, hogy a morfológiai tulajdonságok alapján fejlettségben egymáshoz közelebb álló embriók egyes esetekben a miRNS-expressziós szintek szerint generált heatmap-en is egymás mellé kerültek – a morfológiailag gyengébb minőségű, vagy kevésbé fejlett 3-as, 4-es és AI4-es, illetve a legjobb fejlettséget mutató AIV1-es és AIV2-es embriók például egymással szomszédosan helyezkednek el. Azonban egyes embriók olyan helyre kerültek az ábrán, mely besorolás a morfológiai tulajdonságok alapján nem tűnik megalapozottnak. Ilyen például az AIII3-as embrió, melynek minősége látszólag elmarad a vele szomszédos AIV1-es, AIV2-es és AIV3-as embriókétól [M5/B. ábra].

Ezt követően Kohonen SOM segítségével, a miRNS-ek közös expressziós bélyegeire alapozva csoportokba osztottuk az egyedi embriókat. Az osztályozást követően itt is szemügyre



8. ábra – Heatmap az egyedileg tenyésztett embrióminták esetén számolt ΔCt értékek összevetéséhez.
(Forrás: saját szerkesztés)

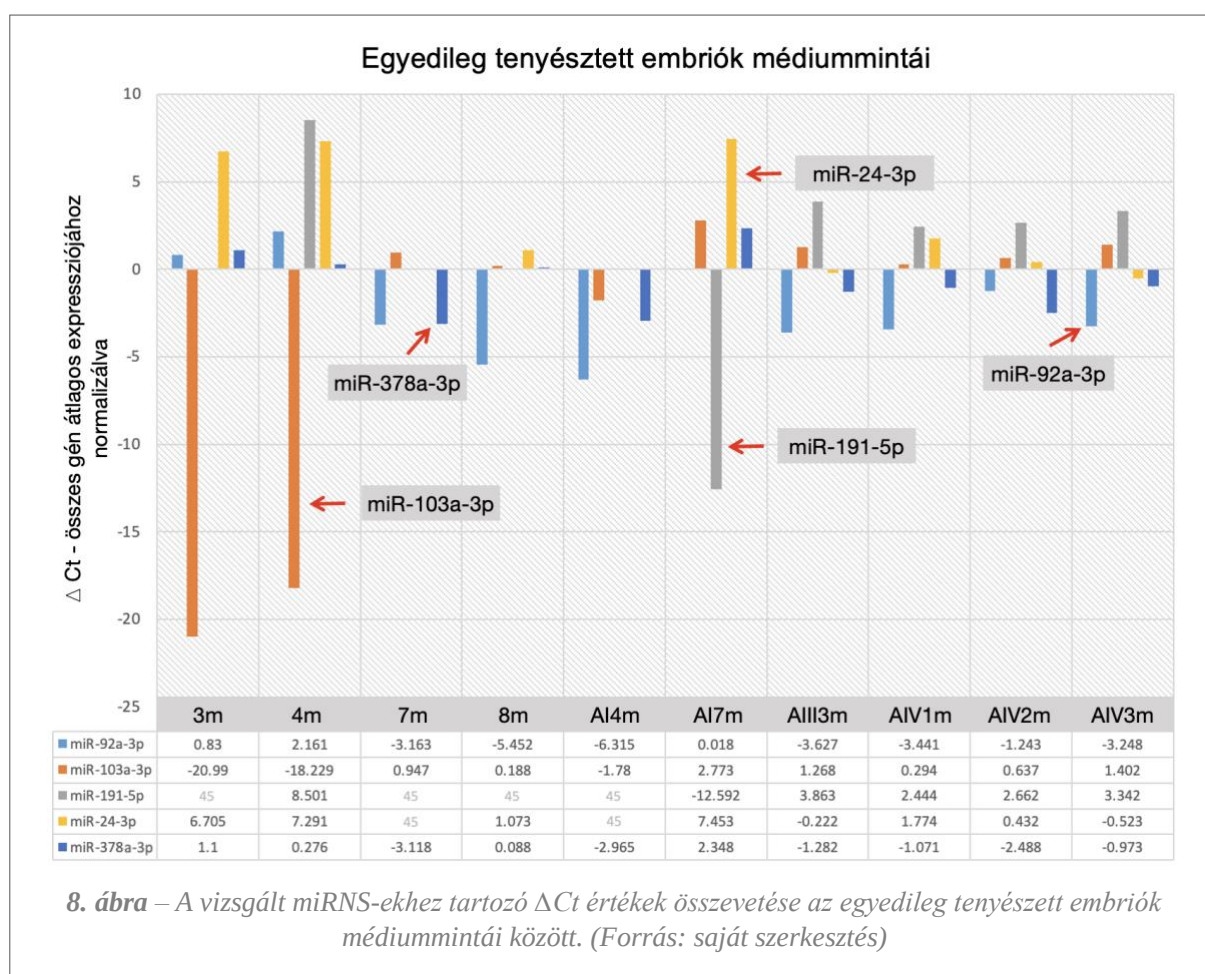
vettük az azonos csoportokba sorolt embriók mikroszkópos képeit, annak érdekében, hogy megfigyeljük, az egy csoportba tartozó embriók valóban hasonlítanak-e egymásra morfológiailag is. Az eredmény alapján azt láttuk, hogy valamennyi 4-napos embrió, valamint a 6-naposok közül a két leggyengébb minőséget mutató embrió egy csoportot alkot [9. ábra]. Ennek oka feltehetően az, hogy a 4-napos embriók alapvetően fejletlenebbek 6-napos társaiknál, s az AI4-es és AI7-es embriók szintén bizonyos fokú fejlődési elmaradást mutatnak a 6-napos korban várható állapothoz képest. Az AIV1-es és AIV2-es embriók is egy csoportba kerültek, különválva a fejletlenebb 6-napos embrióktól, s ezt a megfelelő minőségre és fejlettségre utaló morfológiai tulajdonságaik is megalapozzák [M5. ábra].



9. ábra – A vizsgált miRNS-ek expressziója alapján, az egyedileg tenyésztett embrióminták esetén készített Kohonen önszervező csoportosítás, az embriók egymáshoz méretarányosított mikroszkópos képeivel.
(Forrás: saját felvételek és szerkesztés)

V/4. RELATÍV mikroRNS-EXPRESSZIÓ ÖSSZEHAISONLÍTÁSA EGYEDILEG TENYÉSZTETT EMBRIÓK TENYÉSZTŐMÉDIUM-MINTÁIBAN

A fent elemzett, egyedileg tenyésztett embriók esetében a tenyésztőmédium-mintákon is elvégeztük a leírt analízist. Az eredmények alapján a médiumminták miRNS-expressziója kevésbé egységes a 4- és 6-napos embriócsoportokra nézve – valamennyi miRNS esetében látunk jelentős mértékben eltérő kifejeződési szinteket egyes minták között [10. ábra].



A miR-92a-3p alapján a médiumminták adatai a 3-as, 4-es és AI7-es embriók esetén szintén tükrözik az előbbieken feltételezett gyenge embrióminőséget: míg a legtöbb embrió tenyésztőmédiumában látható a miR-92a-3p viszonylag magas expressziós szintje (azok egészséges fejlődésére utalva), addig a két 4-napos embrió (3m és 4m minták) médiumában szembetűnően kisebb mértékben van jelen ($\Delta Ct_{3m} = 0,830$; $\Delta Ct_{4m} = 2,161$) [10. ábra], az AI7-eshez tartozó médiumban pedig meg sem jelenik. Ezt a jelenséget Melo-Baez és mtsai. (2020) azon kísérletének eredményei erősítik meg, melyet tenyésztőmédium-mintákon végeztek. A

3,5. és 5. fejlődési nap között, azaz a kompakció időszakában vizsgálták a fejlődő szarvasmarha embriók által tenyésztőmédiumba szekretált extracelluláris vezikulák miRNS-tartalmát abból a szempontból, hogy az milyen összefüggést mutat az embrióminőséggel és a blasztocisztáváérés sikerességével. Az egészséges és rendellenes fejlődést mutató embriócsoportok között jelentősen eltérő expressziójú miRNS-ek közé tartozott a miR-92a is, melynek kifejeződési szintje szignifikánsan megnövekedett ($P = 0.0323$) szintet mutatott az egészséges, blasztocisztává továbbfejlődni képes embriókhoz tartozó médiumban (Melo-Baez és mtsai., 2020). Ezek az eredmények egybehangzanak McCallie és mtsai. (2010) fent ismertetett, humán embrióminták miRNS-expressziójának vizsgálatakor tett megfigyeléseivel. A két szakirodalmi adat alapján tehát az elemzett három embrió tenyésztőmédiumban mért alacsony (vagy egyáltalán nem detektálható) miR-92a-3p-expresszió megerősíti az embriómintákra vonatkozó adatok elemzésekor feltételezett gyenge fejlettségi állapotot és minőséget, amit a mikroszkópos képeken látható morfológiai tulajdonságok is valamelyest alátámasztanak.

A miR-24-3p szintén ennél a három mintánál mutat igen alacsony expressziós szintet, ezek mellett pedig a 7-es és AI4-es embriók médiumában nem is volt kimutatható a miRNS jelenléte [10. ábra]. Már az embrióminták értékelésekor láttuk, hogy Kropp és Khatib (2015) eredményei nem egyeznek azokkal az adatokkal, melyeket saját kísérletünk során kaptunk, s hasonló ellentmondást tapasztaltunk a médiumminták esetében is: a miR-24-3p alacsony expressziós szintje a szakirodalmi adatok alapján a jó embrióminőséggel hozható kapcsolatba, kísérletünkben azonban éppen a gyengébb minőségű embriók médiumában mértünk alacsonyabb miR-24-3p-expressziót. Az embrió- és médiumminták esetén kapott eredményeink, valamint Kropp és Khatib mérései közti ellentmondást jelen kísérletünk során nem tudtuk egyértelműen magyarázni.

A tenyésztőmédió-minták vizsgálata során kapott eredményeket szemléltető ábrán [10. ábra] a miR-103a-3p esetén is igen látványos kiugrást láthatunk a 3-a és 4-es embrió tenyésztőmédiumban ($\Delta Ct_{3m} = -20,990$; $\Delta Ct_{4m} = -18,229$). Melo-Baez és mtsai. (2020) egészségesen és rendellenesen fejlődő szarvasmarha embriók által tenyésztőmédiumba szekretált extracelluláris vezikulákban is vizsgálták a miR-103 jelenlétét, s megfigyelték, hogy expressziója szignifikánsan ($P = 0.0003$) megnövekedett szintet mutatott a gyenge minőségű embriók médiumában. További vizsgálatok során 14 olyan célgénjét is azonosították a miR-103-nak, melyek a zsírsavanyagcsere-útvonalak szabályozásában vesznek részt, mely folyamat igen fontos szerepet játszik a korai embrionális fejlődésben (Melo-Baez és mtsai., 2020; Xiang és mtsai., 2020). A miR-103 ezen kívül a „gap-junction” típusú, rendkívül szoros

sejtkapcsolatok kialakulásához is köthető, így feltehetőleg hozzájárul a sejtek növekedéséhez, kommunikációjához, differenciációjához, ezeken keresztül pedig a kompaktációhoz és a kavitációhoz (blasztocöl kialakulása) is (Sugimoto és mtsai., 2013). A DGCR8 is célgénje a miR-103-nak, s ahogy azt Wang és mtsai. (2007) tanulmányában láthatjuk, ennek kiütése (illetve miRNS esetében poszt-transzkripcionális gátlása) a preimplantációs egémbrió fejlődésének leállításához vezethet (Wang és mtsai., 2007). Mindezt egybevéve tehát valószínűnek tűnik, hogy a miR-103 tenyésztőmédiüm mintákban mért magas koncentrációja valóban ok-okozati összefüggésben áll a bennük fejlődő embriók gyenge fejlődési képességével (Melo-Baez és mtsai., 2020).

Zhang és mtsai. (2021) emellett nem csak a miR-103a-3p egy másik célgénjét határozták meg, hanem azt is megállapították, hogy tüszőfolyadékban mért expressziója alkalmas lehet az IVF-ET kezelések kimenetelének előrejelzésére a petesejt minőségén keresztül: a vizsgálatok során olyan petesejtekhez tartozó tüszőfolyadék-mintákban figyelték meg a miR-103a-3p szignifikánsan emelkedett szintjét ($P < 0.05$), melyek a megtermékenyítés utáni 3. és 5. napra nem voltak képesek jó minőségű embrió létrehozására (Zhang és mtsai., 2021). A kísérlet eredménye tehát egyezik a Melo-Baez és mtsai. (2020) által megfigyeltekkel: a miR-103 valóban összefüggést mutat az embrió elégtelen fejlődési képességével. Az általunk vizsgált 3-as és 4-es embrió gyenge minőségére tehát a tenyésztőmédiümában is kiugróan magasan expresszáldó miR-103a-3p is utal [10. ábra].

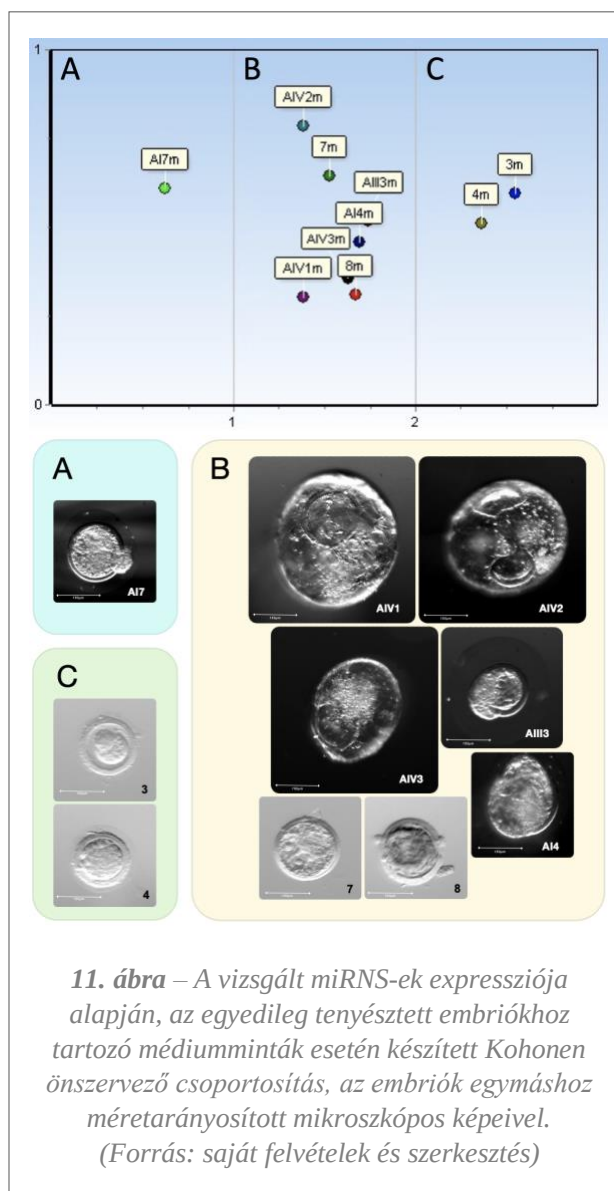
Az AI7-es embrió tenyésztőmédiümában nem csak a miR-24-3p, hanem a miR-191-5p expressziójában is rendellenes kiugrást tapasztaltunk, ez a miRNS azonban a miR-24-3p-vel ellentétben meglehetősen magas koncentrációban van jelen az embrióhoz tartozó médiümában ($\Delta Ct = -12,592$) [10. ábra]. Acuña-González és mtsai. (2021) fent ismertetett eredményei ebben az esetben is megerősítik az AI7-es embrió gyenge minőségével kapcsolatosan tett feltételezéseinket. Ez azonban már kevésbé mondható el a 3-as és 4-es embriókról, ugyanis ezek médiümában a miR-191-5p igen kis mennyiségben található meg, vagy egyáltalán nem is detektálható. Ugyanez a viszonylag alacsony (vagy kimutathatatlan) expresszió igaz egyébként valamennyi vizsgált embrió tenyésztőmédiümára is az AI7-est kivéve, a miR-191-5p expressziós szintje tehát ezek jó minőségéről ad hírt, annak ellenére, hogy a 3-as és 4-es embriók esetén a jó fejlettséget számos más adat cáfolja. Ezt az ellentmondást egyelőre nem tudjuk egyértelműen magyarázni.

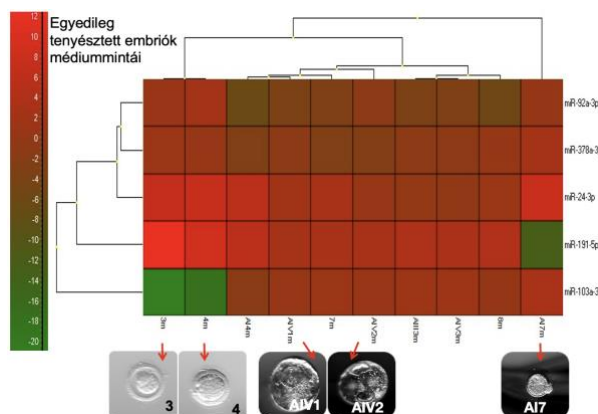
A miR-378a-3p tenyésztőmédiümában mért expresszióját nézve nem tapasztalunk látványos kilengéseket, mintáink közül azonban ezen miRNS esetén is az AI7-es embrióhoz tartozó

médiumban látjuk a legszélsőségesebb kifejeződést. Ez esetben a miRNS szintje szembetűnően alacsony ($\Delta Ct = 2,348$) a többi mintánál mért értékekhez viszonyítva, s az AI7-es minta mellett a 3-as ($\Delta Ct = 1,100$) és 4-es ($\Delta Ct = 0,276$) embriók tenyésztőközegében is viszonylag alacsony szinten expresszál [10. ábra]. Pavani és mtsai (2022) megfigyelései alapján a miR-378a-3p médiumban mért alacsony koncentrációja a gyenge hatching-képességről árulkodhat, valamint jellemezheti azokat az embriókat, melyek valamilyen okból kifolyólag nem képesek a blasztocisztává történő továbbfejlődésre. Ez az eddigi eredményeink többségével, valamint a morfológiai tulajdonságok alapján [M5. ábra] tett megállapításainkkal egybehangzóan szintén megerősíti mindhárom említett embrió esetében a gyenge fejlettségi állapotra és minőségre irányuló feltételezéseinket.

A legfeltűnőbb különbségeket mutató embriók a tenyésztőmédiум-minták esetén mért adatok alapján készített heatmap-en is elkülönülnek [12. ábra]. Jól látható, hogy az AI7-es embrió a vizsgált miRNS-ek médiumban mért expressziója alapján teljesen elválik társaitól, a 3-as és 4-es embriók is egymással szomszédosan helyezkednek el, s utóbbiak közvetlen közelében található a morfológiai bélyegek alapján szintén kevésbé jó fejlődést mutató AI4-es minta is. Érdekes azonban, hogy a mikroszkópos kép alapján gyenge minőségűnek mondható AIII3-as embrió a tenyésztőmédiumban detektált miRNS-ek expressziója alapján is a három legszebben fejlődő embrió (AIV1, AIV2 és AIV3) közelében kapott helyet a heatmap-en.

A Kohonen önszervező csoportosítás esetén [11. ábra] azt látjuk, hogy a legegységelműbben gyenge minőségű embriók többsége (3-as, 4-es és AI7-es embrió) valóban elvált a többi mintától, míg az AI7-est kivéve valamennyi 6-napos





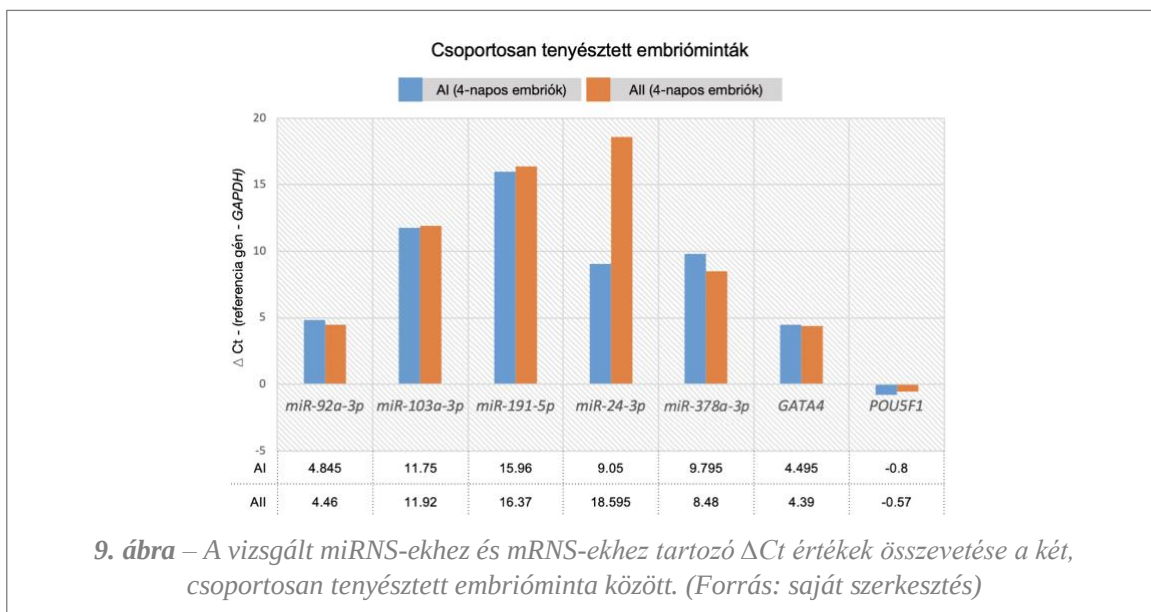
12. ábra – Heatmap az egyedileg tenyésztett embriók médiummintái esetén számolt ΔC_t értékek összevetéséhez. (Forrás: saját szerkesztés)

embrió és a morfológiai tulajdonságok alapján fejlettebbnek mondható 4-napos embriók közös csoportba kerültek. Fontosnak tartom viszont kiemelni, hogy az AIII3-as embrió a tenyésztőmédium-minták esetén mért miRNS-expressziós adatok alapján is a morfológiailag is megfelelő fejlődést mutató embriókkal került egy csoportba, hasonlóan az embrióminták esetén mért adatok alapján történő csoportosításkor, amikor az AIV3-as embrióval alkotott közös csoportot [9. ábra], annak ellenére, hogy az AIII3-as embrió a mikroszkópos felvételek alapján nem tartozik egyértelműen a legjobb minőségű embriók közé.

V/5. RELATÍV EXPRESSZIÓ ÖSSZEHASONLÍTÁSA CSOPORTOSAN TENYÉSZTETT EMBRIÓMINTÁKBAN

A 2. embriómosási körből származó, csoportosan tenyésztett, 4-napos embrióminták (AI-es és AII-es embriócsoportok, ld. M2. táblázat) esetében az öt miRNS mellett a GATA4 és POU5F1 transzkripciós faktorok expresszióját is megvizsgáltuk, háztartási génként a GAPDH-t használva. A ΔC_t értékek összevetésekor azt láttuk, hogy a két pool-ban közel azonos mennyiségben volt jelen a hipoblaszt-specifikus GATA4 és az epiblaszt-specifikus POU5F1 (OCT4) transzkripciós faktor, melyek jelenléte ebben a fejlődési stádiumban az embriók egészséges fejlődéséről ad hírt. Emellett a vizsgált miRNS-ek döntő többsége is igen hasonló expressziós szintet mutatott a két embriócsoport esetében, egyedül a miR-24-3p kifejeződése tért el szembetűnően [13. ábra].

A miRNS-ek közül a legmagasabb szinten mindkét csoportban a miR-92a-3p ($\Delta C_t < 5$) és a miR-378a-3p ($\Delta C_t < 10$) expresszáldott. Melo-Baez és mtsai. (2020), illetve



Pavani és mtsai. (2022) megfigyelése szerint a magas expressziós szint mindkét miRNS esetében a megfelelő embrióminőséggel és egészséges fejlődéssel hozható kapcsolatba. A miR-103a-3p ($\Delta C_t > 10$) és a miR-191-5p ($\Delta C_t > 15$) viszont mindkét embriócsoporthoz viszonylag alacsony expressziót mutat, s ez Melo-Baez és mtsai. (2020) és Zhang és mtsai. (2021) valamint Acuña-González és mtsai. (2021) eredményei alapján szintén megerősíti a két csoportosan tenyésztett embrióminta jó minőségét. Összességében tehát az eredményeink fent említett szakirodalmi adatokkal történő összevetését követően elmondhatjuk, hogy a miR-92a-3p és a miR-378a-3p meglehetősen magas, illetve a miR-103a-3p és a miR-191-5p viszonylag alacsony expressziós szintje, valamint az epiblaszt- és hipoblaszt-specifikus transzkripciós faktorok jelenléte is egyöntetűen a vizsgált embriók megfelelő minőségét, egészséges fejlődését tükrözi mindkét embriócsoporthoz.

Az említett miRNS-eken kívül azonban kaptunk még egy expressziós eredményt, amely teljesen ellentmond az előző megállapításnak. A miR-24-3p ΔC_t értéke az AI-es csoport esetén ($\Delta C_t = 9,050$) csaknem fele az AII-es csoportnál mértnek ($\Delta C_t = 18,595$), ami azt jelenti, hogy az előbbiben a miRNS jelentősen magasabb szinten expresszáldott [13. ábra]. Kropp és Khatib (2015) eredményeit látva felmerülhet a gyanú, hogy kísérletünkben az AI-es embriócsoporthoz legalább egy embriót valamilyen rendellenes fejlődés jellemez. A kapott adataink alapján azonban ilyen megállapítást hozni még igencsak elhamarkodott lenne, tekintve, hogy bármely más miRNS expressziós szintje inkább az embriók egészséges fejlődésére utal. A miR-24 expresszióbeli eltérését tehát két olyan embriócsoporthoz közzük, melyek egyébként minden más vizsgált miRNS-re nézve igen hasonló mintázatot mutatnak, a kísérletünk során kapott eredmények alapján egyelőre nem tudtuk magyarázni.

VI. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A detektálási eljárások tesztelésének eredményei alapján elmondható, hogy miRNS-ek egyetlen embrióból történő izolálására a PicoPure™ RNA Isolation Kit és az RNAqueous™-Micro Total RNA Isolation Kit közül az utóbbi bizonyult alkalmasabbnak, ugyanis az RNAq kit tisztább RNS-izolálásra ad lehetőséget. Emellett azt is megállapítottuk, hogy a tenyésztőmedium-minták esetében az RNS-izolálási lépés kihagyható, közvetlen a médiumból lehetséges a cDNS-írás és RT-qPCR elvégzése. A két ismertetett eredmény [1. táblázat] alapján olyan új, megbízható miRNS-detektálási protokollt dolgoztunk ki, mely reményeink szerint akár a humán IVF embriók minőségének vizsgálatakor is megkönnyítheti a fejlődésspecifikus miRNS-ek kinyerését a tenyésztőmediumból.

Az előzetes tesztek során azt láttuk, hogy nem minden általunk választott humán (hsa-) miRNS jelenléte detektálható nyúlembrió mintákban [6. ábra]. A pluripotencia fenntartásában igen fontos szerepet játszó miR-371a-5p-t nagy valószínűséggel a hsa- és ocu-miRNS szekvenciabeli eltérése miatt nem tudtuk kimutatni [2. táblázat]. Ezért a továbbiakban szükség lehet az általunk kidolgozott módszerek alkalmazásával egy új kísérlet elvégzésére, mely során az nyúl-specifikus ocu-miR-371a-5p primer használatával is megkíséréljük a miRNS kimutatását, ezzel megerősítve, hogy valóban az ocu- és hsa-miRNS közötti, egyetlen bázisnyi eltérés lehetetlenítette el a miR-371a-5p nyúlembrió-mintákban történő detektálását.

Az egyedileg tenyésztett embrióminták esetén mért expressziós szintek értelmezése után összességében azt látjuk, hogy egyelőre kevés adattal rendelkezünk az embriók életképességének megbízható megállapításához. Az is elmondható, hogy az embriók esetén fontos lenne további embrió-specifikus miRNS-ek expressziójára irányuló vizsgálatok elvégzése is az általunk választott miRNS-ek mellett, az embrióminőség pontosabb meghatározása céljából. Ehhez segítségünkre lehet a csoportunk által kapott SOLiD-szekvenálási adatok áttekintése is.

Az egyedileg tenyésztett embriókhoz tartozó médiumminták eredményét látva elmondható, hogy habár több minta esetében láttunk olyan miRNS-expressziót, amire magyarázatot egyelőre nem tudunk adni, a médiumminták mégis alkalmasabbnak tűnnek az embriók valós minőségének és életképességének megítélésére, ugyanis ebben az esetben az általunk vizsgált öt miRNS alapján már megbízhatóbban elkülöníthetők a morfológiai tulajdonságok alapján

valóban gyenge minőségűnek mondható embriók [12. ábra]. Az esetükben mért miRNS-expressziós szintekből feltehetőleg következtetni lehetne arra is, hogy ezek a preimplantációs embriók a továbbiakban hogyan fognak továbbfejlődni, s milyen eséllyel ágyazódnak majd be a terhesség során. Ennek megerősítéséhez érdemes lenne olyan kísérleteket is végezni, melyek során a tenyésztőmédiumok ismertetett módszerekkel történő vizsgálatát követően az *in vitro* tenyésztett embriókat a beágyazódási kor közeledtével recipiens anyákba ültetjük vissza, s megfigyeljük a beágyazódás és a vemhesség kialakulásának esélyét, illetve az utódok életképességét, mely eredményeket ezt követően összevethetjük a tenyésztőmédiumban mért miRNS-expressziós szintekkel.

Habár az öt általunk vizsgált miRNS csoportja már mérsékelt megbízhatósággal lehetővé tette az embriók minőség alapján történő, aránylag megbízható csoportosítását [12. ábra], mégis célszerű lenne olyan újabb kísérletsorozatok tervezése, melyek során a mintáinkban egyrészt új, az embrióminőség potenciális biomarkereiként számon tartott miRNS-eket igyekszünk detektálni, ezt követően pedig a lehető legtöbb alkalmasnak tűnő miRNS-primer használatával részletesebb képet igyekszünk alkotni az adott minták miRNS-profiljairól. Továbbá érdemes lehet adott fejlődésspecifikus miRNS-ek detektálása mellett azok néhány ismert cél-mRNS-ének expresszióját is megvizsgálni, mely adatok segítségével reményeink szerint olyan ellentmondásos jelenségekre is magyarázatot kaphatunk, mint például az egyedi embrióminták esetében a Kropp és Khatib (2015) eredményeivel ütköző, valamint a két, hasonló miRNS-mintázatot mutató, csoportosan tenyésztett embriómintánál mért igen eltérő miR-24-3p-expresszió, illetve a gyengébb minőségű embriók tenyésztőmédiumának meglehetősen alacsony miR-191-5p-tartalma, mely szintén ellentmond Acuña-González és mtsai. (2021) megfigyeléseinek.

Eredményeink elemzése során felfigyeltünk arra is, hogy az AIII3-as embrió mind az embrióminták, mind a tenyésztőmédium-minták esetén kapott expressziós mintázat alapján a jó minőségű embriók körébe tartozott [9. és 12. ábra], függetlenül attól, hogy mikroszkópos képe ennek ellenkezőjéről árulkodik [M5/B. ábra]. Tudjuk azonban, hogy a morfológiai bélyegek alapján történő embrióminőség-értékelés – habár az egyik legegyszerűbb módja az életképesebbnek tűnő embriók kiválasztásának, – mégsem minden esetben megbízható módszer. Emiatt felmerülhet az igény arra is, hogy az *in vitro* tenyésztés során valamennyi embrió fejlődése time-lapse felvételek segítségével legyen részletesen nyomon követhető és visszamenőleg értékelhető.

VII. ÖSSZEFOGLALÁS

A miRNS-ek olyan rövid, nemkódoló RNS-molekulák, melyek poszt-transzkripcionális génexpresszió-szabályozás és géncsendesítés útján számos kulcsfontosságú biológiai folyamat irányítására képesek. Nyúlembriókon végzett kísérleteink során olyan újkeletű miRNS-detektálási protokollt dolgoztunk ki, mely mind az embrióminták, mind az azokhoz tartozó tenyésztőmedium-minták esetében alkalmas az igen kis mennyiségben jelen lévő miRNS-ek detektálására. Ehhez első körben két RNS-izoláló kit hatékonyságát vetettük össze, s a teszt eredményei alapján az RNAqueous™-Micro Total RNA Isolation Kit-et értékeltük alkalmasabbnak olyan tiszta RNS-izolátumok lizált embriómintákból történő előállítására, melyekből a cDNS-írasi és az RT-qPCR lépéseket követően értékelhető miRNS-expressziós adatokhoz juthatunk. A megfelelő kit használata mellett pedig az is fontos része volt az új protokoll kidolgozásának, hogy a tenyésztőmedium-minták esetén az RNS-izolálás lépését kihagytuk, ilyen módon ugyanis a folyamat végén nagyobb mennyiségben jutottunk hozzá a vizsgálandó miRNS-ekhez.

A kísérletsorozat másik fő részeként hét fejlődésspecifikus miRNS (hsa-miR-24-3p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-191-5p, mmu-miR-302b-3p, hsa-miR-371a-5p és hsa-miR-378a-3p) expresszióját vizsgáltuk meg egyedileg, illetve csoportosan tenyésztett 4- és 6-napos nyúlembriókban, valamint azok tenyésztőmediumában. Mivel az előzetes tesztek során a miR-302b-3p és a miR-371a-5p miRNS-eket nem tudtuk detektálni nyúlból származó mintákban, a további méréseket már csak a másik öt miRNS-re nézve végeztük el.

Az RT-qPCR során kapott expressziós adatok elemzésekor összevetettük a miRNS-mintázatokat az egyedi embrió- és médiumminták (valamint a csoportosan tenyésztett embriók) körében, s arra a következtetésre jutottunk, hogy míg az embriókból izolált miRNS-ek expressziós szintjei a 4- és 6-napos embriók között jelentős eltéréseket mutattak, s ezek egyes minták esetében az embriók morfológiai tulajdonságaival is párhuzamba hozhatók voltak, mégis az embriók fejlettség és minőség szerinti pontosabb osztályozásához szükségünk lenne az általunk vizsgált öt miRNS-en kívül más miRNS-szintek elemzésére is. A médiumminták esetében a miRNS-expressziók alapján a 4- és 6-napos embriók kevésbé voltak elkülöníthetők egymástól, s a kifejeződési mintázatok több esetben is ütköztek az adott médiummintákhoz tartozó embriók mikroszkópos képén látható fejlődési állapottal, az itt mért

adatok azonban valamivel nagyobb megbízhatósággal tették lehetővé a morfológiai tulajdonságok alapján valóban gyenge minőségűnek mondható embriók különválasztását. Az általunk vizsgált öt miRNS együttese tehát (néhány másik fejlődésspecifikus miRNS-sel kiegészítve) jó eséllyel lehet alkalmazható a tenyésztőmédium miRNS-profilja alapján történő embrióminőség-meghatározásra.

Reményeink szerint az általunk kifejlesztett, új miRNS-detektálási eljárás, valamint a vizsgált öt miRNS-ből álló biomarker-együttes végső soron a humán asszisztált reprodukciós eljárások során is elősegítheti az IVF embriók minőségének és életképességének noninvazív megítélését a fejlődésspecifikus miRNS-ek expressziójának tenyésztőmédiumban történő meghatározása, majd értékelése útján.

IRODALOMJEGYZÉK

- Acuña-González, R. J., Olvera-Valencia, M., López-Canales, J. S., Lozano-Cuenca, J., Osorio-Caballero, M., & Flores-Herrera, H. (2021). MiR-191-5p is upregulated in culture media of implanted human embryo on day fifth of development. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 19(1), 109. <https://doi.org/10.1186/s12958-021-00786-1>
- Barroso-delJesus, A., Romero-López, C., Lucena-Aguilar, G., Melen, G. J., Sanchez, L., Ligeró, G., Berzal-Herranz, A., & Menendez, P. (2008). Embryonic stem cell-specific miR302-367 cluster: Human gene structure and functional characterization of its core promoter. *Molecular and Cellular Biology*, 28(21), 6609–6619. <https://doi.org/10.1128/MCB.00398-08>
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, 136(2), 215–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>
- Baskerville, S., & Bartel, D. P. (2005). Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA*, 11(3), 241–247. <https://doi.org/10.1261/rna.7240905>
- Berezikov, E., Chung, W.-J., Willis, J., Cuppen, E., & Lai, E. C. (2007). Mammalian Mirtron Genes. *Molecular Cell*, 28(2), 328–336. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.09.028>
- Card, D. A. G., Hebbar, P. B., Li, L., Trotter, K. W., Komatsu, Y., Mishina, Y., & Archer, T. K. (2008). Oct4/Sox2-regulated miR-302 targets cyclin D1 in human embryonic stem cells. *Molecular and Cellular Biology*, 28(20), 6426–6438. <https://doi.org/10.1128/MCB.00359-08>
- Catalanotto, C., Cogoni, C., & Zardo, G. (2016). MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10), 1712. <https://doi.org/10.3390/ijms17101712>
- Chen, C., Ridzon, D., Lee, C.-T., Blake, J., Sun, Y., & Strauss, W. M. (2007). Defining embryonic stem cell identity using differentiation-related microRNAs and their potential targets. *Mammalian Genome*, 18(5), 316–327. <https://doi.org/10.1007/s00335-007-9032-6>
- Denker, H.-W., & Gerdes, H.-J. (1979). The dynamic structure of rabbit blastocyst coverings. *Anatomy and Embryology*, 157(1), 15–34. <https://doi.org/10.1007/BF00315639>
- Esfandyari, S., Elkafas, H., Chugh, R. M., Park, H., Navarro, A., & Al-Hendy, A. (2021). Exosomes as Biomarkers for Female Reproductive Diseases Diagnosis and Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 2165. <https://doi.org/10.3390/ijms22042165>
- Fischer, B., Chavatte-Palmer, P., Viebahn, C., Navarrete Santos, A., & Duranthon, V. (2012). Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction (Cambridge, England)*, 144, 1–10. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0091>
- Fischer, B., Mootz, U., Denker, H.-W., Lambertz, M., & Beier, H. M. (1991). The dynamic structure of rabbit blastocyst coverings. *Anatomy and Embryology*, 183(1), 17–27. <https://doi.org/10.1007/BF00185831>
- Fischer, B., Winterhager, E., & Busch, L. C. (1986). Transformation of endometrium and fertility in late stages of pseudopregnancy in the rabbit. *Reproduction*, 78(2), 529–540. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0780529>
- Graur, D., Duret, L., & Gouy, M. (1996). Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares and allies). *Nature*, 379(6563), Article 6563. <https://doi.org/10.1038/379333a0>

- Guo, L., Zhao, Y., Zhang, H., Yang, S., & Chen, F. (2014). Integrated evolutionary analysis of human miRNA gene clusters and families implicates evolutionary relationships. *Gene*, 534(1), 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.10.037>
- Hammond, S. M. (2015). An overview of microRNAs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 87, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.05.001>
- Harper, M. J. K. (1961). THE TIME OF OVULATION IN THE RABBIT FOLLOWING THE INJECTION OF LUTEINIZING HORMONE. *Journal of Endocrinology*, 22(2), 147–152. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0220147>
- Houbaviy, H. B., Murray, M. F., & Sharp, P. A. (2003). Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Developmental Cell*, 5(2), 351–358. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(03\)00227-2](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00227-2)
- Idkowiak, J., Weisheit, G., & Viebahn, C. (2004). Polarity in the rabbit embryo. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 15(5), 607–617. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2004.04.007>
- Jo, M. H., Shin, S., Jung, S.-R., Kim, E., Song, J.-J., & Hohng, S. (2015). Human Argonaute 2 Has Diverse Reaction Pathways on Target RNAs. *Molecular Cell*, 59(1), 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.04.027>
- Jouneau, A., Ciaudo, C., Sismeiro, O., Brochard, V., Jouneau, L., Vandormael-Pournin, S., Coppée, J.-Y., Zhou, Q., Heard, E., Antoniewski, C., & Cohen-Tannoudji, M. (2011). Naive and primed murine pluripotent stem cells have distinct miRNA expression profiles. *RNA*. <https://doi.org/10.1261/rna.028878.111>
- Kamijo, S., Hamatani, T., Sasaki, H., Suzuki, H., Abe, A., Inoue, O., Iwai, M., Ogawa, S., Odawara, K., Tanaka, K., Mikashima, M., Suzuki, M., Miyado, K., Matoba, R., Odawara, Y., & Tanaka, M. (2022). MicroRNAs secreted by human preimplantation embryos and IVF outcome. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 20(1), 130. <https://doi.org/10.1186/s12958-022-00989-0>
- Kim, Y.-K., & Kim, V. N. (2007). Processing of intronic microRNAs. *The EMBO Journal*, 26(3), 775–783. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601512>
- Kropp, J., & Khatib, H. (2015). Characterization of microRNA in bovine in vitro culture media associated with embryo quality and development. *Journal of Dairy Science*, 98(9), 6552–6563. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9510>
- Maraghechi, P., Aponte, M. T. S., Ecker, A., Lázár, B., Tóth, R., Szabadi, N. T., & Gócza, E. (2023). Pluripotency-Associated microRNAs in Early Vertebrate Embryos and Stem Cells. *Genes*, 14(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/genes14071434>
- Maraghechi, P., Hiripi, L., Tóth, G., Bontovics, B., Bősze, Z., & Gócza, E. (2013). Discovery of pluripotency-associated microRNAs in rabbit preimplantation embryos and embryonic stem-like cells. *Reproduction (Cambridge, England)*, 145(4), 421–437. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0259>
- Marson, A., Levine, S. S., Cole, M. F., Frampton, G. M., Brambrink, T., Johnstone, S., Guenther, M. G., Johnston, W. K., Wernig, M., Newman, J., Calabrese, J. M., Dennis, L. M., Volkert, T. L., Gupta, S., Love, J., Hannett, N., Sharp, P. A., Bartel, D. P., Jaenisch, R., & Young, R. A. (2008). Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell*, 134(3), 521–533. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.020>
- McCallie, B., Schoolcraft, W. B., & Katz-Jaffe, M. G. (2010). Aberration of blastocyst microRNA expression is associated with human infertility. *Fertility and Sterility*, 93(7), 2374–2382. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.01.069>

- Mellisho, E. A., Velásquez, A. E., Nuñez, M. J., Cabezas, J. G., Cueto, J. A., Fader, C., Castro, F. O., & Rodríguez-Álvarez, L. (2017). Identification and characteristics of extracellular vesicles from bovine blastocysts produced in vitro. *PLOS ONE*, 12(5), e0178306. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178306>
- Melo-Baez, B., Wong, Y. S., Aguilera, C. J., Cabezas, J., Mançanares, A. C. F., Riadi, G., Castro, F. O., & Rodríguez-Alvarez, L. (2020). MicroRNAs from Extracellular Vesicles Secreted by Bovine Embryos as Early Biomarkers of Developmental Competence. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 8888. <https://doi.org/10.3390/ijms21238888>
- Murakami, H., & Imai, H. (1996). Successful implantation of in vitro cultured rabbit embryos after uterine transfer: A role for mucin. *Molecular Reproduction and Development*, 43(2), 167–170. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199602\)43:2<167::AID-MRD5>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199602)43:2<167::AID-MRD5>3.0.CO;2-P)
- Navarrete Santos, A., Ramin, N., Tonack, S., & Fischer, B. (2008). Cell Lineage-Specific Signaling of Insulin and Insulin-Like Growth Factor I in Rabbit Blastocysts. *Endocrinology*, 149(2), 515–524. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0821>
- Nichols, J., & Smith, A. (2009). Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell*, 4(6), 487–492. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.015>
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology*, 9. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2018.00402>
- O'Toole, A. S., Miller, S., Haines, N., Zink, M. C., & Serra, M. J. (2006). Comprehensive thermodynamic analysis of 3' double-nucleotide overhangs neighboring Watson–Crick terminal base pairs. *Nucleic Acids Research*, 34(11), 3338–3344. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl428>
- Pavani, K. C., Meese, T., Pascottini, O. B., Guan, X., Lin, X., Peelman, L., Hamacher, J., Van Nieuwerburgh, F., Deforce, D., Boel, A., Heindryckx, B., Tilleman, K., Van Soom, A., Gadella, B. M., Hendrix, A., & Smits, K. (2022). Hatching is modulated by microRNA-378a-3p derived from extracellular vesicles secreted by blastocysts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(12), e2122708119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2122708119>
- Pendzialek, S. M., Knelangen, J. M., Schindler, M., Gürke, J., Grybel, K. J., Gocza, E., Fischer, B., & Navarrete Santos, A. (2019). Trophoblastic microRNAs are downregulated in a diabetic pregnancy through an inhibition of Drosha. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 480, 167–179. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.11.002>
- Rayner, K. J., & Hennessy, E. J. (2013). Extracellular communication via microRNA: Lipid particles have a new message. *Journal of Lipid Research*, 54(5), 1174–1181. <https://doi.org/10.1194/jlr.R034991>
- Rosenbluth, E. M., Shelton, D. N., Wells, L. M., Sparks, A. E. T., & Van Voorhis, B. J. (2014). Human embryos secrete microRNAs into culture media—A potential biomarker for implantation. *Fertility and Sterility*, 101(5), 1493–1500. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.01.058>
- Saadeldin, I. M., Oh, H. J., & Lee, B. C. (2015). Embryonic–maternal cross-talk via exosomes: Potential implications. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, 8, 103–107. <https://doi.org/10.2147/SCCAA.S84991>
- Seitz, H., Royo, H., Bortolin, M.-L., Lin, S.-P., Ferguson-Smith, A. C., & Cavaillé, J. (2004). A Large Imprinted microRNA Gene Cluster at the Mouse Dlk1-Gtl2 Domain. *Genome Research*, 14(9), 1741–1748. <https://doi.org/10.1101/gr.2743304>

- Sugimoto, M., Sasaki, S., Gotoh, Y., Nakamura, Y., Aoyagi, Y., Kawahara, T., & Sugimoto, Y. (2013). Genetic variants related to gap junctions and hormone secretion influence conception rates in cows. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(48), 19495–19500. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309307110>
- Suh, M.-R., Lee, Y., Kim, J. Y., Kim, S.-K., Moon, S.-H., Lee, J. Y., Cha, K.-Y., Chung, H. M., Yoon, H. S., Moon, S. Y., Kim, V. N., & Kim, K.-S. (2004). Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Developmental Biology*, 270(2), 488–498. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.02.019>
- Théry, C., Ostrowski, M., & Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 9(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/nri2567>
- Tscheudschilsuren, G., Küchenhoff, A., Klonisch, T., Tetens, F., & Fischer, B. (1999). Induction of Arylhydrocarbon Receptor Expression in Embryoblast Cells of Rabbit Preimplantation Blastocysts upon Degeneration of Rauber's Polar Trophoblast. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 157(2), 125–133. <https://doi.org/10.1006/taap.1999.8667>
- Urbanelli, L., Magini, A., Buratta, S., Brozzi, A., Sagini, K., Polchi, A., Tancini, B., & Emiliani, C. (2013). Signaling Pathways in Exosomes Biogenesis, Secretion and Fate. *Genes*, 4(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/genes4020152>
- Wang, Y., Medvid, R., Melton, C., Jaenisch, R., & Blelloch, R. (2007). DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nature Genetics*, 39(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/ng1969>
- Weber, J. A., Baxter, D. H., Zhang, S., Huang, D. Y., How Huang, K., Jen Lee, M., Galas, D. J., & Wang, K. (2010). The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clinical Chemistry*, 56(11), 1733–1741. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147405>
- Williams, B. S., & Biggers, J. D. (1990). Polar trophoblast (Rauber's layer) of the rabbit blastocyst. *The Anatomical Record*, 227(2), 211–222. <https://doi.org/10.1002/ar.1092270210>
- Xiang, J., Xing, Y., Long, C., Hou, D., Liu, F., Zhang, Y., Lu, Z., Wang, J., Zuo, Y., & Li, X. (2020). Fatty acid metabolism as an indicator for the maternal-to-zygotic transition in porcine IVF embryos revealed by RNA sequencing. *Theriogenology*, 151, 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.015>
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R.-M., Andreu, Z., Bedina Zavec, A., Borràs, F. E., Buzas, E. I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Ghobrial, I. M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., ... De Wever, O. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(1), 27066. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>
- Yang, D., Xu, J., & Chen, Y. E. (2019). Generation of Rabbit Models by Gene Editing Nucleases. In C. Liu & Y. Du (Szerk.), *Microinjection: Methods and Protocols* (o. 327–345). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8831-0_19
- Yang, J.-S., & Lai, E. C. (2010). Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis in vertebrates. *Cell Cycle*, 9(22), 4455–4460. <https://doi.org/10.4161/cc.9.22.13958>
- Zhang, Q., Su, J., Kong, W., Fang, Z., Li, Y., Huang, Z., Wen, J., & Wang, Y. (2021). Roles of miR-10a-5p and miR-103a-3p, Regulators of BDNF Expression in Follicular Fluid, in the Outcomes of IVF-ET. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 637384. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.637384>
- Zovoilis, A., Smorag, L., Pantazi, A., & Engel, W. (2009). Members of the miR-290 cluster modulate in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, 78(2–3), 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2009.06.003>

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

AGO2	Argonaute RISC catalytic component 2	ICSI	Intracytoplasmic sperm injection
BAX	Bcl-2 associated X-protein	IGF2BP1	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1
BCL-2	B-cell leukemia / lymphoma 2	IGF2R	Insulin-like growth factor 2 receptor
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor	IVF (IVF-ET)	<i>In vitro</i> fertilization (and embryo transfer)
CDKN1b	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	LH	Luteinizing hormone
cDNS	Complementary DNA	miRNS	mikroRNS
DGCR8	DiGeorge critical region-8	mRNS	messenger (hírvivő) RNS
ESC	Embryonic stem cell (embrionális őssejt)	OCT4 (<i>POU5F1</i>)	Octamer-binding transcription factor 4 (POU Class 5 Homeobox 1)
FBS	Fetal bovine serum	DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	PCOS	Polycystic ovary syndrome
GATA4	GATA-binding protein 4	(mi)RISC	(micro)RNA-induced silencing complex
hCG	Human chorion-gonadotropin	RT-qPCR	Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction
ICM	Inner cell mass (belső sejttömeg)	SOX2	Sex determining region Y-box 2

TÁBLÁZATOK ÉS ÁBRÁK JEGYZÉKE

A dolgozatban szereplő ábrák:

1. ábra – Az embriómosás folyamata.	14
2. ábra – A kísérletsorozat lépéseit összefoglaló sematikus folyamatábra.	16
3. ábra – Csoportosan tenyésztett 4-napos nyúlembriók mikroszkópos képei.	17
4. ábra – Az RT-qPCR program paraméterei.	20
5. ábra – A detektálási eljárásokat (RNS-izolálás szükségessége) és a G-TL™ médium miRNS-mentességét tesztelő mérések eredményei (a miR-92a-3p esetén kapott Ct értékek összehasonlítása).	24
6. ábra – A hét miRNS-primer tesztelésének eredményei.	25
7. ábra – A vizsgált miRNS-ekhez tartozó Δ Ct értékek összevetése az egyedileg tenyésztett embrióminták között.	26
8. ábra – Heatmap az egyedileg tenyésztett embrióminták esetén számolt Δ Ct értékek összevetéséhez.	30
9. ábra – A vizsgált miRNS-ek expressziója alapján, az egyedileg tenyésztett embrióminták esetén készített Kohonen önszervező csoportosítás, az embriók egymáshoz méretarányosított mikroszkópos képeivel.	30
10. ábra – A vizsgált miRNS-ekhez tartozó Δ Ct értékek összevetése az egyedileg tenyésztett embriók médiummintái között.	31
11. ábra – A vizsgált miRNS-ek expressziója alapján, az egyedileg tenyésztett embriókhoz tartozó médiumminták esetén készített Kohonen önszervező csoportosítás, az embriók egymáshoz méretarányosított mikroszkópos képeivel.	34
12. ábra – Heatmap az egyedileg tenyésztett embriók médiummintái esetén számolt Δ Ct értékek összevetéséhez.	35
13. ábra – A vizsgált miRNS-ekhez és mRNS-ekhez tartozó Δ Ct értékek összevetése a két, csoportosan tenyésztett embrióminta között.	36

A dolgozatban szereplő táblázatok:

1. táblázat – Az RNS-izoláló kit-ek hatékonyságának összehasonlítása.	23
2. táblázat – A hsa-miR-371a-5p és ocu-miR-371a-5p szekvenciája közti, egyetlen bázisnyi különbség.	25

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Gócza Elennek és Tokodyné Szabadi Nikolettnek az irántam tanúsított türelmükért, odaadó segítőkészségükért és szakmai ismereteik továbbadásáért.

Köszönetet szeretnék mondani emellett az Állatbiotechnológia Tanszék munkatársainak, különösen Dr. Bodrogi Lillának és Urbán Martinnak a nyúlembriók kimosása és tenyésztése során nyújtott segítségükért.

Ezzel együtt hálás köszönettel tartozom Családomnak azért a végtelen türelemért és támogatásért, mellyel napról napra segítették előrehaladásomat a pályamunkám készítése során.

A kutatásaim megvalósítását az *Agrár-biotechnológia és precíziós nemesítés az élelmiszerbiztonságért* című, RRF-2.3.1-21-2022-00007-es azonosító számú pályázat segítette.

MELLÉKLETEK

M1. táblázat – Az embriómosáshoz és -tenyésztéshez felhasznált anyagok és eszközök gyártója és katalógusszáma.

Anyag megnevezése	Gyártó	Katalógusszám / azonosító
G-TL™ humán tenyésztőmédium	Vitrolife	10145
DPBS	Gibco	14190144
Hőkezelt FBS	Gibco	10500-064 (LoT: 07Q2130K)
Penicillin- Streptomycin elegy	Gibco	15140122
Millipore Express PLUS membrán (0,22 µm)	Merck Millipore	GPWP01300
Steril ásványi olaj	Sigma-Aldrich	M5310

M2. táblázat – A kísérleteink során felhasznált, csoportosan és egyedileg tenyésztett embriók.

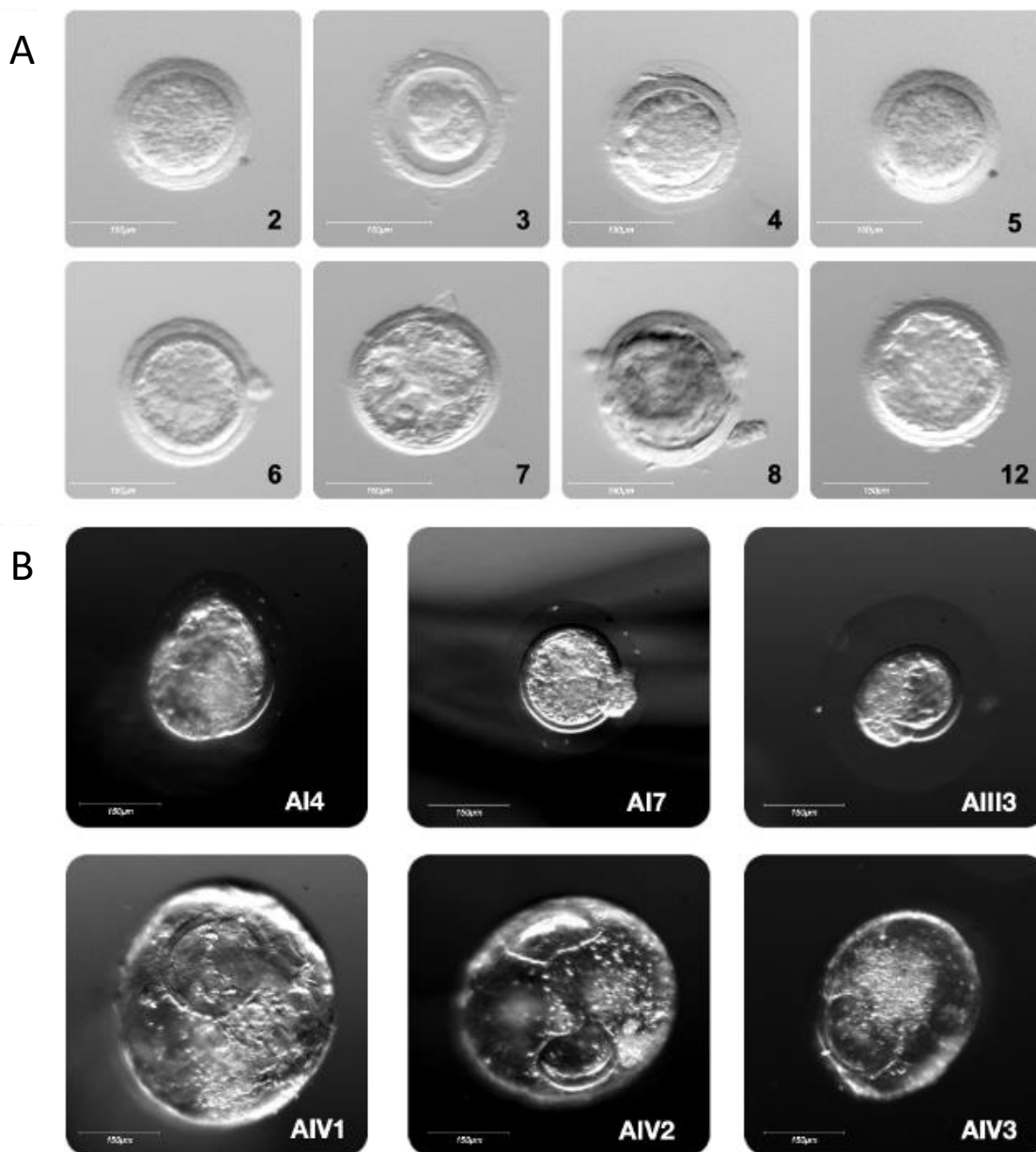
	Csoportosan tenyésztett embriók (5-5 embrió/médiumcsepp)	Egyedileg tenyésztett embriók
1. Embriómosás	E1-1, E2-9, E7-10, E8-11 (4-napos embriók)	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12 (4-napos embriók)
2. Embriómosás	AI(1, 2, 3, 4, 5), AII(1, 2, 3, 4, 5) (4-napos embriók)	AI4, AI7, AII6, AII7, AIII1, AIII2, AIII3, AIV1, AIV2, AIV3 (6-napos embriók)

M3. táblázat – Az RT-qPCR reakcióelegy összetétele miRNS-primerenként (10% ráhagyással).

Komponens	Mennyiség (primerenként)
TaqMan™ Fast Advanced Master mix	10 µL
TaqMan™ Advanced miRNA Assay	1 µL
RNáz-mentes víz	4 µL
Teljes reakcióelegy	15 µL

M4. táblázat – Az embriómosások során kapott, és ebből a kísérletben felhasználásra kerülő embriók számának összefoglalása.

	ÖSSZESEN	1. Embriómosás	2. Embriómosás
Donor nyulak száma	8	4	4
Kimosott embriók száma	61	30	31
Jó minőségű embriók száma	52	28	24
Vizsgált blasztociszták száma	47	28	20



M5. ábra – Egyes vizsgált nyúlembriók mintavétel előtt készült fénymikroszkopos képei (csoportonként méretarányosítva): egyedileg tenyésztett 4-napos (A) és 6-napos (B) nyúlembriók.

M6/A. táblázat – A Poly(A) reakcióelegy összetétele (10% ráhagyással).

„A” Komponens	Mennyiség (1 minta esetén)
Poly(A) puffer	0,5 µL
ATP	0,5 µL
Poly(A) enzim	0,3 µL
RNáz-mentes víz	1,7 µL
Teljes reakcióelegy	3 µL

M6/B. táblázat – Az adapter ligáláshoz használt reakcióelegy összetétele (10% ráhagyással.)

„B” Komponens	Mennyiség (1 minta esetén)
DNS-ligáz puffer	3 µL
50% PEG [8000]	4,5 µL
ligációs adapter	0,6 µL
RNS ligáz enzim	1,5 µL
RNáz-mentes víz	0,4 µL
Teljes reakcióelegy	10 µL

M6/C. táblázat – A reverz transzkripció reakcióelegy összetétele (10% ráhagyással).

„C” Komponens	Mennyiség (1 minta esetén)
RT puffer	6 µL
dNTP (25-25 mM)	1,2 µL
Univerzális RT primer	1,5 µL
10X RT-enzim mix	3 µL
RNáz-mentes víz	3,3 µL
Teljes reakcióelegy	15 µL

M6/D. táblázat – A miRNS-amplifikációs reakcióelegy összetétele (10% ráhagyással).

„D” Komponens	Mennyiség (1 minta esetén)
miR-Amp Master mix	25 µL
miR-Amp primer mix	2,5 µL
RNáz-mentes víz	17,5 µL
Teljes reakcióelegy	45 µL

M7. táblázat – A vizsgált miRNS-ekhez és mRNS-ekhez tartozó TaqMan Advance-próbák adatai.

miRNS / mRNS primer megnevezése	Szekvencia	Katalógusszám
hsa-miR-24-3p	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	47932_mir
hsa-miR-92a-3p	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU	477827_mir
hsa-miR-103a-3p	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	478253_mir
hsa-miR-191-5p	CAACGGAAUCCCAAAAGCAGCUG	477952_mir
mmu-miR-302b-3p	UAAGUGCUUCCAUGUUUUAGUAG	481677_mir
hsa-miR-371a-5p	ACUCAAACUGUGGGGGGCACU	478851_mir
hsa-miR-378a-3p	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGGC	478349_mir
GAPDH	-	Oc 03823402_g1
GATA4	-	Oc 04096744_m4
POU5F1-FAM	-	Oc 03399222_m1