

**SZENT ISTVÁN EGYETEM  
MEZŐGAZDASÁG- ÉS KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR  
ÁLLATTENYÉSZTÉS TUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA**

**EMBRIONÁLIS EREDETŰ ÓSSEJT-VONALAK  
ALKALMAZÁSA IN VITRO MODELLRENDSZERKÉNT A  
SEJTEK DIFFERENCIÁLÓDÁSA SORÁN LEJÁTSZÓDÓ  
FOLYAMATOK MECHANIZMUSAINAK  
TANULMÁNYOZÁSÁRA**

**DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS**

**LICHNER ZSUZSANNA**

**GÖDÖLLŐ  
2011**

## **A doktori iskola**

**megnevezése:** Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

**tudományága:** Állattenyésztés-tudomány

**vezetője:** Dr. Mézes Miklós  
egyetemi tanár, MTA doktora, akadémikus  
Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar  
Állattudományi Alapok Intézet, Takarmányozástani Tanszék

**témavezető:** Dr. Gócza Elen  
tudományos munkatárs, PhD, habil  
Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont  
Genetikai Módosítás Program Csoport

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

**TARTALOMJEGYZÉK**

<b>GYAKORIBB RÖVIDÍTÉSEK</b> .....	<b>3</b>
<b>1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK</b> .....	<b>5</b>
<b>2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b> .....	<b>7</b>
<b>2.1 Embrionális őssejtek</b> .....	<b>7</b>
2.1.1 A pluripotencia fogalma.....	7
2.1.2 A humán embrionális őssejt.....	7
2.1.3 Az egér embrionális őssejt.....	8
2.1.4 A pluripotencia fenntartásában résztvevő legfontosabb szignáltranszdukciós útvonalak....	10
2.1.5 Az ES sejtek plaszticitása .....	13
<b>2.2 miRNS útvonal</b> .....	<b>15</b>
2.2.1 Történeti áttekintés, a miRNS útvonal komponensei .....	15
2.2.2 miRNS-ek biogenezise .....	17
2.2.3 RISC-függő translációs gátlás.....	18
2.2.4 A miRNS-ek szabályozó funkciója .....	21
2.2.5 A miRNS-ek szoros tér- és időbeli szabályozása alatt állnak.....	23
2.2.6 A miRNS szabályozás és a pluripotencia kapcsolata .....	25
2.2.7 A miRNS-ek és az emlős embrionális őssejtek kapcsolata .....	27
2.2.9 miRNS törlés vagy miRNS csali (miRNS <i>sponge</i> vagy <i>decoy</i> ).....	30
2.2.8 A miRNS-ek terápiás felhasználásának lehetőségei .....	30
<b>3. ANYAG ÉS MÓDSZER</b> .....	<b>33</b>
<b>3.1 ES sejt tenyésztés</b> .....	<b>33</b>
<b>3.2 <i>In vitro</i> differenciáltatás</b> .....	<b>33</b>
<b>3.3 Immunofluoreszcens analízis</b> .....	<b>33</b>
<b>3.4 Western blot analízis</b> .....	<b>34</b>
<b>3.5 Proliferációs esszé</b> .....	<b>34</b>
<b>3.6 Kolónia képzés mérése (kolónia esszé)</b> .....	<b>35</b>
<b>3.7 Sejtciklus analízis</b> .....	<b>35</b>
<b>3.8 Statisztikai analízis</b> .....	<b>35</b>
<b>3.9 DNS elektroporálása ES sejtekbe</b> .....	<b>35</b>
<b>3.10 Felhasznált vektorok, klónozások</b> .....	<b>36</b>
<b>3.11 RNS izolálás és kvantitatív valós idejű RT-PCR (qRT-PCR)</b> .....	<b>37</b>
<b>3.12 TaqMan Low Density Array (TLDA analízis)</b> .....	<b>38</b>
<b>3.13 Luciferáz aktivitás mérése</b> .....	<b>38</b>
<b>4. EREDMÉNYEK</b> .....	<b>39</b>

4.1 miR-290-295 klaszter tagjainak szekvencia elemzése .....	39
4.2 A miR-290-295 klaszter túltermeltetése egér embrionális őssejtekben növeli a sejtek kolónia képzési képességét és proliferációját. ....	41
4.3 A miR-290-295 klaszter indirekt módon gátolja a korai differenciációs markerek kifejeződését. ....	45
4.4 A miR-290-295 klaszter részt vesz a sejtciklus szabályozásában .....	49
4.5 Az Fbx15 és a Wee1 mRNS-ek a miR-290-295 klaszter közvetlen szabályozása alatt állnak <i>in vitro</i> . ....	51
<b>5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK .....</b>	<b>61</b>
<b>6. MEGBESZÉLÉS ÉS JAVASLATOK .....</b>	<b>62</b>
<b>7. SUMMARY .....</b>	<b>68</b>
<b>8. MELLÉKLETEK .....</b>	<b>70</b>
<b>M1 IRODALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>70</b>
<b>M2 PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK .....</b>	<b>81</b>
<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....</b>	<b>84</b>
<b>KIEGESZITŐ ÁBRÁK.....</b>	<b>85</b>

## GYAKORIBB RÖVIDÍTÉSEK

miRNS- mikroRNS

ES sejt –embrionális őssejt

EPL- korai primitív ektoderma-szerű embrionális őssejt (*early primitive ectoderm like stem cell*)

EpiSC- epiblaszt őssejt (*epiblast stem cell*)

TS- trofektoderma őssejt (*trofctoderm stem cell*)

XEN- extraembrionális őssejt (*extra-embryonic stem cell*)

FAB-SC- bFGF, Activin and BIO-derived stem cells.

BIO-6-bromo-indirubin-3'oxim GSK $\alpha/\beta$  inhibitor

DGCR8- *DiGeorge Syndrome Critical Region 8*

iPS-indukált pluripotens őssejt (*induced pluripotent stem cell*)

LIF- leukémia inhibitor faktor

RTK- receptor tirozin kináz

ERK- extracelluláris jelátvitellel kapcsolatos kináz (*extracellular signal-regulated kinases*)

JAK- Janus tirozin kináz

STAT-signal transducer and activator of transcription

ERK- extracelluláris jel által szabályozott kináz (*extracellular signal regulated kinase*)

siRNS-rövid interferáló RNS (*small interfering RNA*)

RISC-RNS indukált géncsendesítő komplex (*RNA induced silencing complex*)

RLC-RISC töltő komplex (*RISC loading complex*)

Tudor-SN-*Tudor staphylococcal nuclease*

ADAR-duplaszálú RNS-specifikus adenzin deamináz

Ago2- Argonaute 2

PAZ-Piwi/Argonaute/Zwille család

dsRNS- duplaszálú RNS

dsRBD- duplaszálú RNS kötő domén

P-body- processzáló testecske (*processing body*)

GFP- zöld fluoreszcens fehérje (*green fluorescent protein*)

R2D2- duplaszálú RNS kötő, DCR-2 asszociált fehérje

RLC-RISC töltő komplex (*RISC loading complex*)

3' UTR- 3' nem transzlálódó szabályozó régió (*3' untranslated region*)

RE- válaszelem (*response element*)

FBXL5- F-box/LRR-repeat protein 5  
TGF $\beta$ - transzformáló növekedési faktor béta (*transforming growth factor  $\beta$* )  
BMP- bone morphogenic protein  
FGF-fibroblaszt növekedési faktor (*fibroblast growth factor*)  
WNT- *Drosophila* wingless gén homológja  
SSEA- fejlődési stádiumra jellemző sejtfelszíni antigén (*stage specific embryonic antigen*)  
KLF4- Krüppel faktor szerű fehérje (*Krüppel-like factor 4*)  
ICM- embrió belső sejtcsomója (*inner cell mass*)  
MEF-egér embrionális fibroblaszt (*mouse embryonic fibroblast*)  
MEF kond. t.- MEF kondicionált tápoldat  
RNSi-RNS interferencia  
FXR-fragilis X-szerű fehérje  
VIG- Vasa Intrinsic Gene  
CAP-eukarióta (és egyes virális) mRNS-ek 5' végén lévő 7-metil-guanozin módosított nukleotid  
EIF4E-eukarióta transzlációs iniciációs faktor 4E  
CAT1-kation transzporter 1 (*cationic transporter 1*)  
ELAV- *embryonic lethal abnormal vision* fehérje  
TNF $\alpha$ - tumor nekrozis faktor  $\alpha$   
HEK293- ember embrionális vese 293 sejtvonal (*human embryonic kidney 293*)  
ARE-Alu válaszelem (*Alu responsive element*)  
YAP- Yes-asszociált protein  
TAZ-taffazin  
LATS-large tumor suppressor protein  
EMT-epiteliális-mezenchimális tranzíció  
ZEB1, ZEB2- zinc finger E-box binding homeobox 1 és 2  
CDK-ciklin dependens kináz  
HMGA2-high-mobility group AT-hook 2  
RAS-Rat sarcoma fehérje alcsalád  
*D. melanogaster*- *Drosophila melanogaster*  
*C. elegans*- *Caenorhabditis elegans*

## 1. Bevezetés és célkitűzések

A mikroRNS (miRNS) útvonalról kimutatták, hogy növényekben és állatokban egyaránt részt vesz az őssejtek pluripotenciájának fenntartásában (Williams és Fletcher, 2005; Zhao és mtsai., 2007; Cao és mtsai., 2009; Gu és mtsai., 2008; Marson és mtsai., 2008). Számos próbálkozás történt embrionális őssejt (ES sejt) specifikus miRNS-ek azonosítására (Hayes és mtsai., 2008; Suh és mtsai.; Houbaviy és mtsai., 2003), amely lehetővé tette, hogy választ találjunk arra, mi lehet a miRNS útvonal szerepe az emlős embrionális őssejtekben és a differenciálódás kezdeti szakaszában (Bibikova és mtsai., 2008; Chen és mtsai.; Hatfield és Ruohola-Baker, 2008; Ivey és mtsai., 2008). A korai kutatások többnyire az egész miRNS útvonal szerepére kérdezték rá, és a miRNS biogenezis kulcsfontosságú enzimeinek célzott inaktivációjával kerestek választ. A Dicer KO homozigóta embriók nem életképesek, a gasztruláció korai szakaszában elhalnak, alacsony Oct4 expressziót mutatnak, ami a multipotens őssejt-populáció csökkenésére utal (Bernstein és mtsai., 2003). A Dicer funkcióvesztéses mutáns ES sejtek lassabban osztódnak, és megnövekedett arányú G0 és G1 fázisú sejtet tartalmaznak (Murchison és mtsai., 2005). Jellemző rájuk, hogy nem képesek többé teratoma, vagy kiméra állat képzésére. Nehezen differenciálódnak, a differenciálódási markerek (Hnf4, Brachyury, Bmp4, Gata1) kifejeződése alacsony (Kanellopoulou és mtsai., 2005). Annak érdekében, hogy elkülönítsék a miRNS útvonalat a Dicer enzim egyéb lehetséges funkcióitól, a miRNS biogenezis egy másik enzimére (DGCR8) mutáns egér ES sejt vonalat hoztak létre (Sohn és mtsai., 2007). A DGCR8 knockout sejtek morfológiai elváltozást nem mutattak, de csökkent a proliferációs készségük, valamint felhalmozódtak a G1 sejtciklus fázisban (Wang és mtsai., 2008).

Az egér ES sejtekben kimutatható, hogy a miRNS-ek nagy része hat genomi lókusztól származik. Ezek közé tartoznak az ES sejtek legnagyobb mennyiségben előforduló miRNS-ei, melyek a miR-290-295 klaszterrel keletkeznek (Calabrese és mtsai., 2007). Ennek a miRNS klaszternek a tagjai ugyanabba a családba tartoznak, tehát ugyanazzal a központi felismerő szekvenciával rendelkeznek (AAAGUGC). Sinkkonen és mtsai. megállapították, hogy a miR-290-295 miRNS-ek az őssejtek funkcionálisan domináns miRNS-ei (Sinkkonen és mtsai., 2008). A miR-290-295 klaszter méhlepényes emlősökben fordul elő. Az egér genomában hét, egymás melletti prekuzorról keletkeznek. A pre-miRNS-eket egy 3.2 kb hosszú elsődleges transzkriptum kódolja (Houbaviy és mtsai., 2005). A klaszter konzervált emberben, egérben, patkányban, csimpánzban, kutya és szarvasmarha genomában, de nagy fokú variabilitást mutat. A klaszter az embrionális fejlődés során a kettő-négy sejtés átmenetkor kifejeződik, és ezzel az első és legnagyobb mennyiségben előforduló miRNS a korai embrionális miRNS-ek között

(Tang és mtsai., 2007). A miRNS úvonal részletes funkcionális elemzése ellenére csak nagyon kevés tanulmány foglalkozik az egyes miRNS-ek ES sejtekben betöltött szerepével. Ezért célul tűztük ki, hogy megválaszoljuk:

1. Hogyan jöhetett létre a miR-290-295 klaszter?
2. Milyen hatással van a miR-290-295 klaszter az egér embrionális őssejtek morfológiai és növekedésbeli tulajdonságaira?
3. Milyen transzkripciós változások állhatnak a megváltozott őssejt tulajdonságok hátterében, ha túltermeltetjük a miR-209-295 klasztert egér ES sejtekben?
4. Megnevezhető-e egy fő biológiai mechanizmus, aminek a szabályzásával a miR-290-295 klaszter kifejti hatását az egér ES sejtekben?
5. Hatással van-e miR-290-295 klaszter az egér ES sejtek differenciálódási képességére?



## 2 Irodalmi áttekintés

### 2.1 Embrionális őssejtek

#### 2.1.1 A pluripotencia fogalma

A pluripotens őssejtek (ES, embryonic stem sejtek) két legfontosabb ismertetőjele, hogy korlátlan számú osztódásra képesek, és hogy a felnőtt állat valamennyi sejtje kialakulhat belőlük. Az őssejtek izolálása humán embrióból (Thomson és mtsai., 1998) és felnőtt állat testi sejtjeiből (reprogramming) újraprogramozás útján (Takahashi és Yamanaka, 2006) két olyan technika, ami alapvetően befolyásolhatja az orvosi biológia jövőjét.

A pluripotencia *in vivo* az egyedfejlődés egy átmeneti állapota. Az embriógenezis kezdetekor az embrió sejtjei egy rövid ideig totipotensek, majd vagy extra-embriionális szöveti (a méhlepény és magzati extra-embriionális membránok kialakításában résztvevő sejtek) progenitor sejté válnak vagy pluripotens progenitor sejtéként létrehozzák az embrió három csíralemezének sejtjeit, amiből az embrió minden sejtje származik. Az embrióból izolált sejtjeiből származó pluripotens őssejtek *in vitro* korlátlan ideig fenntarthatók, és megőrzik pluripotens tulajdonságukat. Az egér embrionális fejlődése különböző időpontjaiban eltérő tulajdonságú és morfológiájú őssejteket izolálhatunk, ezekből az őssejtekből eltérő differenciálódási képességgel rendelkező őssejtvonalakat hozhatunk létre. Ez arra utal, hogy a sejtek a differenciálódás különböző lépcsőit érték el, de még pluripotensnek tekinthetők. Ezek a különböző tulajdonságú embrionális őssejtek a transzkripciós faktorok közel azonos hálózatát működtetik, és képesek arra, hogy megfelelő körülmények között egymásba átalakuljanak. Ennek a plaszticitásnak a mozgatórugói a környezetből származó jelek, valamint a jelek sejtben belüli feldolgozása. Az embrionális őssejtek plasztikusságának jelentősége lehet *in vivo* a korai embriógenezisben, az elvesztett sejtek pótlásában és a kisebb időzítésbeli elváltozások korrigálásában, valamint a felnőtt állatok szöveti sejtjeinek pótlásában, strukturális átrendeződésben és a szövetek regenerálásában.

#### 2.1.2 A humán embrionális őssejt

Mint minden őssejtet, a humán őssejteket is jellemezhetjük a fejlődési képesség, transzkripciós és epigenetikai profil és a sejt felszíni markerek szempontjából. Fejlődési képesség alatt értjük, hogy az adott őssejtből milyen típusú sejtek alakulhatnak ki. Humán őssejtek esetében a legelfogadottabb eljárás az, hogy a humán őssejteket egérbe juttatják, ahol

azok tumorokat alakítanak ki. Egy valódi pluripotens őssejtvonal esetében mindhárom csírasejt vonal sejtjei megtalálhatók a tumorokban. Egér embrionális őssejtek esetében a pluripotencia igazolására ivarsejt-kimérákat hoznak létre vagy a teratoma képzési képességgel jellemzik az őssejtek pluripotens állapotát. Ivarsejt-kiméra képzéskor a vizsgált őssejteket aggregáltatják nyolcsejtes gazda embriókkal, vagy belefecskendezik egy hólyagsíra állapotú (blasztociszta) embrióba, majd az ebből kialakult kiméra embriót beültetik álvemhes nőstényekbe. A teljes pluripotenciát mutató őssejtek a blasztociszta szerves részévé válnak, és a kiméra embrió minden szövetébe beépülnek, így az ivarsejtekbe is. A kiméra állatokat egymással keresztezve tehát kaphatunk olyan utódot, amely kizárólag a vizsgált őssejtvonalból ered. Humán őssejtek esetében a fejlődési képesség csak korlátozottan vizsgálható, hiszen ivarsejt-kiméra létrehozása nem lehetséges.

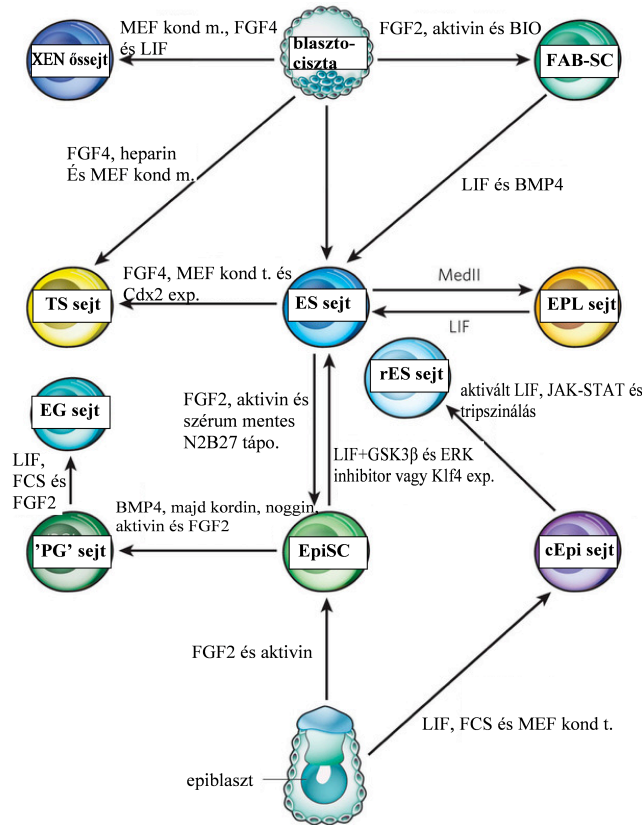
A humán őssejt transzkriptum, proteom és epigenom tanulmányozása az őssejt biológia egyik legfontosabb területe. Számos sejtfelszíni marker áll rendelkezésre a humán őssejtek csoportosítására, ezek a markerek korreálnak az őssejtek származásával, specifikusak lehetnek az embrió eredetű (például embrionális őssejt vagy ES sejt) őssejtekre vagy indukált pluripotens sejtekre (iPS sejt)(Adewumi és mtsai., 2007). A markerek egy csoportja (SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 and TRA-1-81, endogén Oct-4, Nanog, Sox2, Zfp42) alapvetően jellemzi az humán embrionális őssejteket függetlenül a sejtek izolálására alkalmazott technikától. Ugyanezeket a markereket hordozzák a humán embrió epiblaszt sejtjei is, ami arra utal, hogy ez a humán embrionális őssejtekhez legközelebb álló *in vivo* sejt típus (Henderson és mtsai., 2002).

### **2.1.3 Az egér embrionális őssejt**

Minden egér embrionális őssejtre jellemző az Oct4, Nanog és Sox2 együttes jelenléte. Ez a három transzkripciós faktor együtt köt azon gének promótereire, amelyek részt vesznek a pluripotencia vagy a korai elköteleződés szabályozásában, ezáltal biztosítják a pluripotencia fenntartását és gátolják a differenciálódást. Eddig három féle pluripotens sejt vonalat és két részlegesen elkötelezett őssejtvonalat sikerült előállítani közvetlenül az embrióból vagy a már létező egér embrionális sejt vonalakból átprogramozással létrehozni (1. ábra). A pluripotens vonalak az ES sejtek, korai primitív ektoderma-szerű sejtek (early primitive ectoderm-like, EPL sejtek) (Rathjen és mtsai., 1999) és epiblaszt őssejtek (epiblast stem cells, EpiSC) (Brons és mtsai., 2007). A FAB-SC sejtek nullpotensek, azaz nem képesek differenciálódni, de pluripotens sejtekké konvertálhatók *in vitro*. A részlegesen elkötelezett őssejt típusok a trofoblaszt őssejt (trophoblast stem cell, TS), amiből a trofektoderma és extraembrionális

rétegek fejlődnek; és az extra-embriónális endoderma őssejt (extra-embryonic endoderm, XEN őssejtek), amiből a primitív endoderma és az ebből származó sejtek alakulnak ki. Az elköteleződést gátló körülmények között az egér embrió epiblasztjából viszonylag könnyen izolálhatóak az ES sejtek. Az EPL sejtek *in vitro* az ES sejtekből nyerhetők a tápoldat bizonyos módosításával. Az EPL sejtek transzkriptomja leginkább a korai posztimplantációs egér embrió epiblasztjához hasonlít. Az EPL sejtek nem képesek kiméra állat képzésére, leginkább úgy tekinthetjük őket, mint olyan sejteket, amik egy átmeneti állapotot képviselnek az ES és az EpiSC sejtek között. Az EpiSC sejtek a késői epiblasztból erednek (Nichols és Smith, 2009). Mai ismereteink szerint az egér ES sejtek a korai preimplantációs embrió epiblasztjának *in vitro* megfelelői (Nichols és Smith, 2009). Az epiblasztnak ez a stádiuma az extraembriónális elköteleződés, vagyis a trofektoderma létrejötte után jellemző, amikor az embriócsomóban (ICM) történő első differenciálódás lépést követően létrejönnek a primitív ektoderma és primitív endoderma sejtek. Később FGF, WNT, és BMP illetve ezek antagonistái hatására alakul ki az úgynevezett korai posztimplantációs epiblaszt.

Számos jel mutat arra, hogy a humán ES sejtek inkább az egér EpiSC sejteknek feleltethetőek meg (Brons és mtsai., 2007). A humán ES sejtek és az egér EpiSC sejtek számára alapvetően fontos a Nodal/Aktivin jelátvitel a pluripotencia megőrzéséhez. Egér ES sejtekben ez nem szükséges. Ugyanakkor egér ES sejtek fenntartásához elengedhetetlen a LIF, míg LIF-nek nincs központi szerepe a humán ES sejtekben és az egér EpiSC sejtekben. Az egér ES sejtek életképesek maradnak, ha a sejteket egysejtes szuszpenziót létrehozva passzáljuk, míg ezt nem tehetjük meg humán ES vagy egér EpiSC sejtekkel. A számos hasonlóság mellett sok különbséget is találhatunk az egér EpiSC és humán ES sejtek összevetésekor. Egér EpiSC sejtekre (az egér ES sejtekhez hasonlóan) jellemző az SSEA1 (stage specific embryonic antigen) sejt felszíni glikopeptid. Az SSEA1 (vagy másképp CD15 antigén), egy szénhidrát adhéziós molekula, mely glikoproteinek, glikolipidek és pteroglikánok felszínéhez kapcsolódhat. Az egér embriónális őssejtek egyik legismertebb markere. Fontos szerepe van a sejtek adhéziójában és vándorlásában a preimplantációs embrióban. Végül, a humán és egér ES sejtek egymással is sok közös vonást mutatnak: mindkettőben jelen van Dppa3 (Stella), és a Klf4. Dppa3 aktiválódik az egér EpiSC ES sejté váló átprogramozása során. Klf4 túlexpresszáltatása pedig elegendő ahhoz, hogy az egér EpiSC sejtek ES sejtekké alakuljanak.



1. ábra. Egér őssejtek plaszticitása (Pera és Tam, 2010)

Különböző tenyésztési körülmények között eltérő tulajdonságú őssejtek izolálhatók az egér blasztocitából és a korai vagy a késői epiblasztból. A blasztocitából négyféle őssejt származtatható: ES sejt, TS sejt (trofektoderma őssejt), XEN sejt (extra-embriális őssejt) és a FAB-SC őssejt. Ha a FAB-SC őssejtek tenyésztő médiumát BMP4-el és LIF-fel egészítjük ki, a sejtek pluripotens ES sejt-szerű sejtekké konvertálhatók. Az ES sejtek TS sejtekké alakulnak, ha az egér embrionális fibroblasztal kondicionált tápoldatban tartjuk őket, amit FGF4-el egészítünk ki, és a sejtekkel exogén módon expresszáltatjuk a CDX2 trofektoderma markert. Az ES sejtekből EPL sejtek lesznek, ha a sejteket a HepG2 hepatokarcinóma eredetű sejtvonallal kondicionált médiumban tenyésztjük. Hasonlóképpen, az EPL sejtek ES sejtekké alakulnak LIF jelenlétében. Korai (pre-gasztrulációs embrió) és késői (gasztrulációs embrió) epiblaszt darabokból EpiSc őssejtek izolálhatók FGF2-vel és aktivinnel kiegészített tápoldatban. Az EpiSC őssejtek sejtekre disszociálhatók, és az egér embrionális fibroblasztal kondicionált tápoldatban, LIF jelenlétében, cEpi (cultured Epi) sejteket képeznek. A cEpi sejtek visszaalakíthatók az ES sejtekhez hasonló rES sejtekké (reverse ES sejtek). Az EpiSc sejtek LIF jelenlétében valamint a GSK3 $\beta$  és ERK inhibitorok együttes alkalmazásakor vagy a KLF4 pluripotencia faktor túltermeléskor visszaalakulnak ES sejtekké. Az ES sejtek is képesek EpiSC sejtekké válni, ha FGF2-vel és aktivinnel egészítjük ki a tápoldatot. Az EpiSC sejtek a primordiális ivarsejtekhez (primordial germ cell, vagy PG sejt) hasonló sejtekké differenciálódnak BMP4, noggin, chordin, aktivin és FGF2 kezeléskor. Ezek a 'PG' sejtek pluripotens EG sejtekké (embriális ivarsejt vagy embryonic germ cell) konvertálhatók LIF-el, FCS-el és FGF2-vel kiegészített tápoldatban.

### 2.1.4 A pluripotencia fenntartásában résztvevő legfontosabb szignáltranszdukciós útvonalak

A legismertebb, pluripotenciával kapcsolatban álló útvonalak magukban foglalják a TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ), receptor tirozin kináz (receptor tyrosine kinase, RTK), WNT, LIF és JAK-STAT útvonalakat. (2. ábra).

## **TGF- $\beta$ család**

A TGF- $\beta$  család tagjai strukturálisan egymáshoz kapcsolódó jelátviteli fehérjék, amik széles körű biológiai hatást képesek kifejteni. A család magában foglalja a TGF- $\beta$  fehérjét, az aktivin és nodal fehérjét, növekedési differenciációs faktorokat (growth differentiation factor, GDF), és BMP (bone morphogenic protein) faktorokat. Nodal és aktivin ugyanazon a receptoron keresztül indítja a jelátviteli utat, és gátolják a humán ES sejtek differenciációját (Vallier és mtsai., 2004). A humán ES sejtek expresszálják a kompatibilis receptorokat: ACVR1B és ACVR2B-nodal receptorokat, és TDGF1 vagy cripto- nodal ko-receptort (Assou és mtsai., 2007). A humán ES sejtek nodal antagonistáit is kifejezik, ezek: LEFTY1, LEFTY2 és a nodal maga. Aktivin és nodal képes más extracelluláris jelátviteli fehérjékkel közreműködni (pl WNT fehérjékkel és FGF2-vel), a pluripotencia fenntartása érdekében (James és mtsai., 2005). Nem teljesen ismert LEFTY1 és LEFTY2 szerepe ES sejtekben. A blasztocisztában Lefty mRNS a belső sejtsomó egyes sejtjeiben expresszál (Dvash és mtsai., 2007), később pedig a primitív endoderma és a viscerális endoderma egyes sejtjeiben van jelen, tehát elképzelhető, hogy a Lefty1-et expresszáló sejtek a belső sejtsomó endoderma progenitorai (Takaoka és mtsai., 2006). Nodalnak több funkciója is ismert (Shen, 2007). Szükséges az epiblaszt fenntartásához és növekedéséhez, és a pluripotens állapot megtartásához Nodal hiányos embriók nem képesek Oct4 expressziójára, és korai neuroektoderma irányú differenciálódási képesség jellemzi őket. Nodal később részt vesz WNT és FGF2 fehérjékkel a csíralemezek kialakításában. A nodal-aktivin útvonal aktiválja a SMAD2 és /vagy SMAD3 transzkripciós faktorokat, ami Nanog expresszióhoz vezet (Vallier és mtsai., 2009). SMAD2 és SMAD3 közvetlenül Nanog promóteréhez köt, míg SMAD1, SMAD5 és SMAD8 gátolja Nanog expresszióját humán ES sejtekben. A SMAD2 és SMAD3 útvonalak végül gátolják BMP4 expresszióját, ezáltal késleltetik a spontán differenciálódást (Greber és mtsai., 2007).

GDF fehérjék autokrin és parakrin módon segítik az ES-sejtek pluripotenciáját. GDF3 BMP4 antagonistája, ezzel párhuzamosan elősegíti Nodal expresszióját.

Egér ES sejtekben azonban BMP4 hatása ellentétes (Ying és mtsai., 2003). A DNS kötést gátló (inhibitor of DNA binding, vagy inhibitor of differentiation, differenciációt gátló fehérjék, ID) fehérjék aktiválásával megakadályozza a sejtek neurális differenciálódását. BMP-nek ez a fajta hatása csak LIF jelenlétében érvényesül. Egér embrióban Bmp4, Bmpr1a vagy Smad4 gátlása az epiblaszt sejtek osztódási képességét negatívan befolyásolja (Winnier mtsai., 1995).

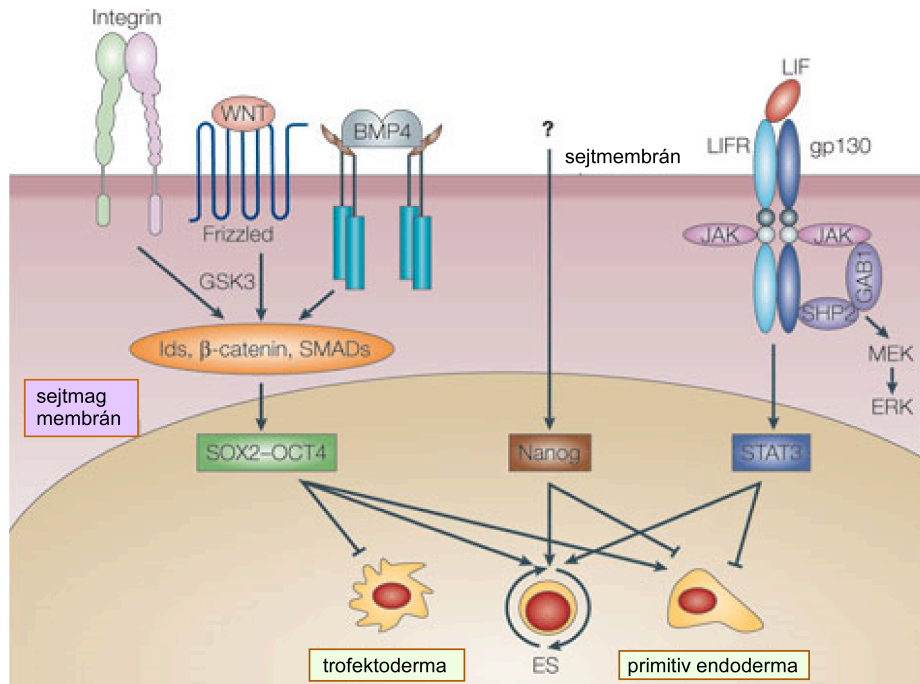
## **RTK (receptor tirozin kináz) jelátvitel**

A humán ES sejtek fenntartásához alapvetően szükséges FGF2 (Amit és mtsai., 2000), és a sejtek expresszálják is az FGF2 fehérjét, valamint az FGF fehérjék receptorait (Dvorak és mtsai., 2005). FGF faktorok jelátvitelére RT kinázok és ERK1, ERK2-n keresztül történik (MEK-ERK kaszkád). Ennek az útvonalnak gátlása humán ES sejtekben differenciálódáshoz vezet (Li és mtsai., 2007). Ezzel ellentétben, egér ES sejtekben ERK1 és ERK2 aktivációja okoz differenciálódást (Burdon és mtsai., 1999). Más FGF faktorok is hatnak a pluripotenciára. *In vitro* az FGF4 hiányos egér ES sejtek parietális endoderma irányban köteleződnék el (Wilder és mtsai., 1997), és az FGF faktorok segítik az egér TS sejtek proliferációját is (Tanaka és mtsai., 1998). Az RTK útvonal aktiválása egér ES sejtekben csökkenti Nanog expresszióját, FGF4 gátlása egér ES sejtekben elősegíti a pluripotencia megtartását (Hamazaki és mtsai., 2006).

### **WNT család, LIF és JAK-STAT útvonal**

WNT útvonal pluripotenciában játszott szerepe ma még nem egyértelmű. Az útvonal gátlása rövid ideig hozzájárul a pluripotencia megőrzéséhez humán és egér ES sejtekben (Sato és mtsai., 2004). További tanulmányok azt jelzik, hogy a WNT út inkább a sejtek osztódását aktiválja (Dravid és mtsai., 2005), és további faktorok (TGF- $\beta$ , és FGF2) szükségesek hosszú távon az őssejt-tulajdonságok megőrzéséhez. *In vitro* a WNT3 hiányos egér embriók továbbra is expresszálják az Oct4-et, és nem mutatnak differenciálódást.

LIF aktiválja JAK-STAT jelátviteli útvonalat ES sejtekben, de a humán őssejtekben ez nincs hatással a pluripotens képesség megtartására. A humán ES sejtek inkább FGF2-mediált ERK útvonaltól függenek. Ezzel ellentétben az egér ES sejtek fenntarthatók LIF adagolásával, és a LIF-JAK-STAT jelátvitel AKT-PI(3)K (foszfatidil-inozitol-trifoszfát) és MAP-kináz-GRB2-n keresztül pedig a LIF szabályozza Tbx3 transzkripciósi faktort, ami Nanog upstream faktora. LIF aktivációja szérumszükséges, de a szérum helyettesíthető BMP faktorokkal, vagy (egér ES sejtekben) kis szintetikus molekulák kombinációjával, melyek gátolják a MAP-kináz útvonalat (Ying és mtsai., 2008).



2. ábra. Az pluripotencia fenntartásában szerepet játszó fő jelátviteli útvonalak (Boiani és Scholer, 2005).

Egyes sejtfelszíni receptorok a külső jeleket a sejtmagba közvetítik, és ezáltal olyan kulcsfontosságú pluripotencia faktorok transzkripcióját érintik, mint az oktamer kötő Oct4 (OCT-4) vagy Nanog, valamint a sejt önmegújító képességét befolyásoló jelátviteli fehérje és transzkripció aktivátor STAT3. Legrészletesebben a leukémia gátló faktor- receptor (leukemia inhibitor factor receptor vagy LIFR)-STAT3 útvonal ismert. A LIF egy citokin, ami a sejtfelszíni LIFR-hoz köt. LIFR ennek hatására heterodimert képez egy másik transzmembrán fehérjével, a glikoprotein-130-al (gp130). A heterodimer egy kináz kaszkádot aktivál, ami egyrészt felerősítheti és a sejtmagba közvetítheti a szignált, másrészt lehetővé teszi, hogy további szabályozó fehérjék kössenek a LIFR-gp130 komplexhez. A LIFR-gp130 komplex intracelluláris részéhez köthet a Janus tirozin kináz (JAK) és az antijofotirozin immunoreaktív kináz (TIK). A kötés hatására a LIF-GP130 komplex foszforilálódik. Ez a foszforilált forma képes az Src-2 homológ domént (SH2) tartalmazó fehérjék megkötésére, mint például a STAT3 transzkripció faktor. A sejtmagban Stat3, Oct4 és Nanog együttes hatására megindul az embrionális őssejtekre jellemző gének expressziója, ezzel párhuzamosan pedig gátlás alá kerülnek a differenciációra jellemző gének. Oct4 a SRY-high mobility group -2 (HMG-2) domént tartalmazó fehérjékkel (például Sox2) együttműködve kijelöli, hogy a target gének közül melyeknek a transzkripciója kerül aktiválás vagy gátlás alá. Az ábra további rövidítései: GSK3 (glikogén szintáz kináz 3) fehérje; GAB1 és GRB2-kötő fehérje; Id: differenciációs inhibitor (inhibitor of differentiation) fehérje; MEK: mitogén aktivált protein kináz (MAPK) és extracelluláris sejt által szabályzott kináz (extracellular signal regulated kinase vagy ERK) protein kináz; SMAD: a *Drosophila* eredetű 'similar to mothers against decapentaplegic' fehérje homológja; SHP2: SH2 domént tartalmazó tirozin foszfát 2; WNT: a *Drosophilából* származó wingless típusú fehérje homológja.

### 2.1.5 Az ES sejtek plaszticitása

A tenyésztett humán ES sejtek igen nagy heterogenitást mutatnak. Az SSEA3 pozitív szubpopuláció a klónképző sejtfrakció (a sejteknek az a része, mely képes ES sejt kolóniát képezni, tehát képes megőrizni a pluripotenciáját) (Enver és mtsai., 2005). Ugyanakkor számos más sejt is expresszálja a Nanog és Oct4 pluripotencia faktorokat. GCTM2 és CD9 sejtfelszíni pluripotencia markerek vizsgálatakor kimutatták, hogy a humán ES sejtek nem 'igen-nem' válasz-szerűen viselkednek, hanem a sejtek egy koncentráció grádiens mentén fejezik ki a sejtfelszíni markereket, ami korreál kolónia képző tulajdonságukkal. Az egyetlen

sejtből kiinduló transzkriptom vizsgálatok következtetése az, hogy a tenyésztett ES sejtek expresszálnak pluripotencia- és differenciálódási faktorokat is. Azok a sejtek, melyek erősen fejezik ki a pluripotencia markereket, csak gyengén expresszálják a differenciálódási faktorokat, ezek a sejtek állnak tehát a pluripotencia hierarchia csúcsán. Egyes sejtek még nem differenciáltak, de már nagy mennyiségben expresszálnak differenciálódási faktorokat, és ezzel párhuzamosan csökkent mértékben fejezik ki a pluripotencia markereket. Ezek a sejtek vannak tehát a pluripotencia hierarchia alján, és a két állapot között folyamatos az átmenet. Az elköteleződésre és pluripotenciára jellemző gének együttes expressziója a humán ES sejtek és egér EpiSC sejtek közös vonása. Mindkét sejtípus a pluripotencia hierarchia közepén található.

Az egér ES sejttenyészetek is heterogének *in vitro*, számos (egymásba konvertálható) sejtípust tartalmaznak. A sejtípusok átalakulása indukálható a tenyésztő médium komponenseinek cseréje révén, citokinek vagy növekedési faktorok adagolásával. Az ES→EPL sejt konverzió reverzibilis (Rathjen és mtsai., 1999). A FAB-SC sejtek blasztociszta eredetűek, de nem képesek teratóma vagy kiméra állat képzésére, tehát nem pluripotensek. Ugyanakkor LIF és BMP4 adagolásával pluripotens ES sejtekké konvertálhatók (Hanna és mtsai., 2009). Az EpiSC→ES átalakulás is előidézhető Klf4 aktivációjával vagy tápláló (embrionális fibroblaszt sejtek) jelenlétében LIF és BMP4 hozzáadásával (Bao és mtsai., 2009).

Az 'össejt' tehát nem egy bizonyos, jól körülírható sejtípus, hanem a külső környezet függvényében változó sejtállapot. Az egér embrió belső sejtcsomója és epiblasztja (és valószínűleg ezeknek humán megfelelője is) dinamikus sejtpopuláció, kölcsönhat az extra-embriónális szövetekkel, az ezekből érkező szignálok pedig alapvetően meghatározzák a pluripotens sejtek további sorsát. A sejtek rendkívüli plasztikussága *in vitro*, a különböző állapotú embrionális össejtek egymásba való átalakításával demonstrálható. *In vivo*, a magas fokú plaszticitás lehetővé teszi, hogy a sejtek szükség esetén (bizonyos korlátokon belül) pótolják egymás funkcióját, és az embrió ne sérüljön.



## 2.2 miRNS útvonal

### 2.2.1 Történeti áttekintés, a miRNS útvonal komponensei

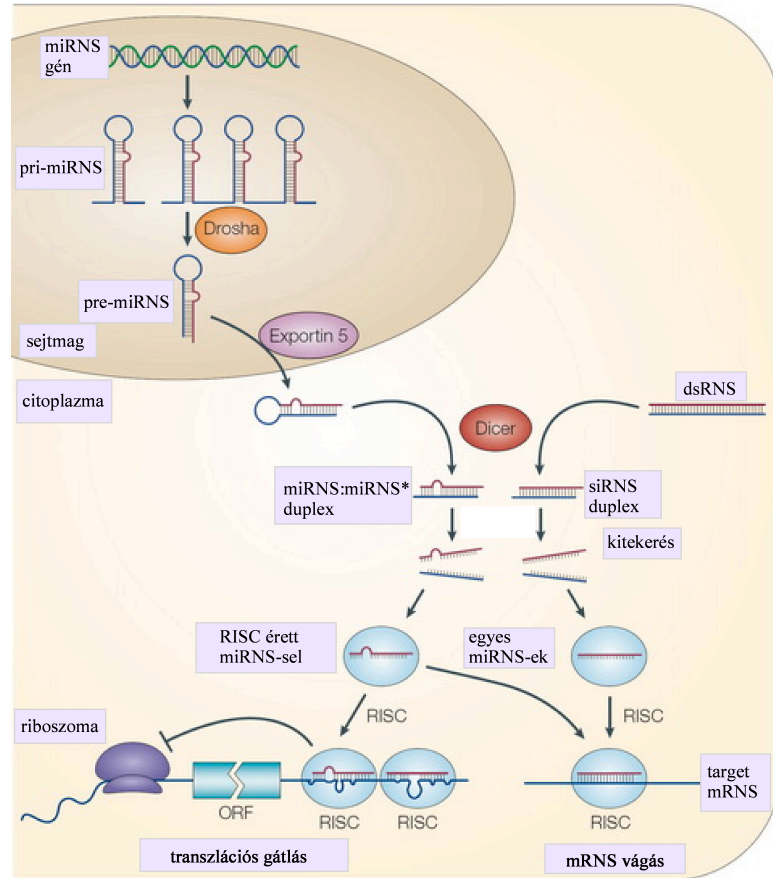
A PubMed keresőprogram körülbelül 8500 publikációt tartalmaz, melyek a mikroRNS (miRNS) útvonallal foglalkoznak. 2010 áprilisában több mint 340, miRNS-ekkel kapcsolatos publikáció született, ami jelzi, hogy ez a témakör a biológiával foglalkozók érdeklődésének középpontjában áll.

1986-ban találunk utalást először arra a mechanizmusra, amely során egy transzgén magas kópiaszáma a transzgén fehérje elvesztését eredményezte (Ecker és Davis, 1986). Az 1990-es évek elején Mello és Fire csoportja *C. elegans*-ban megállapította, hogy a transzgén inaktivációja a transzgén szekvenciájával megegyező dsRNS jelenlétében történik, és a mechanizmust RNS interferenciának (RNSi) nevezték el (Fire és mtsai., 1998). Ennek az új génexpressziót szabályozó mechanizmusnak a leírásáért Mello és Fire 2006-ban Nobel díjat kapott. Az RNAi felfedezése óta az egyik legizgalmasabb kérdés, hogy milyen molekuláris komplexek vesznek részt ebben a szabályozó mechanizmusban, és hogyan működnek ezek. Különösen nagy hangsúlyt fektettek az RNS indukált csendesítés végrehajtó komplexének (RNA induced silencing complex, RISC) megismerésére.

A RISC-et számos fehérje és RNS molekula alkotja, funkciói között szerepel a cél mRNS degradációja, transláció repressziója és a kromatin átrendeződés is. RISC fehérjéi közül csak kevésnek ismert a funkciója, ezek közé tartozik például az Argonaute-2 (Ago2 vagy eIF2C2), *Drosophila* fragilis X fehérje (Fragile X-Related Protein, dFXR vagy dFMR1), a Vasa Intron Gene (VIG) valamint a mikrokókkális nukleáz családba tartozó Tudor-SN. A Tudor-SN fehérje a hipermódosított dupla szálú RNS-ekhez (dsRNS) köt, és elősegíti ezek degradációját (Scadden és mtsai. 2005). A hiper módosítás az adozin részek inozitolra való kicserélését jelenti, amit az ADAR nevű deamináz végez. Ez módosítás jelöli ki egyes dsRNS-ek (pl. miRNS prekursorok) Tudor-SN útján való inaktiválását.

Tuschl munkacsoportja írta le először, hogy Ago2 fehérje adja a RISC központi endonukleáz aktivitását (Meister és mtsai., 2004). Hipotézisüket azóta számos úton bizonyították, pl röntgen krisztallográfia és irányított mutagenézis segítségével (Song és mtsai., 2003), ami a központi katalitikus rész szerkezetét valamint az Ago2-mRNS-siRNS struktúráját is definiálta. Ma már *in vitro* kísérletekből az is ismert, hogy tisztított Ago2 és a rövid duplaszálú siRNS (silencing interference RNA) mRNS-hez keverve képes a RISC aktivitás újraképezésére (Liu és mtsai., 2004). A miRNS-ek és siRNS-ek keletkezésében központi szerepű a Dicer enzim. Dicer egy körülbelül 200 kDa súlyú fehérje, ami rendelkezik egy

ATPase/RNS helikáz vagy PAZ doménnel, két katalitikus RNáz III doménnel és egy C-terminális dsRNS kötő doménnel (dsRBD) (Wang és mtsai., 2009). Dicernek két formája létezik *Drosophilában*, Dcr1 és Dcr2 (Ye és Liu, 2008), míg a *C. elegansban* és gerincesekben csak egy Dicer található.



3.ábra miRNS biogenezis

Az állati miRNS gének endogén módon kódoltak, az mRNS-ek intronjaiban vagy intergenikusan található meg a genomban. Az elsődleges transzkriptumot (pri-miRNS) az RNS polimeráz II írja át, és egy vagy több miRNS-t tartalmaz. Ezt a hosszú transzkriptumot a mikroprocesszor komplex hasítja el. A mikroprocesszor komplex tagjai közé tartozik a Drosha, ami egy RNáz III típusú endonukleáz, és ennek partnere, a DGCR8/Pasha fehérje, ami egy duplaszálú RNS kötő protein. A mikroprocesszor komplex a kettős szálú RNS strukturákat ismeri fel a pri-miRNS-en, és specifikusan a hajtű kanyar alakú szerkezet alapi részénél hasítja el az RNS-t. Így jön létre a 60-70 nukleotid hosszú miRNS prekursor (pre-miRNS). A pre-miRNS az Exportin-5 útvonalon keresztül kerül a citoszolba, ahol egy további endonukleázos hasítással létre jön a miR/miR\* duplex. Ezt a második hasítást a Dicer nevű RNáz III típusú endonukleáz enzim végzi. A miR/miR\* duplex beépül a nagy méretű, sok komponensű RISC végrehajtó komplexbe. A RISC alapvető fontosságú elemei a TRBP (TAR binding protein), a Dicer és egy Argonaute típusú fehérje (emberben az Ago2). A RISC komplex egyszálú miRNS komponense felelős a target mRNS-ek felismeréséért, míg a miR\* szál nem része az érett komplexnek, hanem hamar degradálódik. A növényi miRNS-ekkel és a siRNS-ekkel szemben, az állati miRNS-ek nagy része nem teljesen komplementer a target felismerő szekvenciával, és ezért nem váltja ki a target mRNS hasítását. Ehelyett transzlációs gátolja a target mRNS-t, valószínűleg oly módon, hogy a RISC megakadályozza a mRNS CAP régiójának felismerését. Ez a lépés a citoszol P-testecskéiben megy végbe, ahol felhalmozódnak a nem-transzlálódó mRNS-ek, valamint végbemegy a degradációjuk is.

### 2.2.2 miRNS-ek biogenezise

A miRNS gének transzkripcióját követően a Drosha (Denli és mtsai., 2004) sejtmagi RNáz DGCR8 fehérjével komplexben, elvágja az elsődleges transzkriptumokat, vagy pri-miRNS-eket, kb. 70 bp hosszú hajtű alakú pre-miRNS-ekké. A pre-miRNS tartalmú komplex az Exportin5 fehérje segítségével a citoplazmába jut, ahol Dicer vágja, ennek eredményeképpen alakul ki a dupla szálú kb. 22 nukleotid (nt) hosszú miRNS duplex, amelynek egyik szála a RISC komplexbe épül. Az RNAi gépezet a siRNS vagy miRNS és a mRNS közötti Watson-Crick bázispár kölcsönhatással választja ki a cél mRNS molekulákat, ezek a targetek (Winter és mtsai., 2009). Tuschl munkacsoportja leírta, hogy a HeLa sejtekből származó RISC a siRNS duplexnek csak az egyik szálát tartalmazza. UV érzékeny biotinilált siRNS templátot használva precipitálták a RISC komplexeket, és észrevették, hogy csak a 3' biotinilált antiszensz siRNSek tudtak kötni az enzim komplexhez (Martinez és mtsai., 2002). Továbbá definiálták a siRNS ideális hosszát is, ami nem lehet kevesebb, mint 19 nt.

Ezzel párhuzamosan HeLa sejtekben, GFP-t, mint riportert gént használva, Chiu és Rana bemutatták, hogy a siRNS antiszensz szálán, az 5' foszfát hidroxil csoportja feltétlenül szükséges az RNAi-hoz, míg a 3' vég fontossága csekély (Chiu és Rana, 2002). Tuschl csoportja beszámolt arról, hogy a siRNS által targetált mRNS-ek endonukleázos vágással bomlanak (Martinez és Tuschl, 2004).

A következő mérföldkő a siRNS strukturális aszimmetria felfedezése volt. Zamore munkacsoportja megfigyelte, hogy a siRNS két szála nem egyforma arányban épül be a RISC-be. A siRNS duplexek túlnyúló végeinek termodinamikai stabilitása határozza meg, hogy melyik szál milyen mértékben vesz részt az RNSi útvonalban (Schwarz és mtsai. 2003). Ez az aszimmetria miRNS-eknek is sajátossága. A ma elfogadott modell szerint a miRNS és siRNS duplexeket egy ATPáz függő helikáz tekeri szét a termodinamikailag kevésbé stabil túlnyúló végről. A RISC-be az az RNS szál épül be, amelyiknek 5' vége a duplex kevésbé stabil végén helyezkedik el (Robb és Rana, 2007). A Zamore csoport továbbá rámutatott arra is, hogy *D. melanogaster*-ben a Dcr-2/R2D2 heterodimer fehérje a termodinamikai stabilitás szenzora (Tomari és mtsai. 2004). Dcr-2 a kevésbé stabil RNS szál 5' végéhez közel köt, míg R2D2 fehérje kereszt kötetést hoz létre a beépülő szál 3' végével. Dcr-2 helikáz aktivitással rendelkezik, amiről kimutatták, hogy szükséges a siRNS duplexet széttekeréséhez. A csoport munkájából az is ismert, hogy ha *D. melanogaster* embrió sejtizátumba ATP jelenlétében siRNS-t juttatunk, R2D2 csökkenő aktivitással köt a beépülő RNS szálhoz az idő függvényében, mert R2D2-t az Ago2 váltja fel. Dcr-2 kötés nem mutat időfüggést. Mindez azt jelzi, hogy a RISC felépülése során Dcr-2/R2D2 heterodimer először orientálja a siRNS-t a RISC töltő komplexben (RLC, RISC loading complex), majd a siRNS széttekerése közben

R2D2 helyett Ago2 köt a siRNS-hez. R2D2 kötését erősíti, ha a siRNS az 5' végen foszforilált. Ez azt mutatja, hogy R2D2 egyfajta minőségi ellenőrzést is végez az orientáláson kívül, mivel előnyben részesíti a 'bona fide', RNáz III vágásból származó foszforilált siRNS-eket. A siRNS duplexek az RLC-ben csak Ago2 jelenlétében tekerednek szét, tehát, ha lehetőség van arra, hogy azonnal beépüljenek a funkcionális RISC-be (MacRae és mtsai., 2008). A siRNS duplex széttekeréséhez szükség van ATP-re és az Ago2-re. A miRNS-ek esetében gyakran a pre-miRNS-ek mindkét vége közel egyforma termodinamikai stabilitást mutat. Ennek az a következménye, hogy a prekursor mindkét szála közel azonos affinitással képez RISC-et. Ezekben miRNS párokban \*-al, vagy a -5p, -3p hozzáadásával különítjük el a beépülő szálat. Ilyen miRNS-ek pl. a humán miR-302 család és miR-373 (microna.sanger.ac.uk adatbázis).

Nemrégiben számos csoport jelezte, hogy a miRNS-ek szerepet játszhatnak a mRNS-ek degradációjában, ami ellentétben áll a korábbi elképzeléssel, mi szerint a miRNS-ek csak a mRNS-ek translációs gátlásában vesznek részt. Lim és mtsai. microarray analízissel bizonyították, hogy egyes miRNS-ek hatására sokféle transzkriptum expressziója csökken valószínűleg oly módon, hogy közvetlenül kötnek a mRNS-ekhez, és degradációval csökkentik a sejten lévő szintjüket (Lim és mtsai., 2005). Jing és mtsai. munkája alapján miR-16 szükséges az AU szekvenciában gazdag mRNS-ek degradációjához (Jing és mtsai., 2005). Más csoportok let-7 és lin-4-ről mutatták be, hogy képesek a target mRNS-ek degradációjára.

### 2.2.3 RISC-függő translációs gátlás

A miRNS/siRNS és a translációs gátlás összefüggése régóta ismert. A *Drosophila* Fragile X-Related fehérje (dFXR) egyaránt kapcsolódik az RNAi apparátushoz és a riboszomális fehérjékhez. dFXR tisztítása során kiderült, hogy a dFXR-t tartalmazó komplex 5S RNS-t, két riboszomális fehérjét (L5 és L11), valamint Ago2-t és egy helikázt (Dmp68) is tartalmaz. Caudy és mtsai. kimutatták FXR és VIG jelenlétét humán RISC-ben. A fragilis X szindróma a mentális retardáció egy öröklődő formája, melyet az FXR riboszóma kötő protein hiánya jellemez (Caudy és mtsai., 2003).

Sharp munkacsoportja jelezte először, hogy a siRNS-ek képesek miRNS-ként működni, ha a középső szakaszukba a targettel nem komplementer nukleotidokat építenek be (Doench és mtsai., 2003). Cullen csoportja ezt azzal egészítette ki, hogy humán endogén miRNS-ek is képesek a siRNS-ekhez hasonlóan a target mRNS-ek elhasítására, ha a miRNS és a target szekvencia tökéletesen komplementer (Zeng és mtsai., 2003). Mindez azt jelzi, hogy a

miRNS-ek és siRNS-ek hasonló mechanizmuson keresztül hatnak, és az RNAi végeredménye (a target vágása vagy translációs repressziója) nagyrészt a komplementaritás függvénye. A miRNS-ek target meghatározásában legfontosabb az 5' vég első 8 nukleotidjának szabadenergia szintje.

A mai napig is vitatott a miRNS-ek általi translációs gátlás pontos mechanizmusa. Egyes csoportok szerint a transláció iniciációs lépésére hat az RNAi, mások szerint inkább az iniciációt követő lépésekkel (pl. a riboszóma korai leválása, a target mRNA degradációja vagy kotranszlációs fehérje degradáció) interferál. Egyes miRNS targeteken aktív, fehérje szintetizáló riboszómákat figyeltek meg. Más csoportok szerint az Ago2 fehérje az eIF4E-ben található CAP-kötő doménhez nagyon hasonló doménnel rendelkezik, ami abszolút szükséges az Ago2 CAP kötéséhez (Kiriakidou és mtsai., 2007). Feltételezésük az, hogy Ago2 a CAP kötésért verseng eIF4E-vel, így gátolva a translációs iniciációt. Filipowicz és mtsai. szerint a let-7 miRNS a translációs iniciáció gátlásán keresztül csökkenti a target fehérje expresszióját. Arra is rámutattak, hogy csak a CAP-függő transláció gátlására képes a let-7, míg a CAP-független translációra nincs hatással. Ez azt jelenti, hogy a mRNS CAP régiója és a CAP-hez kapcsolódó fehérjék szükségesek a let-7 translációs gátlásához. Filipowicz csoportja nyomon követte a miRNS-ek és a translációs represszált mRNS-ek sejtbeli helyzetét is. Megfigyeléseik szerint a target mRNS-ek kolokalizálnak a CAP eltávolító Dcp1 fehérjével a citoplazma P-testecskéibe (processing body, P-body). Ezt támasztja alá, hogy a RISC központi fehérjéit, az Ago proteineket (pl Ago2) is megtalálták a P-testecskékben (Jagannath és Wood, 2009). *D. melanogaster* S2 sejtjeiben azonban P-body hiányában is végbemegy a miRNS által közvetített translációs represszió, ami azt jelzi, hogy a P-testecskék valószínűleg az RNAi következménye képpen alakulnak ki, és nem feltétlenül szükségesek az RNS alapú géncsendesítéshez.

A P-testecskékben mRNS degradáció is végbemegy, oly módon, hogy először a poli-A fark rövidül meg (deadeniláció), majd mRNS CAP hasad le (*decapping*), végül a mRNS 5'-3' irányú exonukleázos degradációval bomlik (Eulalio és mtsai., 2009). Az mRNS-ek translációja és a CAP lehasadása szorosan összefügg. A CAP kötő eIF-4E fehérje elsődleges funkciója a translációs iniciáció, ugyanakkor, a CAP védelmével (*decapping* gátlásán keresztül) gátolja is a translációs elongációt. Összefoglalva, a P-testecskében folyó mRNS degradáció inkább köthető az általános mRNS *turnover*-hez, mint egy specifikus mRNS RNSi-án keresztüli degradációjához. A P-testecskékhez valószínűleg az RNAi útvonal translációs repressziós lépése kapcsolható.

Emlősállatokban a TRBP fehérjék részt vesznek a miRNS-ek Ago2 komplexbe való beépülésében. Chendrimada és mtsai. kimutatták a 60S riboszomális alegység és az eIF6

jelenlétét RISC-ben (Chendrimada és mtsai., 2005). Ismert, hogy eIF6 megakadályozza a 80S iniciációs komplex összeszerelését, mivel köt a 60S alegységhez. eIF6 *C. elegans*-ban is szerepet játszik a miRNS által szabályzott génexpresszióban, ami azt támasztja alá, hogy ez a szabályozási mód evolúciósan konzervált. Fontos megemlíteni, hogy az RNS-kötő fehérjék befolyásolhatják a miRNS mediált transzlációs gátlást. A májsejtekben expresszázó CAT-1 (*cationic anion transporter 1*) miRNS gátlását feloldja az ARE (*AU-rich element*) kötő HuR (Bhattacharyya és mtsai., 2006). A HuR proteinek ELAV szerű fehérjék, melyeknek névadója a *Drosophila* 'embryonic-lethal abnormal vision', ELAV fehérje. Az ELAV fehérjék a sejtmag és a citoszolus közötti transzportban vesznek részt, emellett poszttranszkripcionálisan stabilizálnak bizonyos mRNS-eket. Az emberben megtalálható négy ELAV fehérje közül három a terminálisan differenciált neuronokban fejeződik ki, míg a negyedik HuR számos sejttípusban konstitutívan expresszá. Az emberi HuR fehérjék olyan instabil mRNS-eket stabilizálnak, melyek 3'UTR régiója AU –gazdag szekvenciát tartalmaz. HuR fehérje stressz hatására kapcsolódik a P-testecskében lévő csendesített CAT-1 mRNS-hez, és segíti a mRNS hozzákapcsolódását a poliriboszomális frakcióhoz. A miRNS szabályozást tovább bonyolítja Vasudevan és mtsai. megfigyelése, mely szerint szérum éheztes hatására HEK293 sejtekben a TNF- $\alpha$  3'UTR-t tartalmazó riportergén expressziója ARE-függő módon nő. Ago2-re és FXR1-re eddig mint a transzlációt gátló RISC elemekre gondoltunk, de meglepő módon mind a két fehérje szükséges a transzláció elősegítéséhez, ha az éheztes folyamán a sejtciklus G1 fázisban megreked. TNF- $\alpha$  ARE régiója két mir-396-3p kötőhelyet tartalmaz, és miR-396-3p szükséges a TNF- $\alpha$ -ARE riportergén transzlációjának erősítéséhez (Vasudevan és mtsai. és mtsai., 2007). Ezzel ellentétben, a folyamatosan osztódó sejtekben miR-396-3p gátolja a transzlációt. A transzlációs gátlásból transzlációs iniciációba való átkapcsolás kulcsmolekulája az FXR1. Szérum éhezteskor FXR1 szolúbilisabb formában van jelen, és könnyebben köt Ago2-höz. Ezáltal kialakul egy új miRNS végrehajtó komplex, ami ugyanazokon a targeteken hat, de ellentétes hatású, és elősegíti a cél mRNS-ek transzlációját (Vasudevan és mtsai., 2008).

A transzlációs gátlás mellett mindinkább előtérbe kerül a mRNS-ek kevésbé vizsgált funkciója, a cél mRNS-ek degradációja (Guo és mtsai.). Egyes megfigyelések szerint a miRNS-ek transzlációs szintű gátlásáért mintegy 80%-ban a mRNS lebontása felelős. A miRNS-eknek ezt a tulajdonságát jól lehet használni a target predikció területén. A miRNS mintázat és a mRNS *array*-ek eredményeinek összevetése sokszor nem csak az indirekt targeteket mutatja meg, hanem az egyes miRNS-ekkel negatív expressziós korrelációt mutató mRNS-ek adják a valószínű *in vivo* targetek halmazát is (Radfar és mtsai.).

## 2.2.4 A miRNS-ek szabályozó funkciója

### **Default gátlás**

A cél mRNS *default* gátlása azt jelenti, hogy a miRNS biztosítja, hogy az adott gén csak a megfelelő szignál jelenlétében expresszáljon, a szignál hiányában a miRNS közvetett módon represszálja a fehérje kifejeződését. Ennek hatása általában transzkripciós szintű. Tipikusan a target gén promóterén egy válasz elem (*response element, RE*) található. Ugyanaz az RE felelős a transzkripció gátlásáért és a jel-aktivált expresszióért. A sejt valószínűleg több jelet kap a környezetéből egyidejűleg, amik ellentétesen is hathatnak az adott gén expressziójára. A sejtnak képesnek kell lennie megkülönböztetni a valódi szignált a gyenge vagy rövid ideig ható külső jelektől. A miRNS-ek egyik fő funkciója lehet a szignáltranszdukciós útvonalak pozitív jeleinek tompítása. Ezzel a miRNS-ek növelik a jelküszöböt és biztosítják, hogy a sejt csak a 'bona fide' jelekre reagáljon. A WNT, Hedgehog és Notch jelátviteli útvonalak *default* gátlás alatt állnak. Ennek legjobb példája a WNT útvonal transzkripciós faktorának (TCF) miRNS általi szabályozása. WNT ligand hiányában  $\beta$ -catenin a citoszolban van jelen. Itt foszforiláció jelöli ki a lebontásra. Azonban, ha a WNT útvonal bekacsolásakor a  $\beta$ -catenin a sejtmagba jut, ezzel elkerüli a foszforilációt és a lebomlást. A sejtmagban aktivációs komplexet képez TCF-el, és legyőzi a transzkripciós korepresszorokat (Clevers és mtsai., 2006). Így megindulhat a WNT által szabályzott gének expressziója. A *Drosophila* miR-8 és ennek gerinces ortológja, a miR-200 család nagyban hozzájárul a WNT útvonal *default* gátlásához, mivel TCF-t és az útvonal több pozitív modulátorát is gátolhatják poszttranszkripcionálisan (pl Wntless vagy Evi) (Kennell és mtsai., 2008).

Hasonlóképpen, miR-324-5p gátolja a Hedgehog útvonalat annak mediátora, a GLH transzkripciós faktor gátlásán keresztül (Jiang és Hui, 2008).

A *default* gátlás nemcsak az *upstream* mediátorokon keresztül valósulhat meg, hanem az útvonal *downstream* transzkripciós targetjeinek gátlásával is. Ennek klasszikus példája *Drosophilában* található, ahol egy redundáns rendszerben a miRNS-ek egy családja (miR-2, miR-7, miR-11 és miR-79) gátolja a Notch útvonal targetjeinek kifejeződését (*Enhancer of split* vagy E(spl) és *Bearded* vagy Brd). Ennek előnye, hogy a miRNS útvonal megakadályozza a Notch útvonal abnormális felépülését az embrionális fejlődés során (Nishino és mtsai., 2008).

A miRNS-ek maguk is lehetnek a *default* gátlás mediátorai. A DNS sérülése során a p53 tumor szupresszort is magában foglaló útvonal végül a sejtciklus leállításához és apoptózishoz vezet. Alapesetben a p53 látens állapotban van jelen a sejtben, és ubikvitináció jelöli ki a degradációra. A p53 szupresszió esszenciális eleme miR-125b, ami közvetlenül hat a p53 mRNS-én. miR-125b hiánya p53 által mediált apoptózishoz vezet. Érdekes, hogy a

genotoxikus kezelés gátolja miR-125b-t, ami azt mutatja, hogy miR-125b szerves része a DNS védelmi hálózatnak (Le és mtsai., 2009).

### **Default aktiváció**

Bár a miRNS-ek alapvetően translációsan gátolnak, a végső hatásuk transzkripciós aktiválás is lehet. Ennek példája a *Drosophila* és az emlősállatok Hippo tumor szupressziós útvonalának szabályozása. A Hippo útvonal sejtproliferációt és apoptózist regulál, aktív állapotban a YAP (Yes-asszociált protein) és a TAZ (*Taffazin*) proto-onkogének gátlásához vezet. A szignáltranszdukciós útvonal foszforilálja a YAP és a TAZ fehérjéket, inaktív állapotban, a citoplazmában tartja a két fehérjét, és gátolja a sejtmagi transzportjukat (Harvey és Tapon, 2007). A YAP és a TAZ foszforilációját a LATS (*large tumor suppressor*) kináz és annak *upstream* regulátora (*Expanded*) végzi. Emberben a miR-372 és a miR-373 gátolja a LATS-ot (Voorhoeve és mtsai., 2006), míg *Drosophilában* az *Expanded* áll a miR-278 repressziója alatt. A miRNS gátlás akadályozza a YAP és a TAZ foszforilációját, ennek eredményeképpen a két proto-onkogén a sejtmagban aktiválja a cél mRNS-ek transzkripcióját.

### **Koherens és inkoherens visszacsatolás**

Koherens visszacsatolásnak nevezzük, ha ugyanazon jel ellentétes módon hat egy adott miRNS-re és annak targetjére, pl. a jel aktiválja a miRNS-t, de gátolja a mRNS-t. Ez a szabályozás tipikusan akkor fordul elő, ha a miRNS feladata egy adott differenciációs irány stabilizálása, tehát a miRNS gátolja az elköteleződési irányhoz nem tartozó mRNS-eket ('leaky' expresszió).

A koherens visszacsatolás logikája egyértelmű (a jel felerősítése és stabilizálása), azonban a transzkriptom elemzése során megfigyelték, hogy a koexpresszáló miRNS-target párok gyakorisága igen nagy, és a miRNS-ek és targetjeik expressziója inkább pozitív korrelációt mutat, mint negatívát. Ez rámutat arra, hogy a koherens visszacsatolás nem a miRNS szabályozásának a fő módja. Az inkoherens visszacsatolás azt jelenti, hogy egy adott jel egyaránt pozitívan (vagy negatívan) hat a miRNS-re és annak targetjére. Ennek a kivitelezésnek két előnye is van: egyrészt, megakadályozza, hogy a szignáltranszdukciós "zaj" aktiválja az útvonalat, mivel csak a megfelelő erősségű szignálok képesek átjutni a miRNS "szűrő" funkcióján. Másrészt a miRNS útvonal így biztosítani tudja egy fehérje egyenletes expresszióját, és kivédi a szignáltranszdukciós útvonalak nem kívánatos, fluktuáló hatását. Tehát, képessé teszi az azonos sejtek csoportját arra, hogy (egy adott mértékű szignáltranszdukciós hatáson belül) a sejtek azonos szinten tartsák a target fehérje



expresszióját. Pl. a pluripotens embrionális őssejtek szigorúan szabályozzák a Nodal kifejeződését, mivel a Nodal aktivitás korlátozza a két ellentétes sejtorsot: a pluripotenciát és a differenciációt. Az Oct4 aktiválja a Lefy-t és az őssejt-specifikus miR-290-295 klasztert, ami represszálja a Lefty-t. A Lefty a Nodal antagonistája, ezáltal a Nodal aktivitás folyamatos és egyenletes expressziót mutat (Choi és mtsai., 2007).

### **Reciprok szabályozás**

Pozitív visszacsatolás lehetséges a gátló miRNS represszálásával. Ez a szabályozás akkor hasznos, ha egy tranziens szignál rögzítése (hosszú idejű sejtválasz) szükséges. Erre példa a sejtek epiteliális plaszticitása. Az epiteliális-mezenchimális tranzíció során (EMT) a sejtek E-cadherin expressziója gátlás alá kerül. Ezzel párhuzamosan motilitással és pluripotenciával kapcsolatos gének aktívan expresszálódnak, és a sejtek elveszítik adhéziós képességüket. EMT normális része az embriogenezisnek és a felnőtt szöveti átalakulásnak, de az epitélium-eredetű tumorokban is végbemegy (Polyak és Weinberg, 2009). A miR-200 család gátolja az E-cadherin, a ZEB1 és a ZEB2 (*zinc finger E-box binding homeobox 1 és 2*), a TGF $\beta$  útvonal transzkripciós represszorait. Ugyanakkor ZEB1 és ZEB2 transzkripcionális represszió alatt tartja a miR-200-t. A TGF $\beta$  jel az EMT aktivátora, indukálja a ZEB1-et és a ZEB2-t, ezzel egy kettős gátló hurok alakul ki. Ha a miR-200 koncentrációja a küszöbérték alá esik, az blokkolja EMT-t (Bracken és mtsai., 2008).

Egy másik érdekes példa a reciprok szabályozásra a differenciálódás és pluripotencia közötti átmenet regulációja. Az Oct4 közvetlenül gátolja a miR-145 expresszióját a promóter régióon keresztül. A miR-145-nek azonban közvetlen targetje az Oct4 és számos más, pluripotenciával kapcsolatos mRNS (Sox2 és Klf4). A BMP útvonal bekapcsolása represszálja az Oct4-et, ezzel túlsúlyba kerül a miR-145 hatása, ami elősegíti a differenciálódást (Xu és mtsai., 2009b).

### **2.2.5 A miRNS-ek szoros tér- és időbeli szabályzása alatt állnak**

Számos miRNS expressziója szabályzott térben és időben. A *Drosophila* let-7 és miR-125 (lin-4 ortológ) a lárva-felnőtt állat tranzíció során expresszál csakúgy, mint a let-7 *C. elegans*-ban (Bashirullah és mtsai., 2003). Gerincesekben a let-7 és a miR-125 nincs jelen az embrionális őssejtekben, az embrióban vagy az embrionális carcinoma (EC, *embryonic carcinoma*) sejtekben, csak az egyedfejlődés késői szakaszában jelennek meg. EC sejtek neurális differenciáltságkor és az egér egyedfejlődése során a lin-4 családba tartozó miR-125 a let-7 előtt jelenik meg, csakúgy, mint nematoda (fonalféreg) *C. elegans*-ban (Rybak és mtsai., 2008). A Lin-41 és a lin-28 ortológjai is időben szabályzottan expresszálódnak, a let-7-el

és a miR-125-el reciprok módon (Vella és mtsai., 2004). Fontos még megjegyezni, hogy a lin-41 a let-7 konzervált targetje emberben, egérben, csirkében, zebrahalban, *Drosophilában* és fonálféregben, a lin-4/miR-125 és a let-7 pedig közvetlenül hat a lin-28 mRNS 3'UTR-én emlőszövetekben és *C. elegans*-ban (Reinhart és mtsai., 2000).

A *C. elegans* 'seam sejtei' minden lárvális állapot elején aszimmetrikus osztódáson mennek keresztül. Ennek eredménye egy anterior sejt, ami differenciálódik, valamint egy poszterior sejt, ami megőrzi pluripotens tulajdonságait. A seam sejtek szimmetrikus osztódással önmegújításra képesek, további seam sejteket hoznak létre, ezért a seam sejtek az őssejtek egyszerű modelljének tekinthetők. A Let-7 a sejtciklusból való kilépés és differenciálódás konzervált szabályzója. *C. elegans* let-7 mutánsban a seam sejtek nem képesek kilépni a sejtciklusból a megfelelő időben, és egy számon felüli ciklus után indul csak meg a differenciálódásuk (Frasch és mtsai., 2008). Ember tumorsejtvonalakban a let-7 közvetlenül a sejtciklus szabályzó gének represszálásával (Ciklin D2, CDK6, CDC25) gátolja a proliferációt (Johnson és mtsai., 2007). Tüdő- és mellrák vonalakban kimutatták a let-7 tumorszupresszor aktivitását (O'Day és Lal). Emberben és nematodában a let-7 közvetlen targetjei a RAS és a HMGA2 onkogének (Park és mtsai., 2007). A Let-7 exogén expressziója csökkenti a tumornövekedést valószínűleg az onkogén RAS és HMGA2 faktorokon keresztül. Ismert az is, hogy a let-7 expressziója számos tumorvonalban igen alacsony, bár ez talán annak a következménye, hogy az összes miRNS jelenléte csökkent a tumorok többségében (Lu és mtsai., 2005). A Let-7 tumorszupresszor képességét bizonyítja, hogy exogén expressziója egér emlő epitél progenitor sejtvonalban az önmegújításra képes (progenitor) sejtek elvesztéséhez vezet (Ibarra és mtsai., 2007).

A LIN-28 egy RNS-kötő fehérje, amely tartalmaz egy cink-ujjas (*zinc finger*) domént (CCHC) és egy hidegsokk domént. Először *C. elegans*-ban írták le, mint az egyedfejlődés egyik időbeli koordinátorát (Moss és mtsai., 1997). A Lin-28 mutánsok az L1 lárvastádium után azonnal L3-ba lépnek, így felnőtté alakulásuk is egy-két stádiummal korábban megy végbe. Hipodermiszükben kevesebb seam sejt található, ezek proliferációja lassabb, és hamarabb differenciálódnak (Morita és Han, 2006). A Lin-4 mutációja, vagy a LIN-28 3' UTR deléciója helyreállítja a LIN-28 expressziós szintjét, és menti a lárva fenotípusát. A Lin-28 a lin-4 és a let-7 közvetlen targetje *C. elegans*-ban, és ez a szabályozási mód konzervált emlősökben is, ahol a lin-28 a lin-4 ortológ miR-125 és a let-7 targetje (Nimmo és Slack, 2009). Érdekes, hogy a let-7 és a lin-28 szabályozásában egy kettős gátló hurok alakult ki. Nem csak a let-7 represszálja a lin-28-at, hanem a lin-28 is gátolja a let-7 biogenezisét. Valószínűleg a LIN-28 a let-7 prekursor hajtű kanyarulatába köt a pri-, vagy pre-mRNS-en, ezzel gátolja Drosha vagy Dicer endonukleáz aktivitását, ami elengedhetetlen a miRNS

keletkezéséhez. A LIN-28 a P-testecskékhez asszociál, ezért felmerült az a lehetőség is, hogy a let-7-hez való kötés után a pre-let-7-et a P-testecskékbe irányítja, ahol az degradálódik (Balzer és Moss, 2007). A LIN-28 további érdekessége, hogy az Oct4-gyel, a Sox2-vel és a Nanog-al kombinálva képes iPS sejtet indukálni, valószínűleg a let-7 kötésen/gátláson keresztül (Liao és mtsai., 2008). Emellett a Lin-28 közvetlenül köt számos sejtciklus regulátor 3' UTR- régiójához (pl. ciklin A, Ciklin B, Cdk4) (Xu és mtsai., 2009a). Mivel a LIN-28 specifikusan az őssejtekben expresszál, elősegíti az iPS sejtek képződését, és gátolja a tumorszupresszor let-7 miRNS-t, nem meglepő tehát, hogy a tumorbiológia egy fontos fehérjéje. A LIN-28B (LIN-28 egy paralógja) fokozottan expresszál hepatocellulás karcinóma sejtekben (Wang és mtsai.), a jól ismert Myc tumor faktor pedig indukálja a LIN-28B kifejeződését humán B limfóma modellben, és egér vastagbél rák modellben (Chang és mtsai., 2009). A LIN-28B tumorinduktor tulajdonsága minden esetben (legalább részlegesen) a let-7 szupresszió alapszik. Továbbá ismert, hogy a LIN-28 a citoplazmában lokalizált, de a sejtciklus függvényében (S és G2 fázisban) a sejtmagba is juthat hepatocellulás karcinóma sejtekben (Slack és Ruvkun, 1997). Ez felveti annak lehetőségét, hogy a LIN-28 a sejtciklussal összhangban dinamikusan változtatja lokalizációját és funkcióját. A LIN-28 kizárólag differenciálatlan, aktívan oszódó sejtekben expresszál, korai embrionális sejtekben vagy tumorsejtekben. A LIN-28 gátolja az anti-proliferatív let-7 miRNS-t, és elképzelhető, hogy a LIN-28 sejtmagi lokalizációja során akadályozza a let-7 beépülését a miRISC komplexbe, vagy gátolja a let-7 érését a Drosha fehérjén keresztül. Mindezek mellett megfigyelték, hogy a let-7 aktivitása is változik a sejtciklus függvényében. Szintetikus let-7 miRNS-t használva kimutatták, hogy G0/G1 fázisban a let-7 a target mRNS-ek translációját elősegíti. Ugyanakkor aktívan osztódó sejtekben a let-7 a kanonikus módon gátolja a targetek translációját. Ebben a kísérletsorozatban a let-7 szintetikus formában került a sejtekbe, tehát így a LIN-28 gátlását elkerülte.

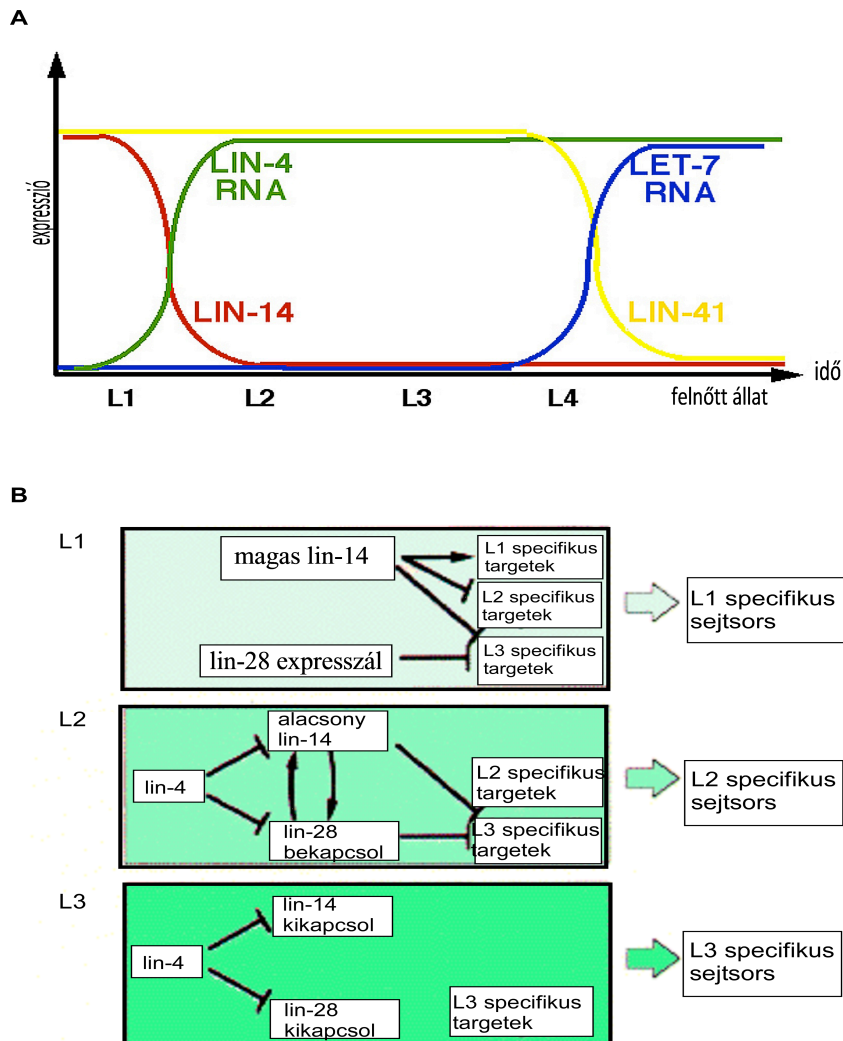
### **2.2.6 A miRNS szabályozás és a pluripotencia kapcsolata**

A heterokronikus géneket tekinthetjük a homeotikus gének időbeli analógiának. A homeotikus gének végzik az RNS és fehérje expresszió térbeli szabályozását, a heterokronikus gének pedig az egyedfejlődés időbeli szabályozásáért felelősek a metazoákban.

Egy genetikai szűrővizsgálat során számos heterokronikus gént izoláltak (Abrahante és mtsai., 1998), köztük a let-7 és a lin-4 miRNS-eket, valamint a lin-28-at, a lin-14-et, a hbl-2-t, a daf-12-t, a lin-29-t és a lin-41-et, melyek többsége a két miRNS közvetlen targetje (Wightman és mtsai., 1993; Lee és mtsai., 1993; Parry és mtsai., 2007). A Let-7 és a lin-4 szükséges a *C.*

*C. elegans seam* sejteinek fokozatos terminális differenciálódásához, illetve az egyes fejlődési lépcsők megfelelő időzítéséhez (Nimmo és Slack, 2009).

Minden lárvális állapotot vedlés követ. Mivel a *let-7* és a *lin-4* számos más heterokronikus gént szabályoznak, kapcsolóként működnek az egyes lárvális stádiumok között. Az L1-L2 átkapcsolást a *lin-4* végzi a *lin-14* gátlásán keresztül (Lee és mtsai., 1993). Az L2-L3 átkapcsolásért a *lin-4* és a *let-7* család felelős (miR-48, miR-84 és miR-241), a *lin-28* és a *hbl-1* expresszióját represszálják (Abbott és mtsai., 2005) (4. ábra). Végül az L4 lárvastádiumból felnőtt állattá való vedlést a *let-7* szabályozza a *lin-41* és a *hbl-1* gátlásával (Roush és Slack, 2009). A *Daf-12* valószínűleg a hormonális szignálok integrációjáért felelős és időzíti a *lin-28* gátlást (Seggerson és mtsai., 2002). A miRNS szabályozás utolsó, genetikailag meghatározott láncszeme a *lin-29*, ami egy Krüppel-szerű transzkripciós factor, és a *seam* sejtek terminális differenciálódásához szükséges (Bettinger és mtsai., 1996).



4. ábra *C. elegans* lárvastádiumainak miRNS szabályozása

A legismertebb heterokronikus miRNAs-ek a *C. elegans let-7* és *lin-4* miRNAs-ei. A *lin-4* miRNAs-eknek hét kötőhelye található a *lin-14* gén 3'UTR régiójában. *Lin-4* az első lárvastádiumban kezd expresszálni, és önmagában is elégséges az első lárvastádiumra jellemző *lin-14* fehérje expressziójának gátlásához. *Lin-14*

*expressziójának csökkenése teszi lehetővé azt, hogy a C. elegans átlépjen az első lárvastádiumból a második lárvastádiumba. Let-7 miRNS targete lin-41. Lin-41 gátlása szükséges ahhoz, hogy az embrió a negyedik lárvastádiumból kilépjen és felnőtt állattá váljon. Let-7 miRNS expressziója azonban lin-28 fehérje gátlása alatt áll a harmadik lárvastádium végéig. Lin-28 képes arra, hogy hajtűkanyar másodlagos szerkezetű let-7 prekursorhoz kössön, és ezáltal megakadályozza az érett let-7 miRNS-ek kialakulását.*

A miRNS-eket, mint tumorszuppresszorokat, vagy mint tumor induktorokat, egyre többször hozzák kapcsolatba rákos megbetegedésekkel. A Let-7-nek két fontos szerepe ismert: a fejlődési stádiumok időzítése az egyedfejlődés során, emellett számos sejtvonalban tumorszuppresszorként működik. Mindez felveti azt a lehetőséget, hogy a *C. elegans*-ból ismert egyéb heterokronikus gének is rendelkeznek tumorszuppresszor tulajdonsággal (Cho, 2007). Nem nehéz elképzelni, hogy a proliferáció és differenciálódás időbeli szabályozásának felbomlása az éretlen, multipotens sejtek felszaporodásához vezet. Ezt támasztja alá a tumorössejt hipotézis is, miszerint a tumorsejtek egy kevés sejtet tartalmazó, alacsony differenciálódási szintű sejtpopulációból (tumorössejtek) aszimmetrikus osztódás révén származnak (Rapp és mtsai., 2008). Az össejtek egy hierarchikusan egymásra épülő lépéseket tartalmazó programon keresztül érik el végdifferenciált állapotukat. A sejtek sorsa pedig szorosan összefügg a proliferáció, elköteleződés, differenciálódás ésérés időbeli koordinációjával. A tumorsejteket tekinthetjük úgy, mint olyan sejteket, amik nem képesek az egyik fejlődési stádiumból a következőbe lépni, vagy ez a lépés nem zajlik le a megfelelő időben, vagyis a tumorsejtek heterokronikusan hibás sejtek.

### **2.2.7 A miRNS-ek és az emlős embrionális össejtek kapcsolata**

A miRNS útvonal szerepét az embrionális össejtek pluripotens képességének megtartásában, a miRNS biogenezisben deficiens egér sejtvonalon és állatokon tanulmányozták. A Dicer a miRNS-ek és siRNS-ekérésében is részt vesz, míg a DGCR8 nem szükséges a siRNS-ek kialakulásához (Babiarz és mtsai., 2008). A Dicer null egér ES sejtek lassan osztódnak és nem képesek effektíven differenciálódni (Kanellopoulou és mtsai., 2005; Cao és mtsai., 2009; Suh és mtsai.). Embriótestecske kialakulásakor az Oct4 expresszió csak részlegesen csökken, és nem figyelhetők meg a mezoderma és endoderma irányú elköteleződés markerei. A DGCR8 null ES sejtek *in vitro* differenciálódása szintén hibás, differenciáltatáskor nem képesek a pluripotencia markerek visszaszorítására, és az elköteleződésre jellemző gének abnormális aktivációt mutatnak (Wang és mtsai., 2008). A DGCR8 sejtek felhalmozódnak a sejtciklus G1 fázisában, ami arra utal, hogy a miRNS útvonal szükséges a normális sejtosztódáshoz és az össejtekre jellemző sejtciklus mintázat fenntartásához/felállításához (Wang és Blelloch, 2009).

A közelmúltban világossá vált, hogy egyes miRNS-ek a Sox2, az Oct4 és a Nanog által szabályzott génhálózat elemei. Az Oct4, a Sox2 és a Nanog közvetlenül, a promóterhez kötve regulálja az összejt specifikus miRNS-ek expresszióját (Wei és mtsai., 2009). Ezáltal nem csak a miRNS koncentrációt állítják be, hanem felhasználják a miRNS-eket saját targetjeik finom szabályozására is koherens és inkoherens visszacsatolásokon keresztül.

A Blelloch laboratórium munkájából ismert, hogy a DGCR8 null egér ES sejtek sejtciklusa abnormális. A csoport komplementációs teszttel kereste azokat a miRNS-eket, amelyek képesek a sejtciklus helyreállítására. Ezen miRNS-ek közé tartozik a miR-291a-3p, a miR-291b-3p, a miR-294, a miR-295 és a miR-302 (Wang és mtsai., 2008). Az említett miRNS-ek, valamint a humán miR-92b valószínűleg a G1-S tranzíció előremozdításával járulnak hozzá az állandó és gyors osztódáshoz, ami alapvető jellemzője a pluripotens sejteknek. A miR-92b egyik lehetséges targetje a sejtciklus szabályzó p57 (Cdk inhibitor) (Sengupta és mtsai., 2009), míg a miR-290-295 klaszter lehetséges targetjei közé tartozik a ciklin E-Cdk2 inhibitor p21 (Wang és mtsai., 2008), a Rbl2 (Benetti és mtsai., 2008; Sinkkonen és mtsai., 2008) és a Lats2 (Voorhoeve és mtsai., 2006). Fontos még megemlíteni, hogy a Sox2 és az Oct4 pluripotencia faktorok képesek asszociálni az egér miR-92b promóterével (Marson és mtsai., 2008), és valószínűleg részt vesznek az egér ES sejt fenotípusának kialakításában. A Sox2, az Oct4 és a Nanog tehát a miRNS-eken keresztül valósítja meg a targetek finom szabályozását. Számos inkoherens és koherens visszacsatolással olyan miRNS-eket szabályoz, amik pl. a Lefty1, a Dnmt3a és a Dnmt3b fehérjeszintjét módosítják. (Sinkkonen és mtsai., 2008; Benetti és mtsai., 2008). Két, egymástól független tanulmány mutat rá, hogy a miR-290 család szükséges az ES sejtek *de novo* metiltranszferáz aktivitásának felépüléséhez. A Dicer null mutáns ES sejtek differenciálódási elégtelenségének egyik oka az, hogy Dicer hiányában az Oct4 promóter metilálása hiányos (Benetti és mtsai., 2008; Sinkkonen és mtsai., 2008).

A miR-290-295 család mellett az embrionális összejték másik fő miRNS-e a let-7. Bár let-7 érett formában nincs jelen a pluripotens sejtekben, promóteréhez Sox2, Oct4 és Nanog transzkripciós faktorok kötődnek, és pri-miRNS formában a let-7 expressziója nagymértékű (Marson és mtsai., 2008). A Let-7 érését a LIN-28 gátolja. A LIN-28 szükséges az ES sejtek megfelelő sejtosztódásához (Rybak és mtsai., 2008) és az Oct4 effektív transzlációjához. Egy kettős visszacsatolással az érett let-7 gátolja a Lin-28 transzlációját, ezzel a Lin-28 és a let-7 egy kapcsolót képez a pluripotens embrionális összejték és a differenciálódás között. A c-Myc is szerepet kap az ES sejtek önfenntartó képességének kialakításában, és a Lin-28 aktiválásán keresztül negatívan szabályozza a let-7 biogenezisét (Chang és mtsai., 2009). Hasonlóan a Lin-28/let-7 szabályozáshoz, az érett let-7 miRNS közvetlenül gátolja c-Myc expresszióját. A Let-7 nem csak a Lin28, c-Myc, Sall4, Oct4, Nanog és Sox2 pluripotencia faktorokat

szabályozza negatívan, hanem a sejtciklus pozitív regulátorait (CDK6, CDC25, CiklinD) is humán tumorokban (Johnson és mtsai., 2003), valamint más miRNS-eket is (miR-107, miR143, miR296) (Heo és mtsai., 2009). Továbbá ismert, hogy a c-Myc kötődik a miR-290-295 klaszter promóteréhez és direkt módon aktiválja a klaszter kifejeződését (Chen és mtsai.). A c-Myc a miR-141, a miR-200 és a miR-429 promóteréhez is kötődik, és indukálja expressziójukat (Lin és mtsai., 2009).

Yamanaka csoportja 2006-ban sikeresen programozott differenciált testi sejteket pluripotens sejtekké (Takahashi és Yamanaka, 2006). Ezt a mechanizmust átprogramozásnak (*reprogramming*) hívjuk, a keletkezett sejtek az iPS sejtek. Újraprogramozás során a differenciálódott sejtekben a pluripotencia markerek egy csoportját expresszáltatják. Az újraprogramozás eredeti faktor kombinációja a Sox2, Oct4, Klf4 és c-Myc volt, de az elmúlt négy évben számos más kombináció is sikeresnek bizonyult (Yu és mtsai., 2009). Mivel miR-290-295 klaszter kivédi a DGCR8 knockout egér ES sejtciklusbeli változásait, érdekes kérdés, hogy a miR-290-295 klaszter szükséges eleme-e az újraprogramozásnak. Judson és mtsai. egér embrionális fibroblasztban a Sox2, Oct4, Klf4 mellett negyedik faktorként különböző miRNS-eket expresszáltak, és az újraprogramozás hatékonyságát vizsgálták. A miR-290-295 klaszter tagjai, különösen a miR-294, nagy mértékben elősegítették a pluripotencia visszaállítását (Judson és mtsai., 2009). A miR-294 ezen felül emelte a sejtek endogén Sox2, Oct 4 és Klf4 szintjét, azaz stabilizálta (az exogén faktoroktól függetlenül) a pluripotens állapotot.

Egy másik érdekes kísérlet a let-7 szerepét világítja meg. Melton és mtsai a Sox2, Oct4 és Klf4 faktorok mellett let-7 antiszensz inhibitorral kezelték a differenciált sejteket (Melton és mtsai., 2010). A Let-7 inhibitor hatására megemelkedett a Sox2, Klf4 és Oct4 expresszió, de a Sox2, Klf4, Oct4 és c-Myc együttes hatását nem tudta tovább növelni a let-7 antagonist, ami alátámasztja, hogy az újraprogramozás fontos eleme a let-7 targetek (c-Myc, LIN28) gátlás alól való felszabadítása. A p53 korlátozza az újraprogramozást, míg a p53 deléciója növeli az iPS sejt képződés hatékonyságát (Banito és mtsai., 2009). A p53-ról kimutatták azt is, hogy fokozza egyes miRNS-ek (pl. miR-145) érését humán fibroblasztban, valamint, hogy kötődik a miR-145 promóteréhez. A miR-145 előmozdítja a sejtek differenciálódását, mivel gátolja a Sox2, az Oct4, a Klf4 és a c-Myc expresszióját (Sachdeva és mtsai., 2009). Ezek alapján lehetséges, hogy a miR-145 p53-on keresztül szabályozza az újraprogramozást, azonban ennek vizsgálata nehéz, hiszen a p53 deléciós sejtek genetikailag rendkívül instabilak.

### 2.2.9 miRNS törlés vagy miRNS csali (miRNS *sponge* vagy *decoy*)

Számos csoport jelezte, hogy adott endogén miRNS vagy miRNS család telíthető mesterséges targettel. Ilyenkor expresszálják (pl. egy riporter konstrukcióban) vagy szintetikus formában a sejtbe juttatják a választott miRNS target szekvenciáját vagy teljes komplementer szekvenciáját. A nagy koncentrációban jelenlevő, nagy affinitású mesterséges target (miRNS csali) legyőzi a miRNS endogén, természetes targetjeit, ezzel gátolja a miRNS funkcióját. (Care és mtsai., 2007; Gentner és mtsai., 2009). Ezt a technikát miRNS törlésnek (*sponge*, *decoy*, *antagomir*, *eraser*) nevezték el, és az endogén miRNS funkció vizsgálatának fontos eszközévé vált. A célsejtbe juttatásra használható expressziós vektor (adenovírus, retrovírus, lentivírus) képes kell, hogy legyen a fokozott expresszió biztosítására (Ebert és mtsai., 2007; Scherr és mtsai., 2007). Elterjedt az erős (általában virális) promóterek, illetve a miRNS target tandem ismétlődő formájának használata. A riporter gén beépítése szintén hasznos, hiszen mutatja a miRNS telítettség elérését. A miRNS törlés stratégiának több előnye is van a transzgenikus *knock out* megközelítéssel szemben. Először is könnyebben lehet alkalmazni, másodsorra vizsgálhatók olyan miRNS-ek, amik a fehérje kódoló gének intronjáról keletkeznek (ez adja az összes miRNS mintegy 40%-át), harmadszorra, egyszerre lehet funkcionálisan gátolni a különböző genomi lókuszon elhelyezkedő miRNS családtagokat.

A nem-vektor alapú miRNS gátlás történhet antagomirrel. Az antagomirek szintetikus, nagyon stabil, koleszterin konjugált oligonukleotidok, melyek a vizsgált miRNS antiszensz szálának utánszámai (Krutzfeldt és mtsai., 2005; Scherr és mtsai., 2007). Alkalmazhatók *in vitro* és *in vivo*, hosszú távú hatásukhoz azonban többszöri bejuttatás szükséges.

Mindkét technikának vannak hátrányai. A vektor alapú gátláshoz elengedhetetlen a magas kópiaszámú vagy erőteljesen expresszáló vektor alkalmazása. Ez sok sejtípus esetében technikailag nehéz, valamint az erős transzgen expresszió toxikus lehet. Előfordul, hogy a transzgen fokozott expressziója sem elég az endogén miRNS-ek teljes telítéséhez/gátlásához. Ezért számos esetben a miRNS funkciójának leírásához elengedhetetlen a genetikai *knock out* elkészítése.

### 2.2.8 A miRNS-ek terápiás felhasználásának lehetőségei

A miRNS-ek terápiás felhasználása ma még csak állatmodellekre korlátozott. A használt módszerek alapja, hogy ha egy specifikus miRNS targetet építünk a transzgenbe vagy vírusvektorba, a transzgen expressziója az adott miRNS-t tartalmazó sejtekben korlátozott. Ez első hallásra meglepő, mivel a miRNS-ek egyesével általában nem képesek nagy mértékben



hatni a target expressziójára. Azonban több kísérletben nyert bizonyítást, hogy endogén, erősen expresszáló miRNS-eket használva a transzgén expressziója vagy a vírusreplikáció a megfelelő targetkonstrukció használatakor bizonyos sejtekben század részére csökkent (Yang és mtsai.; Couto és High; Bell és Kirn, 2008). A génterápia egyik legfontosabb feltétele, hogy a transzgént csak a megfelelő sejt vagy sejtípus expresszálja. Ezt általában a vírus vagy vírus partikulum boríték- vagy a kapszid fehérjéjének módosításával, vagy a promóter megválasztásával próbálják szabályozni. A vírusfehérje módosítása azonban negatívan hathat a vírus stabilitására, fertőzőképességére vagy replikációjára. A kívánt promóter előállítása többnyire nehéz, és a két stratégia közös hátránya, hogy nem képesek teljesen a transzgén expressziójának teljes korlátozására. A miRNS-ek alkalmazásának egyik lehetősége a transzgént hordozó vektorok expressziós specifikusságának növelése. Számos hepatocita specifikus promóter APC (*antigen presenting cells*) sejtekben is aktív. Ez azért fontos, mert az APC sejtekben a transzgén endogén expressziója esetén a transzgenről keletkezett peptidek nagy hatásfokkal hatnak kölcsön az MHC I és MHC II molekulákkal. Ezáltal az APC sejtek mint antigént mutatják be a transzgén peptideket a CD4 T sejteknek, és elindítják a T sejt immunválaszt a transzgén terméke ellen. Emellett a vektor bizonyos elemei elősegítik az APC sejtek érését (Schmitt és mtsai.). Például a hemofília B (IX faktor knockout) egérmodell kezelésekor a hepatocita specifikus promóterrel bíró IX faktornak lenti-vírus általi bevitele IX faktor ellenes választ indukál, ami a transzdukált hepatociták elvesztéséhez vezet. Ennek megelőzésére Brown és munkatársai négy kópiát építettek az APC specifikus miR-145-3p targetból a IX faktor 3' UTR régiójába. *In vitro* és *in vivo* a transzgenikus egér IX faktor expressziója század részére csökkent az APC sejtekben, míg a hepatociták továbbra is magas szinten expresszálták a transzgént. (Brown és mtsai., 2007a). A vektorok miRNS alapú, sejtspecifikus gátlását sikeresen alkalmazták arra, hogy a transzgén szelektíven csak a neuronokban és ne az asztrocitákban (Colin és mtsai., 2009), a pluripotens, de ne a differenciált embrionális őssejtekben (Sachdeva és mtsai.), az érett, de ne az éretlen dendrikus sejtekben expresszáljon (Pegtel és mtsai.). Ezek a tanulmányok alátámasztják, a miRNS útvonal fontosságát a génexpresszió finom szabályozásában. Egyes kutatócsoportok nagy reményeket fűznek az onkolitikus vírusok tumorterápiás alkalmazásához. Az onko-vírusok olyan vektorok, melyek egy önmegsemmisítő gént tartalmaznak. Mint sok más terápiás megközelítésnek, az onko-vírusok alkalmazásának is a legfőbb korlátja a vírus megfelelő sejtekbe való juttatása. Mivel egyre jobban ismert a tumor sejtek és a normál sejtek miRNS mintázata, az egészséges sejtek specifikus miRNS-ei talán felhasználhatókká válnak az onkovírus expresszió korlátozására. A vírusok sejt-specifitásának regulációjára példa az a Coxsackie vírus, melybe miR-133 és miR-206 target helyeket építettek (Kelly és mtsai.,

2008). Mindkét miRNS fokozottan expresszál izomsejtekben, de nincsenek jelen mieloma sejtekben. Ha a mieloma modell egeret a módosított Coxsackie vírussal fertőzték, a vírus csak a mieloma sejteket ölte meg, míg a miR-206 és a miR-133-at expresszáló izomsejtek épek maradtak. Hasonló módon létrehoztak onkolitikus miR-122 targetet tartalmazó adenovírust is, mely nem okozott vezikuláris stomatitist a májsejtekben (Ylosmaki és mtsai., 2008). Fontos azonban megjegyezni azt is, hogy akad példa arra is, hogy az onkolitikus vírus egy új mutációval rezisztenssé válhat, valamint, hogy sokszor az endogén miRNS szint nem elég magas a vektor visszaszorításához (Wong és mtsai.). Az endogén miRNS-ek (főleg a magas expressziót mutatók) tehát felhasználhatók a vektorok sejtspecifikusságának növelésére, azonban hasznos lehet, ha alkalmazásukat más vírusgyengítési stratégiával kombináljuk.

A fent leírt miRNS alapú expressziós gátlás természetesen felhasználható bármilyen transzgén szabályozására, és fontos technikává válhat, ha a transzgén expresszióját gátolni szeretnénk bizonyos sejtekben, vagy adott fejlődési szakaszokban. A transzgén szabályozásának eddig használt módjai leginkább a transzkripció szintjét célozzák a különböző promóterek alkalmazásával. A promóterek azonban sokszor nem teljesen specifikusak; vagy természetes körülmények között is több sejttípusban indítják az expressziót. Erre példa a CD21A promóter, amit sokáig használtak, mint B sejt specifikus promótert, ma azonban már ismert, hogy az előagyban is expresszál. (Brown és Naldini, 2009). A Tie2 promóter szintén nem teljesen specifikus, mert nem csak az endotél sejtekben aktív, hanem a HSC-ben (hematopoetikus stem cell) és a monociták egy részében is. (De Palma és mtsai., 2005). Ez számos esetben zavaró lehet (pl. egy Cre transzgén rendszerben), és a promóter valamint a különböző sejttípusok miRNS mintázatának ismeretében a promóter aktivitása tovább korlátozható. Egy nem régi tanulmányban a Tie2 promóter szabályozása alatt a transzgént miR-142-3p targethellyel építették össze. A transzgenikus egerekben a transzgén aktívan expresszált endotél sejtekben, míg HSC sejtekben nem tudtak kimutatni transzgén expressziót. Ez, és több más riportergénes kísérlet bizonyítja a miRNS targeting létjogosultságát a transzgenikus kutatásokban. (Pucci és mtsai., 2009).

Természetesen felmerül a kérdés, hogy a mesterséges targetek nem telítik-e az endogén miRNS *pool*-t, és ezzel nem interferálnak-e a felhasznált endogén mRNS természetes funkciójával. Erre utaló jeleket eddig nem tapasztaltak, amikor a miRNS targethelyet a transzgén finom szabályozására használták fel (Brown és mtsai., 2006). Azonban több csoport is jelezte az endogén miRNS *pool* telítését, amikor a transzgént a fiziológiai körülményeknél fokozottabban expresszálták (Brown és mtsai., 2007b; Doench és mtsai., 2003).

### 3. Anyag és módszer

#### 3.1 ES sejt tenyésztés

Az R1 (Nagy és mtsai., 1993) ES sejteket mitomycinnel kezelt egér embrionális fibroblaszt sejteken növesztettük. Sejttenyésztő tápoldatként módosított Dulbecco's Eagle médiumot használtunk (KO-DMEM médium, Gibco), amit a következő komponensekkel egészítettünk ki: Glutamax (Gibco, 100x), 50 µg/ml streptomycin (Sigma), 50 U/ml penicillin (Sigma), 50mM β-mercaptoethanol (Sigma), 0,1mM nem-esszenciális aminosavak (Gibco), 1000 U/ml leukémia gátló faktor (LIF)(ESGRO) és 15% magzati borjú savó (FBS, vagy *fetal bovine serum*, HyClone). Két nappal a mérések előtt (proliferációs teszt, *in vitro* differenciáltatás, kolónia esszé, transzfektálás, luciferáz aktivitás mérés, RNS izolálás) az ES sejteket 0,1%-os zselatinnal (Sigma) kezelt petri-csészékre (Greiner) helyeztük.

#### 3.2 *In vitro* differenciáltatás

Az ES sejteket transz-retinsav jelenlétében a módosított 4-/4+ indukciós protokollt követve (Bain és mtsai., 1995) neurális irányba differenciáltattuk. A neurális indukció előtt a sejteket 0,1%-os zselatinnal (Sigma) kezelt petri-csészékre (Greiner) helyeztük 24 órára. Az R1 sejteket (n=200) függőcsepp tenyészetben aggregáltattuk két napig, majd a kapott embrionális testecskéket (EB csomókat) bakteriális Petri-csészékbe helyeztük, differenciáltató tápoldatba (KO-DMEM médium, kiegészítve az alábbi komponensekkel: Glutamax, 50 µg/ml streptomycin, 50U/ml penicillin, 50mM β-mercaptoethanol, 0,1mM nem-esszenciális aminosavak, és 10% FBS). Az EB csomókat két naponta új Petri-csészébe és friss tápoldatba helyeztük. Transz-retinsav kezelést alkalmaztunk  $10^{-6}$  M koncentrációban (Sigma) négy napig, a negyedik és nyolcadik nap között. A nyolcadik napon az EB csomókat zselatinnal fedett csészékre helyeztük. Két független, párhuzamos differenciáltatást végeztünk.

#### 3.3 Immunofluoreszcens analízis

A sejteket fedőlemezekben tenyésztettük, majd a médium eltávolítását követően PBS-el mostuk, szobahőmérsékleten. A sejteket 4% paraformaldehidben (PFA, Sigma) fixáltuk 10 percig szobahőmérsékleten, majd 0,5% BSA (bovine serum albumin, Sigma) tartalmú PBS oldattal mostuk. A blokkolást 1% BSA-val kiegészített PBS oldatban végeztük 30 percig. A mintákat egész éjszakán át inkubáltuk az elsődleges antitesttel 4°C-on, a másodlagos antitestet egy órán keresztül inkubáltuk a mintákkal szobahőmérsékleten. Az alábbi elsődleges

antitesteket használtuk: nestin (patkány 401, 1:3, Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA),  $\beta$ III tubulin (G7121, 1:2000, egér IgG, Promega), nanog (963488, 1:10, kecske IgG Promega), Kdr (AF644, 1:10, kecske IgG Promega), brachyury (AF2085, 1:10, kecske IgG, R&D Systems), 1 mg/100 ml koncentrációban. Másodlagos antitestként Cy3-al konjugált anti-kecske IgG-t és anti-egér IgG-t (Jackson ImmunoResearch, USA) használtunk 1:400 hígításban. A sejtmagokat DAPI tartalmú Vectashield mounting médiummal (Vector Laboratories) festettük, fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk (Zeiss, Nikon).

### **3.4 Western blot analízis**

Western blot analízishez a sejteket 6 cm átmérőjű Petri-csészében tenyésztettük. A sejteket lekapartuk, majd PBS-el mostuk, ezt követően pedig a lecentrifugáltuk a sejteket, majd proteáz inhibitor tartalmazó RIPA pufferbe vettük vissza (sc-24948, Santa Cruz). A sejtlizátumot tüvel és fecskendővel áttörtük, majd megmértük a fehérjekoncentrációt. A sejtmentes fehérje extraktumból 25 mg-ot 10%-os SDS-PAGE gélen futtattunk meg. A fehérjéket PVDF membránra blottoltuk 80V feszültséggel, egy éjszakán keresztül. A membránokat BlottoA (Santa Cruz) blokkolóban áztattuk 0,1% TWEEN jelenlétében, majd anti-FBXL5-t (FBXL5 H-300, Santa Cruz) nyúlban termeltetett ellenanyag, 1:100 hígításban, sc-134984) vagy anti-GAPDH-t (Anti-GAPDH, nyúlban termeltetett ellenanyag, 1:5000 hígításban. Sigma G9545) tartalmazó oldatban 1 órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten. A membránokat háromszor mostuk, egyenként 10 percig, majd a tormaperoxidáz alapú másodlagos ellenanyaggal kezeltük (NA9340, Amersham, 1:3000 hígításban). A jelet ECL reagenssel (Roche) hívtuk elő, és ImageJ szoftverrel kvantifikáltuk.

### **3.5 Proliferációs esszé**

A sejtek proliferációs képességét az EZ4U (Biomedica, Bécs, Ausztria) kittel határoztuk meg a gyártó leírását követve. Röviden: 96 lyukú plate-be  $10^3$  sejt/lyuk sejtet tettünk ki ES tápoldatba. A sejtek egész éjszakai inkubálást követően letapadtak, majd kromogén anyaggal festettük a sejteket 2 órán keresztül, és 450 nm hullámhosszon detektáltuk az abszorbanciát három párhuzamos méréssel. A grafikonok a mérések átlagértékét mutatják a  $\pm$  szórás értékekkel. A proliferációs mérésekhez a sejteket zselatinon tenyésztettük 3 napig 15% vagy 2% FCS-sel kiegészített ES tápoldatban.

### 3.6 Kolónia képzés mérése (kolónia esszé)

A kolónia formálási képesség meghatározásához 500 sejtet helyeztünk 12 lyukú csészékbe (Nunc) majd 5 nap elteltével a kolóniákat alkalikus foszfátáz (AP) aktivitás kimutatására festettük (Wobus és mtsai.és mtsai., 1984). A kolóniákat megszámloltuk, majd morfológiai megjelenésük szerint (differenciált vagy nem differenciált) csoportosítottuk. Nem differenciáltak tekintettük azokat a kolóniákat, amelyek kizárólag AP pozitív sejteket tartalmaztak. Differenciáltak tekintettük azokat a kolóniákat, melyek kizárólag AP negatív sejteket tartalmaztak.

### 3.7 Sejtciklus analízis

A sejteket etanollal fixáltuk, propidium-jodiddal festettük majd FACSCalibur áramlásos citometriai készüléken (Becton Dickinson, San Jose, USA) mértük CellQuest 3.1 (Becton Dickinson) programcsomagot használva. Minden minta esetében 20000 sejtet vettünk figyelembe. A sejtciklus fázisok meghatározásához WinMDi és Cyclhred programcsomagokat használtunk.

(<http://beren.ml.uwcm.ac.uk:5080/UWCM/study/medicine/haematology/cytonetuk/software.htm>)

Az apoptotikus sejtek méréséhez a sejteket propidium-jodiddal és FITC–Annexin V-el (BD Biosciences Pharmingen) jelöltük és áramlásos citométerrel mértük. A propidium-jodid negatív és Annexin V pozitív sejtek populációja korai apoptózist mutat.

### 3.8 Statisztikai analízis

A kísérleteket (ha külön nem jeleztük) legkevesebb három párhuzamos sorozatban mértük. A grafikonok az eredmények átlagát és a  $\pm$  szórás értékeket jelölik. Két csoport közti statisztikai szignifikancia kimutatására t-tesztet alkalmaztunk.

### 3.9 DNS elektroporálása ES sejtekbe

Az ES sejteket elektroporálás előtt 1-2 nappal passzáltuk, és 2 órával elektroporálás előtt friss tápoldatba helyeztük. 40  $\mu$ g DNS-t elektroporáltunk  $10^7$  sejt/ml koncentrációjú sejtszuszpenzióba. 250 V feszültség mellett 500  $\mu$ F áramerősségű mtsai.kalmaztunk BioRad GenePulser X-Cell készülékkel. A sejteket ezt követően 10 cm átmérőjű csészékbe helyeztük, a tápoldatot a következő napon cseréltük. A Blaszticidin (10 $\mu$ g/ml, Invitrogen) szelekciót 24

óra elteltével kezdtük, a szelekciós tápoldatot naponta cseréltük, míg az antibiotikum rezisztens kolóniák megfelelő méretűre nem nőttek. Az így kapott rezisztens kolóniákat egyenként 24-lyukú csészébe helyeztük. A jó növekedést mutató kolóniákat felét lefagyasztottuk, másik felét pedig DNS izolálásra használtuk föl, a teljes miR-290-295 klaszter integrációjának ellenőrzésére. A kísérletekhez három (#1, #2, #3) miR-290-295 túlexpresszázó ES klónt, kettő PBS-el elektroporált ES klónt, és három üres vektorral elektroporált klónt (A, B, C) használtunk.

### **3.10 Felhasznált vektorok, klónozások**

Az mmu-miR-290-295 klasztert Long PCR Kit-tel (Fermentas) amplifikáltuk, ezt követően pEF6/V5-His TOPO TA vektorba klónoztuk (Invitrogen) T-A ligálással. A kapott baktérium telepekből DNS-t izoláltunk, és a kit szekvenáló primerjeivel ellenőriztük az integráció irányát a promóterhez képest. Üres és miR-290-295 klasztert tartalmazó baktérium kolóniákból Plazmid Mini Kit-el (Qiagen) izoláltunk nagy mennyiségben DNS-t, majd a kapott vektoriális DNS-t SpeI restrikciós enzimmal emésztettük.

#### **RL-Wee1 és RL-Fbx15 vektorok:**

A Wee1 és az Fbx15 teljes 3'UTR szakaszát ES sejtekből származó cDNS-ből PCR amplifikáltuk, majd a phRL-TK vektor XbaI restrikciós hasítóhelyére klónoztuk. Az így kapott baktérium telepekből DNS-t izoláltunk és BI-L/ampF2490 szekvenáló primerrel ellenőriztük az integráció irányát. A Renilla reniformis luciferáz gént kódoló phRL-TK plazmid Carine Elizalde (Derio, Spanyolország), míg a Photius pyralis luciferázt kódoló pcDNA3-PL (PL) vektor Silhavy Dániel (Gödöllő, Hungary) ajándéka.

#### **A klónozásokhoz az alábbi primereket használtuk (5'-3' irányban):**

Eef1b2 5': GAC TCTA GAA TCA TTC TTA AGT CAG TGC ACT TA

Eef1b2 3': GAT TCT AGA CGA AGG CAT CTA GTG ACA GTT TAT C

Renilla luciferaz 5': ATG GGA TGA ATG GCC TGA TA

Renilla luciferaz 3': CAA CAT GGT TTC CAG GAA GA

mir290-295 5': CTC GCG GGT CTT CAG GGA TAC

mir290-295 3': CAT GTC CCA GTT CCA GGA AAC

T7promoter 5': TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

BGH 3': TAG AAG GCA CAG TCG AGG

Wee1 5': GAC TCT AGA ACT GCT CAC ATT CCC CAG CCC TTC

Wee1 3': GAT TCT AGA ATT TGA GGT CAG TGC AAC CTG ATG

Fbx15 5': GAC TCT AGA GTT CAT ACT GCT CTG TCA CTA CAA TC

Fbx15 3': GAC TCT AGA GAT GTG CAA AAT GAA CTT TAT TTT TC

BI-L/ampF2490: CAA ATA GGG GTT CCG CGC ACA

### 3.11 RNS izolálás és kvantitatív valós idejű RT-PCR (qRT-PCR)

Az RNS izolálás fontos követelménye volt a kis RNS frakció megőrzése, ezért az RNS preparátumokat TriReagent (Sigma) használatával készítettük. A sejtekről eltávolítottuk a tápoldatot, majd a sejteket 1xPBS oldattal mostuk. TriReagent oldatban 10 percig szobahőmérsékleten lizáltuk a sejteket, a lizátumot azonnal felhasználtuk RNS izolálásra, vagy lefagyasztottuk folyékony nitrogénben és -80 °C fokon tartottuk max. 1 hónapig. Az RNS izolálást a gyártó leírása szerint végeztük. A kapott RNS minta koncentrációját Thermo Scientific NanoDrop TM 1000 Spectrophotometer-el mértük, az RNS minőségét TBE-agaróz gélen ellenőriztük. A cDNS szintézishez High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-et (Applied Biosystems) vagy TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit-et használtunk (Applied Biosystems) a kísérlet célja szerint. A cDNS szintézist a gyártó ajánlása alapján végeztük. A miRNS expressziót TaqMan® MicroRNA Assays (Applied Biosystems), TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG vagy TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) használatával kvantifikáltuk. A miRNS expressziós értékeket a snoRNS135 kis nukleoláris RNS expressziójához normalizáltuk a gyártó ajánlása szerint. Az Oct4 (Pou5f1) kifejeződését a GAPDH és a HPRT1 (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems) gének expressziójához normalizáltuk. Az egyedi qRT-PCR génexpressziós vizsgálatokat Corbett RotoGene 3000 gépen végeztük a kapcsolódó RotoGene 6.0 programcsomag használatával (Corbett Research). Az alábbi TaqMan génexpressziós esszéket használtuk:

GAPDH :Applied Biosystems, TaqMan Gene Expression Assay, P/N: Mm99999915\_g1

HPRT1: Applied Biosystems, TaqMan Gene Expression Assays, P/N: Mm00446968\_m1

mmu-miR-290-3p: Applied Biosystems, Assay ID: 000187, P/N: 4373320,

mmu-miR-295: Applied Biosystems, Assay ID: 000189, P/N: 4373327

mmu-miR-294: Applied Biosystems Assay ID:0011056, P/N:4373326

snoRNA135: Applied Biosystems, Assay ID: 001230, P/N: 4380912

Pou5f1 (Oct4): Applied Biosystems, TaqMan Gene Expression Assay, P/N: Mm00658129\_gH

Zfp42 Mm01194090\_g1, Kdr1Mm01222419\_m1,

Brachyury (T) Mm01318252\_m1, Fbx15Mm00618788\_m1

### **3.12 TaqMan Low Density Array (TLDA analízis)**

2 µg RNS-t DNáz I enzimmel emésztettünk (RNase-Free DNase, Qiagen) majd a mintákat tovább tisztítottuk RNeasy MinElute (Qiagen) oszlopokon. Ismételt ellenőriztük a minták koncentrációját, majd 500 ng RNS-ből kiindulva cDNS-t készítettünk. Számos, különböző génszettet mérő kártya került forgalomba, ezek közül mi a TaqMan® Mouse Stem Cell Pluripotency Array (Applied Biosystems) kártyát használtuk a transzgenikus és a kontroll sejtvonalak transzkriptumának vizsgálatához. Ez a TLDA kártya 96 különböző össejt-specifikus és differenciálódási marker egyidejű kvantifikálását teszi lehetővé ugyanabból a cDNS mintából kiindulva. A méréseket két párhuzamosban végeztük. Az expressziós értékeket Ctnnb1-Mm00483033\_m1, Eef1a1-Mm01966109\_u1, Gapdh-Mm99999915\_g1 és Raf1-Mm00466513\_m1 geometriai átlagához normalizáltuk. Az 7. ábrán szereplő heatmap a MeV4.0 programmal készült.

### **3.13 Luciferáz aktivitás mérése**

10000 sejtet tranziensen transzfektáltunk 800 ng PL és 80 ng pRL-TK vagy RL-Wee1/RL-Fbx15 vektorokkal, Lipofectamine 2000 (Invitrogen) használatával a gyártó leírása szerint. A transzfektált sejteket 48 óra múlva lizáltuk, majd három párhuzamosban mértük a Renilla reniformis, illetve Photinus pyralis luciferáz aktivitásokat Dual-Luciferase® Reporter (DLR) Assay Kit (Promega) segítségével. Az aktivitás méréshez Top Count, Packard, Meriden CT automata luminométert használtunk. A hRL-TK és PL plazmidokkal transzfektált sejtek Renilla:Photinus luciferáz aktivitási értékét 1,00-nak tekintettük.



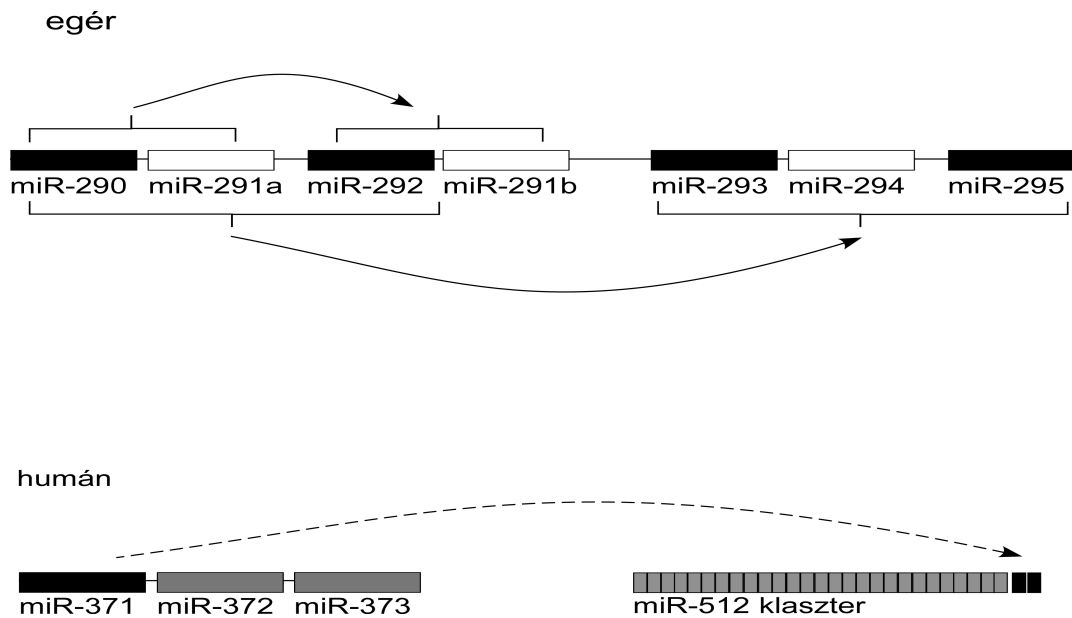
## 4. Eredmények

### 4.1 miR-290-295 klaszter tagjainak szekvencia elemzése

A miR-290-295 klaszter nagy mértékű evolúciós változékonyságot mutat, mely arra utal, hogy a klaszter evolúciós értelemben viszonylag új, és emlős-specifikus tulajdonságokat szabályozhat (Houbaviy és mtsai.és mtsai., 2005). Hogy megértsük, hogyan keletkezett a miRNS klaszter, részletesen elemeztük a humán és az egér klaszter szekvenciáját, valamint a környező 20 kb-os régiót.

Az egér miR-290-295 klaszter hét prekuzort tartalmaz az Nlrp12 gén szomszédságában, ezek sorrendben: miR-290, miR-291a, miR-292, miR-291b, miR-293, miR-294 és miR-295 (**5. ábra**). A humán klaszter pozíciója hasonló, de a klaszter rövidebb, csak három tagból áll, ezek: miR-371, miR-372 és miR-373 (miR-371-373 klaszter). Először duplikációkat kerestünk az egér miR-290-295 klaszter 20 kb-os környezetében, hogy feltérképezzük a klaszter kialakulásának lehetséges útvonalát. A szekvenciát a Tandem Repeat Finder szoftver segítségével analizáltuk, valamint önmagával is összehasonlítottuk (**1. kiegészítő ábra**). Mindkét módszer azonos eredményt adott, amely szerint a miR-290-295 klaszter nem más, mint egy hosszú szekvencia nem teljes mértékű ismétlődése. A duplikált régió első része tartalmazza a miR-290, miR-291a, miR-291b és miR-292 prekuzorokat, míg az ismétlődés második szakaszáról miR-293, miR-294 és miR-295 keletkezik. Annak érdekében, hogy megértsük a szekvencia kettőződés sorrendjét, megvizsgáltuk a klaszter tagjainak egymással mutatott hasonlóságát. Három különböző szekvenciaelemző program (NCBI Blast2, Alibee and ClustalW) két, egymáshoz nagyon hasonló csoportot különített el a klaszteren belül. Az egyik csoportba a miR-290, a miR-292, a miR-293, a miR-295, a másik csoportba a miR-291a, a miR-291b, a miR-294 tartozik. A miR-290 72% hasonlóságot mutatott a miR-293-al, az egyezés 73%-os a miR-293-vel. Hasonlóképpen, a miR-291a egyforma mértékű hasonlóságot mutat a miR-294-el (58%) és a miR-291b-vel (59%). Ugyanakkor miR-295 miR-292-höz áll legközelebb (62%), ami arra utal, hogy miR-292 megkettőződéséből keletkezhetett. A "core" szekvencia kivételével a két csoport (miR-290, miR-292, miR-293, miR-295 és miR-291a, miR-291b, miR-294) csak kismértékű hasonlóságot mutat. Összegezve az ismétlődő elemek és a szekvenciaelemzés eredményeit, valószínűleg miR-290 és/vagy miR-291a lehet a miR-290-295 klaszter legősibb tagja. A miR-290-291a duplikációjával jöhetett létre miR-292 és miR-291b, majd ez a négy miRNS részlegesen megkettőződött, és létrehozta a miR-290-295 klasztert a mai ismert formában. Ha

ez a feltételezésünk helyes, akkor miR-290 és/vagy miR-291a homológja megtalálható más méhlepényes emlősfajban is. Feltételezésünk tesztelésére összehasonlítottuk az egér miR-290-295 szekvenciát a humán homológ miR-371-373 klaszterrel. A szekvencia analízisbe bevontuk a klaszterek 20 kb-os környezetét is. Mindössze egy 74 bp-os konzervált régiót találtunk, ami megegyezett az egér miR-290, illetve a human miR-371 prekurzor szekvenciával. MiR-291a nem mutatott hasonlóságot miR-371-373 klaszterrel. A 74 bp-os konzervált régiót az összes ismert állat genomra illesztve azt tapasztaltuk, hogy minden placentás emlős genomja tartalmazott legalább egy homológ prekurzort, ugyanakkor nem mutattak számottevő egyezést, amikor az összehasonlítást miR-290a prekurzorról végeztük. Megfigyeléseink azt igazolják, hogy a miR-290-295 klaszter legősibb tagja miR-290 és az egész klaszter ebből a miRNS-ből ered.



**5.ábra:** Az egér miR-290-295 klaszter hét miRNA prekurzort kódol, melyek valószínűleg a miR-290-291a miRNS pár sokszorozásával keletkeztek.

A hét miRNS prekurzorról tíz érett miRNS keletkezik, melyek egy miRNS családba tartoznak, és szekvenciájuk nagyon hasonló. Az ismétlődő genomi szakaszok szekvencia analízise alapján miR-290-291a lehetett a klaszter őse. Valószínűleg miR-290-291a megkettőződésével jött létre miR-292-291b. Egy második duplikációs esemény (miR-290, miR-291a és miR-292 részvételével) vezethetett miR-293, miR-294, és miR-295 kialakulásához, így létrejött a klaszter mai formája. A humán miR-371 valószínűleg miR-290-ból származik, míg a miR-512 őse a miR-371 lehet. A miR-512-516 klaszter nem más, mint egy hosszú tandem ismétlődő szekvencia, melyben megrövidült LTR szekvenciák választják el egymástól a miR-519 számos kópiát, valamint a miR-512 két ismétlődését. A fekete téglalapok azokat a prekurzorokat jelzik, melyek a miR-290-ből erednek, és a fehér téglalapok mutatják azokat a miRNS prekurzorokat, melyek a miR-291a-ból származnak. A miR-519 ismétlődések, a miR-372 és a miR-373 eredete homályos (szürke téglalapokkal jelezve).

A humán miR-371-373 klasztert további szekvenciavizsgálatnak vetettük alá. A miR-371-373 szekvenciában nem találtunk tandem ismétlődéseket. A 'core' szekvencia kivételével a klaszter tagjai egymással csak alacsony mértékű hasonlóságot mutattak.

A miR-290-295 klaszter RNS prekurzorainak (+/- 70 bp) meghatároztuk a valószínű másodlagos szerkezetét is. Érdekesnek találtuk, hogy a szerkezet és a számított entalpia alapján a miR-290-295 klaszter tagjait két csoportba sorolhatjuk, és ezek a csoportok megegyeznek a szekvencia analízis során kapott csoportokkal (miR-290, miR-292, miR-293, miR-295 és miR-291a, miR-291b, miR-294) (**2. kiegészítő ábra**). A prediktált másodlagos szerkezet alapján a miR-371 összevethető az egér miR-290, miR-292 és miR-295 miRNS-ekkel, míg a miR-372 és a miR-373 prekurzorok a miR-291a, miR-291b, miR-294 szekvenciákkal állíthatók párhuzamba. A másodlagos szerkezetek összehasonlításakor a prediktált szerkezet szabadenergia szintjeit vettük figyelembe, mert ez információt ad a szerkezet kialakulásának esélyéről, és annak stabilitásáról.

A humán miR-371-373 klaszterhez közeli kromoszomális régióban található a miR-512 klaszter. A miR-512 klaszter tagjainak 'core' szekvenciája megegyezik a miR-290-295 klaszterével. A klaszter gyakori tandem duplikációt tartalmaz, a miR-512 kettő, a miR-519 pedig 46 ismétlődésben fordul elő (**3. kiegészítő ábra**). Szekvencia összehasonlítás 62% hasonlóságot mutatott ki a miR-512 és a miR-371 prekurzor között. A miR-519 pedig 59%-ban azonos miR-291a prekurzorral és 62%-ban egyezik miR-373-al. Az egér miR-290-295 klaszter homológjai emberben tehát két, egymáshoz közeli régióban lokalizálódnak: ezek közül az egyik a már ismert homológ miR-371-373 klaszter, a másik pedig az alacsonyabb szintű egyezést mutató miR-512 klaszter.

#### **4.2 A miR-290-295 klaszter túltermeltetése egér embrionális őssejtekben növeli a sejtek kolónia képzési képességét és proliferációját.**

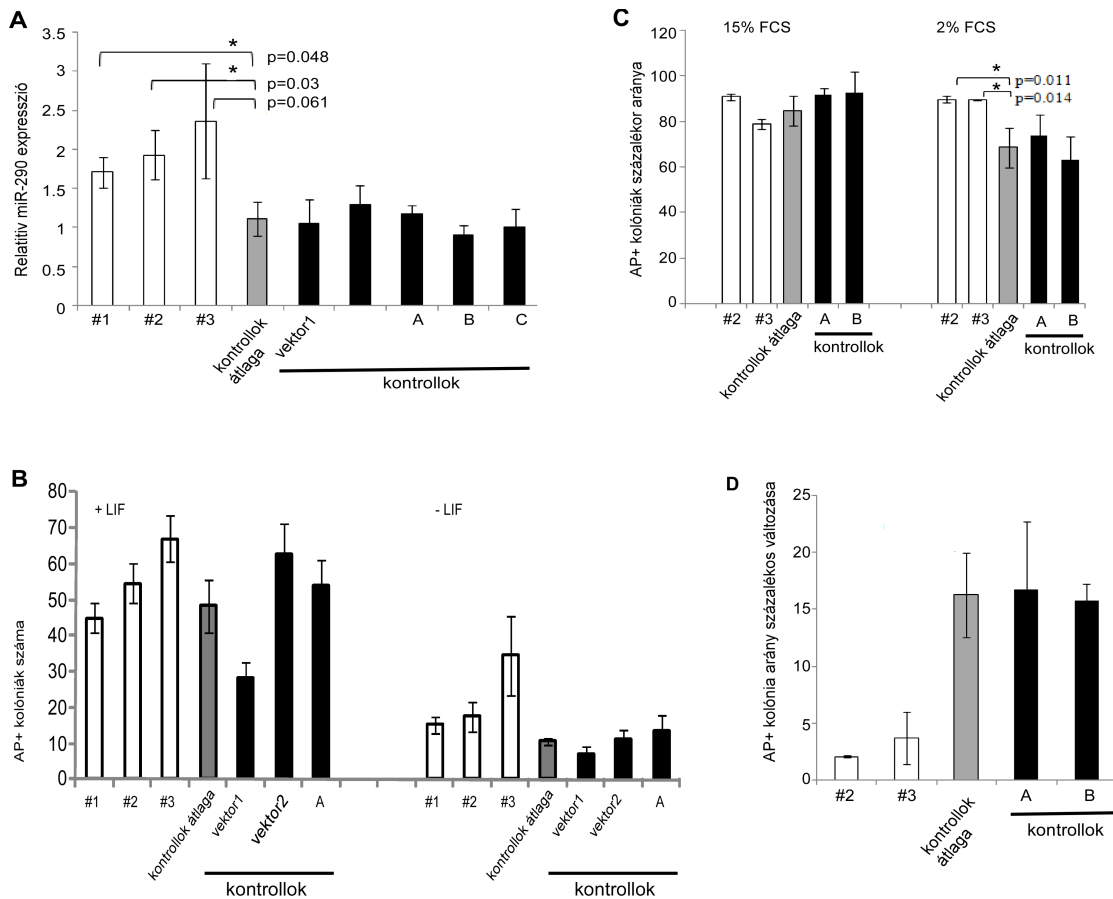
A korai embrió pluripotens belső sejtsomóját (Inner Cell Mass vagy ICM) egér embrionális őssejttel (ES sejtek) modelleztük. A továbbiakban egér ES sejteket használtunk, hogy meghatározzuk a miR-290-295 klaszternek a korai embrionális fejlődésben betöltött *in vivo* funkcióját. A miRNS-ek vizsgálatában általánosan elterjedt módszer az antagomir-ek használata. Az antagomir-ek specifikusan gátolnak egy-egy miRNS-t. Mivel a klaszter tagjai funkcionálisan redundánsak, a klaszter összes tagjának egyidejű, effektív gátlására lenne szükség, ami technikailag nagyon nehezen oldható meg. Ezért a klaszter funkcionális vizsgálatát a miR-290-295 klaszter túltermeltetésével végeztük ES sejteken.

R1/E egér embrionális őssejtéből cDNS-t készítettünk, majd PCR amplifikációt követően a miR-290-295 klaszter teljes miRNS kódoló részét pEF/V5-His TOPO TA (Invitrogen) vektorba klónoztuk. A miRNS klaszter konstitutív kifejeződését ebben a konstrukcióban az EF-1 $\alpha$  promóter biztosítja. A kapott konstrukciót linearizáltuk, mert a genomi integrációt nagyban elősegíti, ha a konstrukció lineáris formában kerül a sejtbe. Ezt követően R1/E egér ES sejtekbe elektroporáltuk, majd a vektornak megfelelő antibiotikummal szelektáltuk a sejteket. A megfelelő növekedést mutató kolóniákból RNS-t izoláltunk, és PCR segítségével ellenőriztük, hogy a kapott ES vonalak tartalmazzák-e a teljes miR-290-295 klasztert. Kvantitatív valós idejű RT-PCR-el ellenőriztük a kapott ES vonalak miR-290 termelését. A mi esetünkben az endogén és a transzgenikus érett miRNS-ek nem különíthetők el, a kettő együttes expresszióját tudtuk kvantifikálni. Olyan miR-290-295 túltermelő vonalakat választottunk a további vizsgálatokhoz, amelyek a miR-290 expresszió mérsékelt emelkedését mutatták. Így elkerültük a túltermeltetett miRNS-ek nem-specifikus befolyását és valós biológiai funkciójukat tudtuk vizsgálni. Kontrollnak a PBS-el elektroporált vektor1 és vektor2 valamint az üres pEF/V5-His TOPO TA vektorral elektroporált A, B és C ES sejt vonalakat alkalmaztuk. A miR-290-295 klaszter tagjai nem egyforma mértékben vannak jelen az őssejtekben. Célunk elsősorban az volt, hogy a megértsük a teljes klaszter funkcióját. Mivel a transzgenikus ES sejt vonalak az egész klasztert tartalmazták, valószínűnek tartottuk, hogy a transzgenikus klaszter tagjai az endogén klaszter miRNS-eivel sztöchiometrikusan írónak át. Ezért szükségtelennek tartottuk a klaszter összes tagjának külön-külön expressziós vizsgálatát, és csak a klaszter első és utolsó tagjának (azaz miR-290 és miR-295-nek) kifejeződését mértük meg.

A kiválasztott #1, #2 és #3 ES vonalakban a miR-290 expresszió 1,71- 1,93- és 2,37-szeres növekedését mértük. A vizsgált transzgenikus sejt vonalak miR-295 expressziója hasonló mértékben növekedett (**6A ábra**).

#1, #2 és #3 ES vonalak morfológiai elváltozást nem mutattak, alkalikus foszfatáz festésre pozitívak voltak, RNS (Oct4, Nanog) és fehérje (Oct4, Nanog) szinten is kifejezték a vizsgált őssejt-specifikus markereket. #2 és #3 ES vonalak kolónia formálási képessége nem mutatott eltérést a kontroll A és B vonalakkal összehasonlítva, ha a sejteket a szokásos, 15% FBS-el (magzati borjú savó) és LIF-el (leukemia inhibitor faktor) kiegészített tápoldatban tenyésztettük, amit a sejtek magas endogén miR-290-295 szintjével magyarázhatunk. Ahhoz, hogy különbséget mutassunk ki a transzgenikus és a kontroll ES sejt vonalak között, a sejteket 'stressz' alá kellett helyezni. LIF hiányában az #1, #2 és #3 sejt vonalak átlagosan 15,3 17,4 és 34,5 számú kolóniát képeztek 100 darab sejt kiültetésekor (**6B ábra**). Ezek az értékek magasabbak a vektor1 és vektor 2 kontroll vonalak kolónia számának átlagánál (10,6). A

tápotdat LIF-el való kiegészítésekor a vizsgált ES sejtvonalak kolónia képzése nem mutatott különbséget. Hasonlóképpen; miR-290-295 túltermelő vonalak kolónia képzése azonos volt a kontroll ES sejtekével 15% FBS jelenlétében, azonban #2 és #3 transzgenikus vonalak több kolóniát képeztek a szérumszint 2%-ra való csökkentésekor. A miR-290-295 klasztert túltermelő vonalak tehát kevésbé érzékenyek a szérumszint változására (**6C-D ábra**). A transzgenikus sejtvonalak által képzett kolóniák 89,9%-a illetve 89,4%-a alkalikus foszfatáz pozitív volt, míg az A és B kontroll sejtek esetében a kolóniáknak csak 74- illetve 63%-a festődött. A magas szérumszinttel összevetve 2,2% és 3,5%-kal csökkent volt az alkalikus foszfatáz pozitív kolóniák aránya #2 és #3 ES vonalakban, míg a kontrollként használt A és B ES vonalakban a csökkenés 16,7 illetve 14,8%-os.



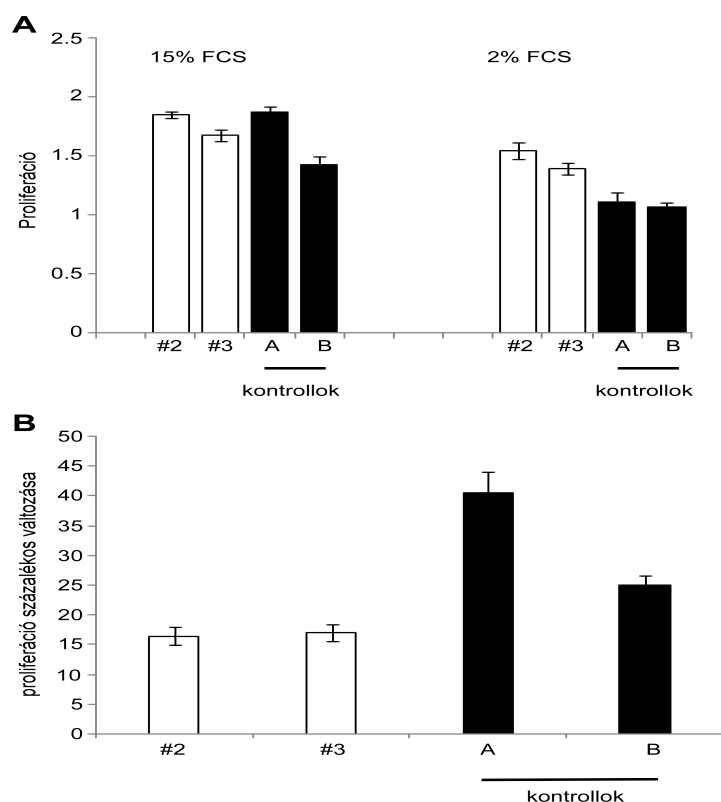
**6.ábra:** A miR-290-295 klasztert túlexpresszáló ES sejtvonalak több kolóniát tudnak képezni.

(A) Az #1, #2 és #3 jelű ES sejtvonalak miR-290 expressziója 1,71; 1,93; és 2,37-szer magasabb mint a vizsgált kontrollok átlaga. Kontrollként PBS-el elektroporálásból származó sejtvonalatokat (A,B,C) és üres vektorral elektroporált ES sejtvonalatokat (vektor1 és vektor2) használtunk. A p értékek számításánál az összes használt kontroll mérési eredményeinek átlagát vettük figyelembe. (B) LIF megvonása nagy mértékben hatott az összes sejtvonala kolónia képzésére. A miR-290-295 túltermelő sejtvonalak azonban kevésbé reagáltak LIF

megvonására, és jobban megőrizték kolónia formálási képességüket mint az 'A' kontroll vagy az üres vektorral transzfektált ESC sejtvonalak. LIF jelenlétében nem találtunk különbséget a vizsgált sejtvonalak kolónia képezésében. (C) A szérumszint csökkentésekor (FCS 2%) a miR-290-295 túlexpresszázó sejtvonalak kolóniái jobban festődtek az embrionális alkalikus foszfatázra specifikus festékekkel (AP) mint 'A' és 'B' kontroll sejtvonalak. (D) A #2 és #3 transzgenikus sejtvonalak AP festése kevésbé változott, mint a kontroll sejtvonalaké. Az ábra azt mutatja, hogy a szérumszint csökkentésekor az AP-al festődő kolóniák aránya hány százalékkal változott.

Megvizsgáltuk a miR-290-295 túlexpresszázó ES vonalak proliferációs képességét. 15% FCS jelenlétében nem tapasztaltunk különbséget a kontrollként alkalmazott A és B valamint a transzgenikus #2 és #3 ES vonalak között. A szérumszint 2%-ra való csökkentésekor azonban az A és B ES sejtvonalak proliferációja alacsonyabb mértékű volt (1,1 és 1,07) mint a miR-290-295 túltermelő #2 és #3 ES vonalaké (1,54 és 1,39). A kontroll ES vonalak proliferációja tehát 40,6%-al illetve 24,67%-al csökkent szemben a #2 és #3 sejtvonalak 16,4- és 17,05%-os proliferációs változásával (**7. ábra**).

Ismert, hogy a szérumszint csökkentése elősegíti a p21 sejtciklus szabályozó fehérje kifejeződését, ami számos sejtvonalban a G1/S ellenőrzési pont megjelenését eredményezi (Shin és mtsai., 2008; Funato és mtsai., 2001; Ouellet és mtsai., 2006; Kaliman és mtsai., 1996). A p21 fehérje a sejtciklus negatív szabályozója, termelődése lehetővé teszi, hogy a sejtek pluripotens tulajdonságukat feladva differenciálódni kezdjenek. Eredményeink alapján a miR-290-295 klasztert túltermelő ES vonalak kevésbé érzékenyek a szérumszint csökkentésére, megőrzik gyors proliferációs képességüket és továbbra is képesek magas arányban alkalikus foszfatáz pozitív kolóniákat képezni. A miR-290-295 klaszter miRNS-ei tehát elősegítik a pluripotencia megőrzését olyan körülmények között, ami a korai differenciálódásnak kedvez.



**7. ábra:** A miR-290-t túlexpresszáló ES sejtvonalak proliferációs rátája magasabb.

(A) Szérum szint csökkentésekor #2 és #3 ES sejtvonalak proliferációs képessége magasabb mint 'A' és 'B' kontrolloké. Normál szérum koncentráció használatakor azonban nem tapasztaltunk különbséget. (B) Az ábra azt mutatja, hogy a szérum koncentráció csökkentésekor a sejtvonalak proliferációs képessége hány százalékkal változott.

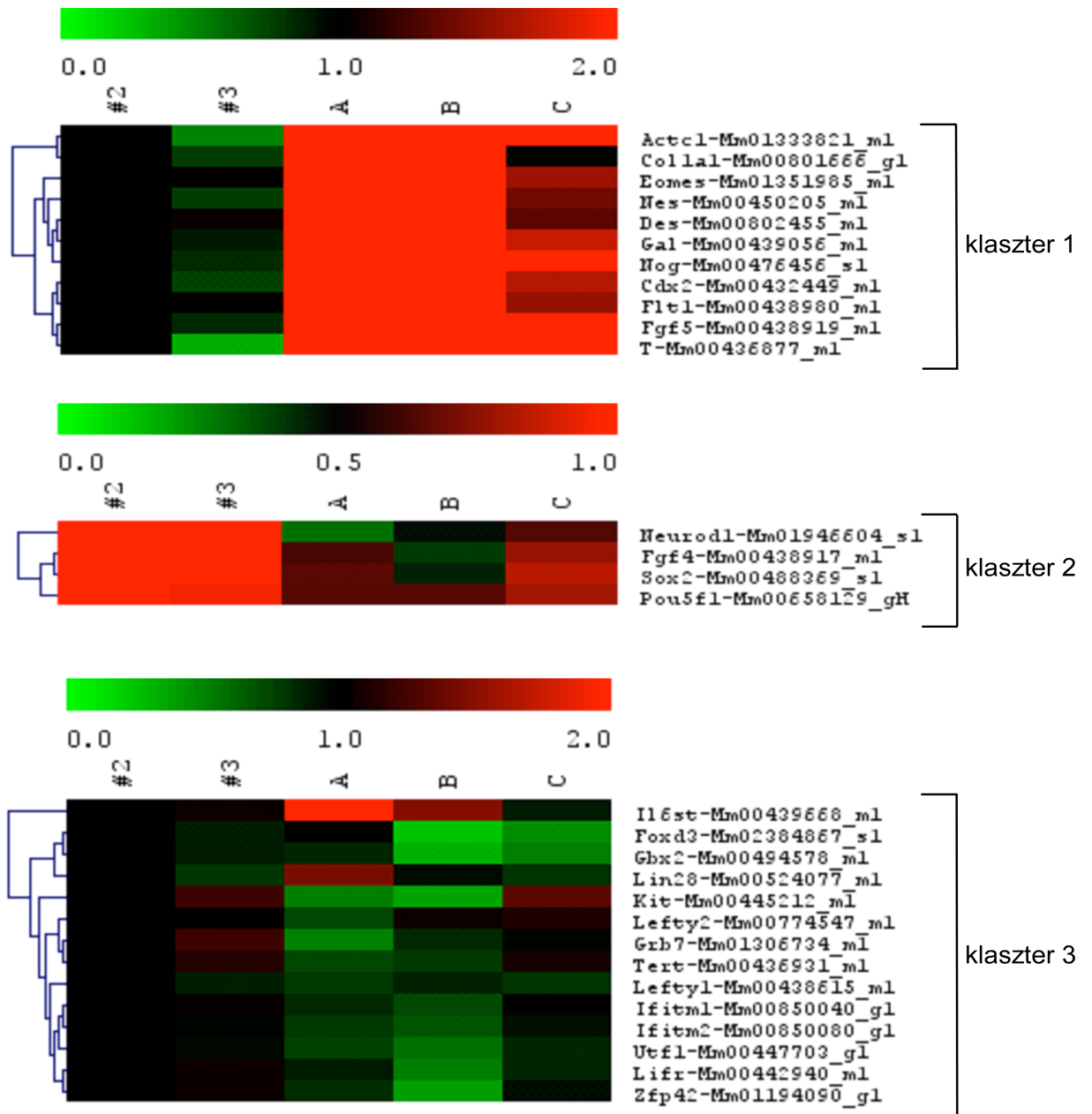
#### 4.3 A miR-290-295 klaszter indirekt módon gátolja a korai differenciációs markerek kifejeződését.

Fontosnak tartottuk meghatározni, hogy a vizsgált miRNS klaszter túltermelése hogyan hat az őssejtek transzkriptomjára. A TaqMan próba alapú valós idejű RT-PCR-t ítéltük a legalkalmasabbnak az expressziós vizsgálatokhoz. Taqman® Low-density Array (TLDA, Applied Biosystems) segítségével 96 gén expressziója (90 specifikus gén és 6 belső kontroll gén) vizsgálható egyszerre, ugyanabból a cDNS mintából. A 96 génre specifikus primerek és TaqMan próbák liofilizált formában, műanyag 'kártyán' vásárolhatók meg. A kereskedelmi forgalomban lévő kártyák közül mi az eger 'Stem Cell Pluripotency Panel'-t választottuk, ami az őssejtekre és a korai differenciálódásra jellemző gének mRNS szintjét méri. A TLDA méréseket két független ES mintából végeztük, két technikai párhuzamossal.

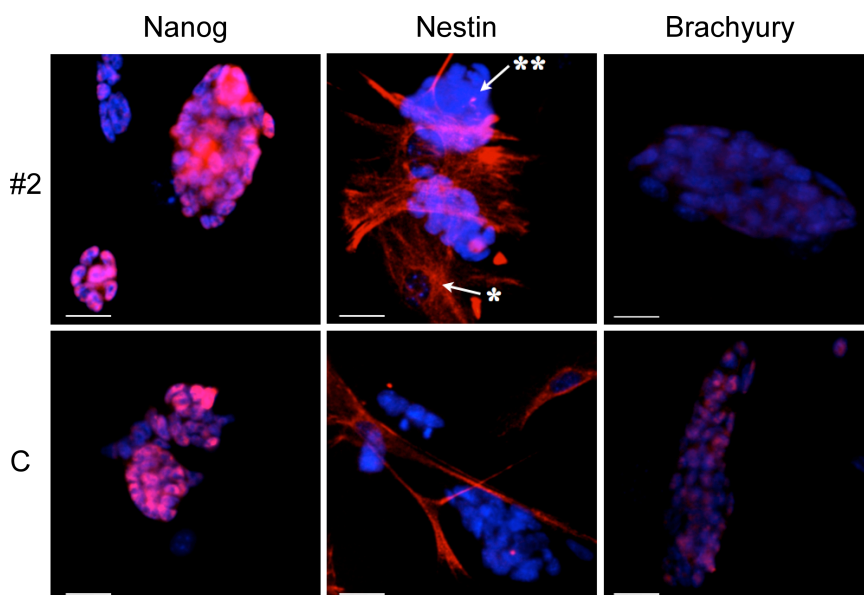
Az eredmények alapján a vizsgált géneket három csoportba osztottuk (**8A ábra**). Az első kategóriába tartozó gének magas kifejeződést mutattak a kontrollként használt A, B és C ES vonalakban, míg expressziójuk jelentősen csökkent a miR-209-295 túltermelő #2 és #3 ES

sejtvonalakban. Ebbe a csoportba főként a korai elköteleződésre jellemző gének tartoznak: Actc1, FoxA2, Desmin, Fgf5 (endoderma differenciálódás), Brachyury (T), Flt1 (mezoderma differenciálódás), Gal, Noggin, Nestin (neuroektoderma, neurális progenitorok) valamint Cdx2, Eomes és Gcm1 (trofoblaszt markerek). A második csoportba soroltuk azokat a géneket, amelyeknek a kifejeződése kis mértékben, nem szignifikánsan emelkedett miR-290-295 túltermelés hatására. Ide főként őssejt-specifikus gének tartoznak: Pou5f1 (Oct4), Sox2 és Fgf4. A harmadik kategóriába jól ismert pluripotencia markerek tartoznak, melyek expressziója nem mutatott változást a kontroll és a transzgenikus sejtvonalak összehasonlításakor: FoxD3, Lin28, Cd9, Utf1, Zfp42 (Rex1) és Lifr. A miRBase target predikciós program segítségével nem találtunk miR-290-295 kötőhelyeket a vizsgált 90 gén 3'UTR régiójában, ami arra enged következtetni, hogy a klaszter miRNS-ei valószínűleg indirekt módon hatnak a kiválasztott 90 differenciálódási és pluripotencia markerre.





8A ábra



8B ábra

**8.ábra:** Össejt- és korai differenciálódás specifikus gének expressziós analízise.

(A) Az össejt specifikus és a korai differenciálódásra jellemző gének expresszióját TaqMan alapú qPCR-el mértük (TaqMan alacsony denzitású array), és az eredményt heatmap formájában mutatja be az ábra. 90 gén és 6 endogén kontroll expresszióját kvantifikáltuk. 'Klaszter 1'-be soroltuk azokat a géneket, melyeknek az expressziós szintje magasabb a kontroll ES sejtvonalakban, mint a transzgenikus #2 és #3 vonalakban. Ide tartozik számos korai differenciálódást jelző marker: *Actc1*, *Coll1a1*, *Eomes*, *Nes*, *Des*, *Gal*, *Nog*, *Cdx2*, *Flt1*, *Fgf5* és *Brachyury*. 'Klaszter 2'-be soroltuk azokat a géneket, melyeknek az expressziója valamelyest (nem szignifikáns mértékben) magasabb a miR-290-295 túltermelő össejtekben. Végül 'Klaszter 3'-ba kerültek a gének, melyek nem mutattak expressziós különbséget a kontroll és minta sejtvonalak között. Klaszter 2 és Klaszter 3 többnyire az össejtekre jellemző géneket foglalja magában. (8B) A vizsgált össejtvonalak kolóniáit nanogra, nesztinre vagy brachyury-ra specifikus ellenanyaggal festettük. A qPCR eredmények alapján Nanog minden használt össejtvonalban egyformán expresszált, az immunfestés eredményei ezt fehérje szinten is igazolják. Ugyanakkor brachyury fehérje alacsonyabb mértékben van jelen a miR-290-295 túlexpresszáló össejt kolóniákban, ami alátámasztja a mRNS szintű mérés eredményeit. A kék festődés (DAPI) a sejtmagot mutatja, A nanog, nesztin és brachyury specifikus festés vörös színű. Az egy csillagos nyíl egy fibroblasztra mutat, ami expresszálja a nesztin fehérjét, szemben az össejt kolóniával, amely nem mutat nesztin expressziót. A két csillagos nyíl az ES kolóniára mutat, amelyen csak a sejtmagok látszanak DAPI festéssel.

A transzkriptom eltérését fehérje szintjen immunfestés segítségével igazoltuk. A TLDA kártya mérése alapján Nanog közel egyforma expressziót mutat a kontroll és a miR-290-295 túltermelő sejtvonalakban, ezért immunfestéskor pozitív kontrollként használtuk. A korai mezoderma marker Brachyury (T) mutatta az egyik legszembetűnőbb transzkripció különbséget (8B ábra). Hasonlóképpen, az immunfestéssel Brachyury (T) fehérje kis mértékben mutatható ki a miR-290-295 túltermelő #2 és #3 ES sejtvonalban, míg jóval erőteljesebben fejeződik ki a kontroll C ES vonalban.

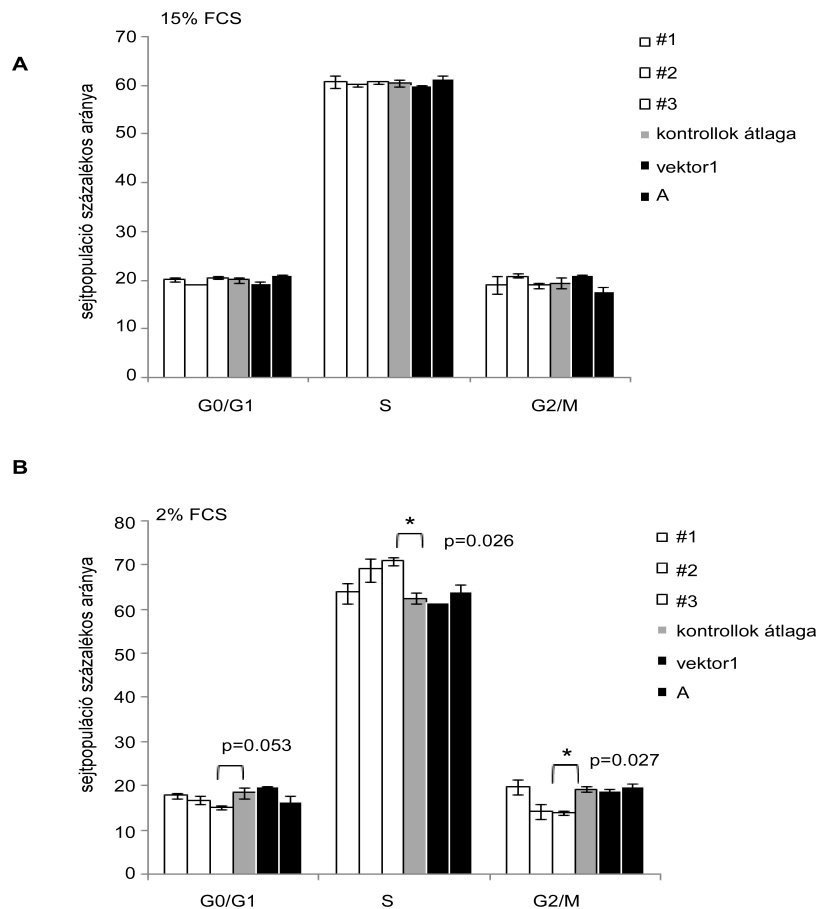
A fenti eredmények alapján a miR-290-295 klaszter túltermelése gátolja a korai elköteleződésre jellemző gének megnyilvánulását mRNA és fehérje szinten, míg az őssejt-specifikus gének expressziójára nincs hatással. A transzkriptom vizsgálatának eredménye tehát összhangban áll a proliferáció és kolónia képzés mérési eredményeivel: a miR-290-295 klaszter elősegíti a pluripotencia fenntartását és gátolja a korai elköteleződést.

#### **4.4 A miR-290-295 klaszter részt vesz a sejtciklus szabályozásában**

A miRNS útvonal hiánya (Dicer és DGCR8 knock-out embrionális őssejtvonalak) befolyásolja a sejtciklus fázisok arányát (Wang és mtsai., 2008; Murchison mtsai., 2005). Abból a célból, hogy megállapítsuk, a miR-290-295 klaszter részt vesz-e a sejtciklus szabályozásában, megmértük a sejtciklus fázisok arányát a miR-290-295 túltermelő ES vonalakban (#1, #2 és #3) valamint a kontroll ES vonalakban (vektor1, és A). A sejteket propidium-jodiddal festettük, majd FACS segítségével méret, granuláltság és a DNS mennyisége alapján választottuk szét a sejtpopulációkat. Így elkülöníthető a sejtciklus G0/G1, S és G2/M fázisa. Amikor a tápoldat 15% FCS-t tartalmazott, a miR-290-295 túltermelő ES vonalak sejtciklusa nem mutatott eltérést a kontroll ES sejtvonalakéhoz képest (9A ábra). A szérumszint csökkentése ugyanakkor jelentősen megváltoztatta a sejtciklus fázisok arányát. A #3 ES vonal 8%-os növekedést mutatott a DNS szintézis (S) fázisban, 5% csökkenést a G0/G1 fázisban és 4% csökkenést a G2/M fázisban (9B ábra). Az eredmények alapján miR-290-295 több ponton is befolyásolja a sejtciklust. A G1-S ellenőrzési pont gátlása mellett elősegítheti a G2-M átmenetet, ezáltal felgyorsítja a sejtciklust és ezzel együtt a sejtosztódást. A #1 ES vonal sejtciklusa nem mutatott különbséget a kontroll ES vonalakéhoz képest, valószínűleg ez a miR-290-295 klaszter alacsony mértékű túltermelésével/magas endogén szintjével magyarázható.

Wang és mtsai. eredménye alapján a miRNS bioszintézisben gátolt DGCR8 egér ES sejtvonal sejtciklusa hasonló mértékben módosult, mint az általunk vizsgált miR-290-295 túltermelő ES sejtvonalaké. A változás természetesen ellentétes előjelű, Wang és mtsai. tanulmányában a DGCR8 mutáns vonalak 5% növekedést mutattak G0/G1 fázisban, 6% csökkenést S fázisban és 4% csökkenést a G2/M fázisban (Wang és mtsai., 2008). Eredményeink tehát arra utalnak, hogy a DGCR8 mutáns ES vonalakban elsősorban a miR-290-295 klaszter hiánya okozza a sejtciklus fázisok eltolódását. A miR-290-295 klaszter adja az embrionális őssejtek legnagyobb mennyiségben előforduló miRNS-eit. A klaszter magas expressziója lehetővé teszi, hogy több target mRNS-t egyidejűleg, effektíven szabályozzanak, tehát valóban lehetséges, hogy miR-290-295 biológiailag jelentős eleme az embrió csomó pluripotens sejteji

sejtciklus regulációjának.



**9. ábra:** A miR-290-295 klasztert túltermelő őssejtvonalak sejtciklusának eltérései.

(A) miR-290-295 túltermelő #1, #2 és #3-as sejtvonalakat, valamint az 'A' kontroll és az üres vektorral transzfektált 'vektor 1' kontroll őssejtvonalak sejtciklus fázis eloszlását hasonlítottuk össze. Nem találtunk különbséget, amikor a sejteket normál szérumszint mellett tenyésztettük. A miR-290-295 túltermelő vonalakban az S fázisú sejtek szignifikáns felszaporodását figyeltük meg, míg a G2/M fázisú sejtek aránya csökkent. A #1 sejtvonal nem mutatja az említett változásokat, valószínűleg azért, mert miR-290-295 expressziója nem elég kifejezett.

15% FCS jelenlétében nem mutattunk ki különbséget a miR-290-295 túltermelő és kontroll ES sejtvonalak sejtciklusában. Ennek oka az lehet, hogy embrionális őssejtekben magas az endogén miR-290-295 expresszió, és a sejtek sejtciklusukból eleve hiányzik a G1-S ellenőrzési pont. A magas szérumszint biztosítja, hogy a miR-290-295 megfelelő mennyiségben termelődjön, ami hozzájárul az embrionális őssejtek gyors sejtciklusához. A szérumszint csökkentése elősegíti p21 kifejeződését, ami G1-S ellenőrzési pont megjelenését vonja maga után. A miR-290-295 klaszter túltermelése késleltetheti a G1-S ellenőrzési pont kialakulását, ezáltal pluripotens állapotban tartja a sejteket. Ezt a hipotézist támasztja alá, hogy a miR-290-295 humán ortológja (hsa-miR-371-373 klaszter) ismert módon szabályozza

a G1-S átmenetet. Bizonyított, hogy miR-372 és miR-373 a p21 útvonal gátlásával hatástalanítja a G1-S ellenőrzési pontot tesztikuláris ivarsejt tumor vonalban (Voorhoeve és mtsai., 2006).

A miR-290-295 klaszter túltermelése kísérleteinkben nem befolyásolta az apoptotikus sejtek arányát.

#### **4.5 Az Fbx15 és a Wee1 mRNS-ek a miR-290-295 klaszter közvetlen szabályozása alatt állnak *in vitro*.**

A miR-290-295 miRNS-ek közvetlen cél mRNS-einek meghatározására a PicTar, TargetScan és miRBase programokat használtuk. *In silico* olyan célszekvenciákat kerestünk a 3'UTR régióban, melyek konzerváltak a patkány, egér és humán mRNS-eken. A lehetséges cél-mRNS-ek között sok sejtciklus szabályozó szerepelt (pl. Fbx15, Skp2, Wee1, p21, Ccng2, Plk1). Két sejtciklus szabályozó gént (Fbx15-öt és Wee1-et) és egy transzlációs elongációs faktort választottuk annak ellenőrzésére, hogy miR-290-295 klaszter közvetlenül hat-e a 3' UTR régiójukon. p21-et nem teszteltük, mert már ismert, hogy miR-106b közvetlen szabályozása alatt áll, és miR-106b 'core' felismerő régiója megegyezik a miR-290-295 klaszterével.

Az eukarióta elongációs factor 1 béta 2 (Eef1b2) fontos regulátora a fehérjeszintézis elongációs fázisának. Két funkcionális doménje van: guanin-nukleotid cserélő domén és a glutation-S-domén.

Az Fbx15 az F-box fehérjék családjába tartozik, és az ubiquitin fehérje ligáz komplex (SCF vagy SKP1-kullin-F-box) négy alegységének egyike. Az F-box fehérje szabályozza a komplex szubsztrát felismerő képességét (Cardozo and Pagano, 2004). FBXL5 kölcsönhat a dinaktin-1 fehérjével és az ubiquitináció keresztül szabályozza annak visszaforgását (Zhang és mtsai.és mtsai., 2007). A centroszómális dinaktin-1 destabilizációja a centriolumok abnormális szétválásához vezet G1 fázisban, ami késlelteti az S fázisba való átlépést. A centroszómális dinaktin megfelelő egyensúlya így szükséges a G1-S tranzícióhoz (Suzuki és mtsai.és mtsai., 2004).

A Wee1 kináz a G2-M ellenőrzési pont jól ismert szabályozója. Foszforilációval inaktiválja a mitotikus ciklin-függő kináz 1-et (Cdk1 vagy cycline dependent kinase 1), így Wee1 elvesztésekor (pl élesztőgombában és *Drosophilában*) a sejtek túl korán lépnek a mitotikus fázisba (Tominaga és mtsai.és mtsai., 2006).

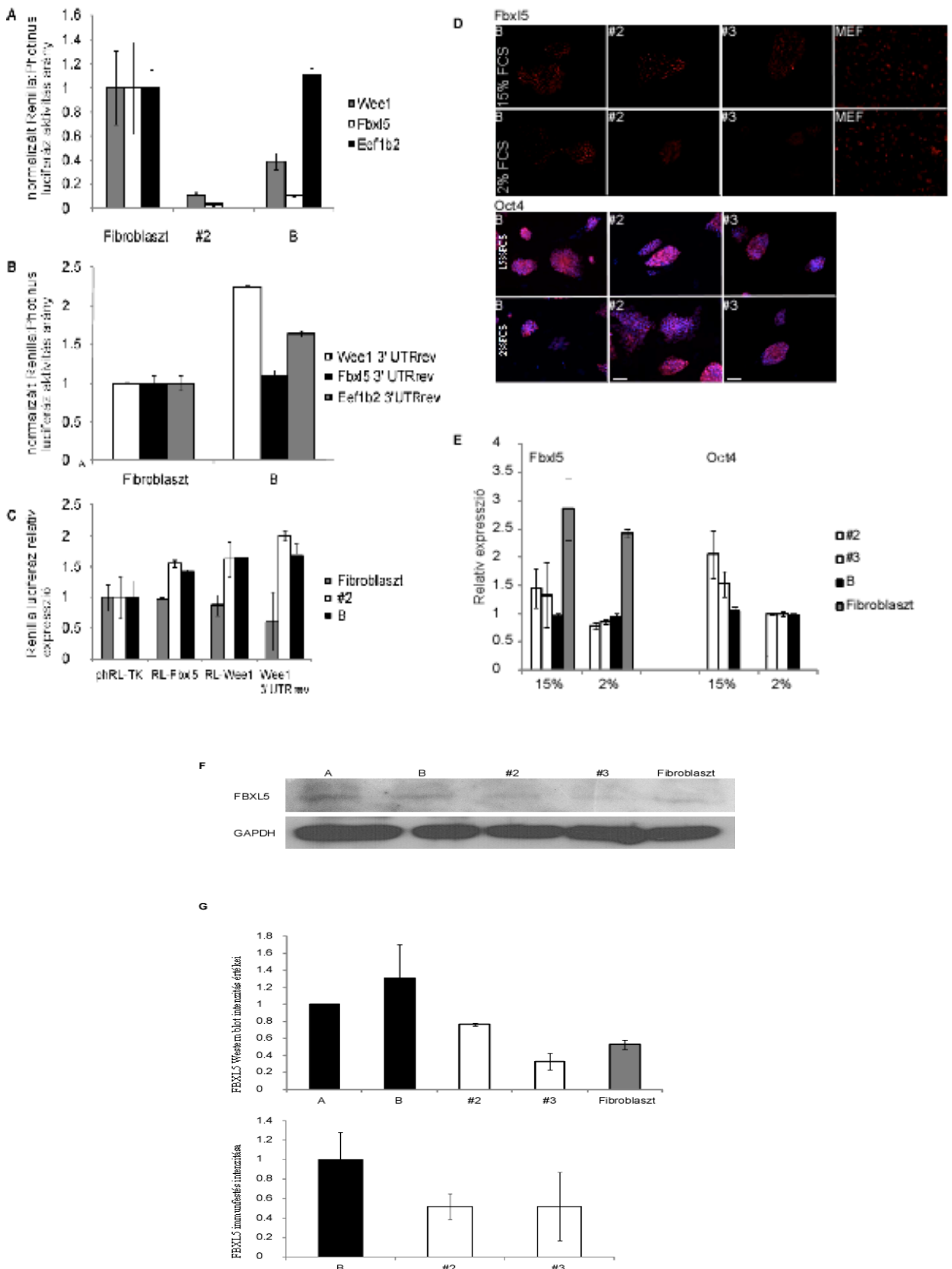
Az egér Eef1b2 mRNS 3' UTR-ben két prediktált célszekvencia is található: a transzlációs stop kodontól számítva a 72-92 nukleotidok, valamint a 137-159 nukleotidok között, azonban

emberben egyik pozíció sem konzervált. A két vizsgált sejtciklus regulátor egy-egy erősen konzervált célszekvenciával rendelkezik. Ennek pozíciója 159-183 az egér Fbx15-ben és 478-500 az egér Wee1 3' UTR-en.

Abból a célból, hogy megvizsgáljuk, az Eef1b2, az Fbx15 és a Wee1 lehetnek-e közvetlen targetjei a miR-290-295 miRNS-eknek, a mRNS-ek teljes 3'UTR régióját a phRL-TK (Promega) riporter vektorba klónoztuk, közvetlenül a riporter gén (Renilla reniformis luciferáz enzim) fehérje kódoló részétől 3' irányba. Az így létrehozott RL-Eef1b2, RL-Fbx15 és RL-Wee1 vektorokat PL vektorral kotranszfectáltuk fibroblaszt sejtekbe, kontroll (B) ES sejtvonalba vagy miR-290-295 túltermelő #2 ES vonalba (**4. kiegészítő ábra**). A PL vektor egy pcDNA3 alapú vektor, ami Phoetinus pyralis luciferáz gént termeli, a további kísérleteinkben transzfectációs kontrollként szolgált. A transzfectált sejtek egy részéből ismét megmértük a miR-295 expressziót. A fibroblaszt sejtek nem termelik a miR-290-295 klasztert, ezért a fibroblasztban mért relatív Renilla luciferáz aktivitást 1,0-nek választottuk.

Az embrionális őssejtek erőteljesen kifejezik a miR-290-295 miRNS-eit. Ennek ellenére, ha RL-Eef1b2 es PL vektorokat kontroll B ES sejtekbe kotranszfectáltuk, a Renilla:Photinus luciferáz aktivitás aránya nem csökkent (1,1), ami azt jelzi, hogy Eef1b2 3'UTR nem viselkedik targetként *in vitro*. Ez magyarázható azzal, hogy Eef1b2 3'UTR prediktált miR-290-295 miRNS target helyei evolúciósan nem konzerváltak. Eef1b2 gént kihagytuk a további vizsgálatokból.

Az RL-Fbx15 vektor használatakor a fibroblaszt relatív Renilla aktivitás 0.1 részét mértük 'B' kontroll ES vonalban. A relatív Renilla aktivitás további csökkenését tapasztaltuk (0.03) amikor a konstrukciókat a miR-290-295 túltermelő #2 ES vonalba transzfectáltuk. RL-Wee1 vektor alkalmazásakor a relatív Renilla luciferáz aktivitás értéke 0,39 B ES sejtekben és 0.11 a #2 transzgenikus ES sejtvonalba (**10A ábra**).



**10.ábra:** A Wee1 és az FBXL5 valószínűleg a miR-290-295 közvetlen targetjei in vitro.

A Wee1 és a Fbx15 3'UTR-e hatékonyan csökkentette a relatív Renilla luciferáz aktivitást, ami közvetlen interakcióra utal. Eef1b2 konstrukciónak nem volt hatása a luciferáz aktivitásra, ezért a továbbiakban negatív kontrollként szerepel. (B) Az aspecifikus, nem-target szekvencia (a target szekvenciák reverz komplementere) nem

képes a relatív luciferáz aktivitás csökkentésére, ami a miR-290 miRNS-ek és az Fbx15, Wee1 3' UTR-ek kapcsolatának szekvencia specifikusságát támasztja alá. Az ábra normalizált Renilla:Photinus luciferáz aktivitás értékeket mutat, az SD érték három független mérés eredménye. (C) Renilla luciferáz qRT-PCR kvantifikálása különböző sejtvonalakban. A sejteket az alap riporter konstrukcióval, vagy Fbx15-öt, Wee1-et illetve Fbx15Rev 3'UTR-t tartalmazó konstrukciókkal transzfektáltuk. A Renilla luciferáz mRNA szintje nem csökkent, ami azt mutatja, hogy a riporter fehérje aktivitásának csökkenése nem mRNA degradáció következménye. (D) FBXL5 fehérjére specifikus ellenanyaggal immunfestést végeztünk. Az FBXL5 fehérje jelen van fibroblaszt és embrionális őssejtekben. A miR-290-295 túlexpresszállása az FBXL5 fehérje koncentrációjának csökkentéséhez vezetett, ezzel párhuzamosan Oct4 expressziója nem változott a transzgenikus sejtvonalakban. (E) qRT-PCR mérés szerint #2 és #3 sejtvonalakban az Oct4 és az FBXL5 mRNA szintje nem változott a 'B' kontroll ES sejtekhez képest. Ez alátámasztja, hogy miR-290-295 elsősorban translációs gátlással hat a vizsgált targeteken. A fibroblaszt sejtek nem expresszálják Oct4 őssejt specifikus markert. (F) Western blot analízis az FBXL5 fehérje jelenlétének csökkenését mutatja a miR-290-295 túltermelő #2 és #3 sejtvonalakban. (G) Megmértük a Western blot analízis csíkjainak intenzitását. Az FBXL5 fehérje mérési értékeit a kontroll GAPDH intenzitás értékeihez normalizáltuk. 'A' kontroll relatív FBXL5 expresszióját 1-nek tekintettük. 'B' kontroll FBXL5 fehérje expressziója 1, 31; #2 és #3 sejtvonalaké pedig 0,77 és 0,33. CD1 fibroblaszt FBXL5 expressziója 0,53. Az ábra alsó része az immunfestés kvantifikálását mutatja. Itt az Fbx15 expressziót 'B' kontrollhoz normalizáltuk. #2 és #3 sejtvonalak értékei 0,52 és 1,51. A sejtekés mtsai.acsny szérumszint mellett tenyésztettük (2% FCS).

A relatív Renilla luciferáz aktivitás csökkenése eredhet a luciferáz-3'UTR konstrukcióról keletkező mRNS-ek destabilizációjából vagy ezek translációs gátlásából. Abból a célból, hogy elkülönítsük a miRNS-ek által indukált két eltérő mechanizmust, ellenőriztük a luciferáz mRNS-ek relatív expresszióját fibroblaszt, kontroll 'B' és #2 sejtekben a PL és hRL-TK vagy RL-Fbx15 illetve RL-Wee1 konstrukciók kotranszfektálását követően. Kvantitatív valós idejű RT-PCR-el nem mutatható ki a riporter konstrukcióról keletkező luciferáz mRNA expressziójának csökkenése, ami azt jelzi, hogy a fehérje-aktivitás csökkenés valószínűleg translációs gátlás eredménye (**10C ábra**).

Következő kérdésünk az volt, hogy specifikus-e a miR-290-295 miRNS-ek és a feltételezett targetek interakciója. Ennek érdekében megismételtük a luciferáz aktivitás méréseket úgy, hogy a PL kontroll vektort kotranszfektáltuk a prediktált targetek 3'UTR-ét reverz formában tartalmazó riporter konstrukciókkal (Eef1b2 3'UTRrev, Fbx15 3'UTRrev és Wee1 3'UTRrev vektorok). A reverz 3'UTR régiók egyike sem csökkentette a relatív Renilla luciferáz aktivitást, a Renilla:Photinus luciferáz aktivitások aránya 1,64 volt Eef1b2 3'UTRrev, 1,1 Fbx15 3'UTRrev és 2.26 Wee1 3'UTRrev konstrukciók tesztelésekor (**10B ábra**).

Ha a miR-290-295 klaszter ilyen nagy mértékben hat a targeteken *in vitro*, feltételezésünk szerint fehérje szinten is tapasztalnunk kell a prediktált gének expressziójának csökkenését. Az Fbx15 fehérje fokozott expressziót mutat fibroblaszt és pluripotens embrionális őssejtekben. A Wee1 nincs jelen az ES sejtekben, csak a differenciálódás során jelenik meg



RNS és fehérje szinten is, ezért a további kísérletekben csak Fbx15 szerepel. Immunhisztokémiával igazoltuk az Fbx15 fehérje jelenlétét a kontroll B ES sejtekben és a miR-290-295 túl expresszázó #2 és #3 vonalakban. 15% szérumszint alkalmazásakor az Fbx15 fehérje expresszió kis mértékű csökkenését tapasztaltuk a túltermelő sejtvonalakban kontroll B ES sejtvonalhoz képest (**10D ábra**). A szérumszint csökkentésekor azonban #2 és #3 sejtvonalakban Fbx15 fehérje alig detektálható, míg a kontroll B sejtvonal továbbra is jól expresszálja a vizsgált fehérjét (**10D ábra**).

Megmértük a kontroll B, valamint a miR-290-295 túltermelő #2 és #3 sejtvonalak Fbx15 mRNS mennyiségét. Valós idejű RT-PCR nem mutatott különbséget mRNS szinten a sejtvonalak valamint a kétféle szérumszint között (**10E ábra**). A fenti eredmények nem elegendőek, hogy igazolják a miR-290-295 miRNS-ek és az Fbx15 vagy a Wee1 3' UTR-ek direkt interakcióját, de valószínűsítik, hogy a vizsgált miRNS klaszter tagjai közvetlenül hatnak az Fbx15 fehérje szintjére egér embrionális őssejtekben a mRNS transzlációs gátlásán keresztül. Szerettük volna megmérni, hogy miR-290-295 klaszter milyen mértékben csökkenti az FBXL5 fehérje expresszióját. Ennek érdekében Western blot analízist végeztünk FBXL5 és GAPDH specifikus ellenanyaggal. A kontroll sejtvonalhoz képest (B ES sejtvonal, Western intenzitás 1,31) a #2 ES sejtvonal csökkent mértékben fejezte ki az FBXL5 fehérjét (0,77). Az FBXL5 koncentrációja tovább csökkent a #3 sejtvonalban (0,33) (**10F-G ábra**). A Western blot analízis tehát alátámasztja az immunfestés vizsgálat eredményeit, amit szintén megpróbáltunk kvantifikálni. Minden vizsgált sejtvonalból tizenkét kolóniát lefénypépeztünk, majd megmértük a képen a fluoreszcens ellenanyag összintenzitását (**10G ábra**). Az FBXL5 fehérje koexpresszál a miR-290-295 klaszterrel egér ES sejtekben, ami alátámasztja, hogy FBXL5 a vizsgált miRNS klaszter egyik funkcionális targetje.

#### **4.6 A miR-290-295 klaszter gátolja az egér ES sejtek differenciációját hosszú idejű szérumszint-megvonásakor, illetve a neuroektodermális differenciáció során.**

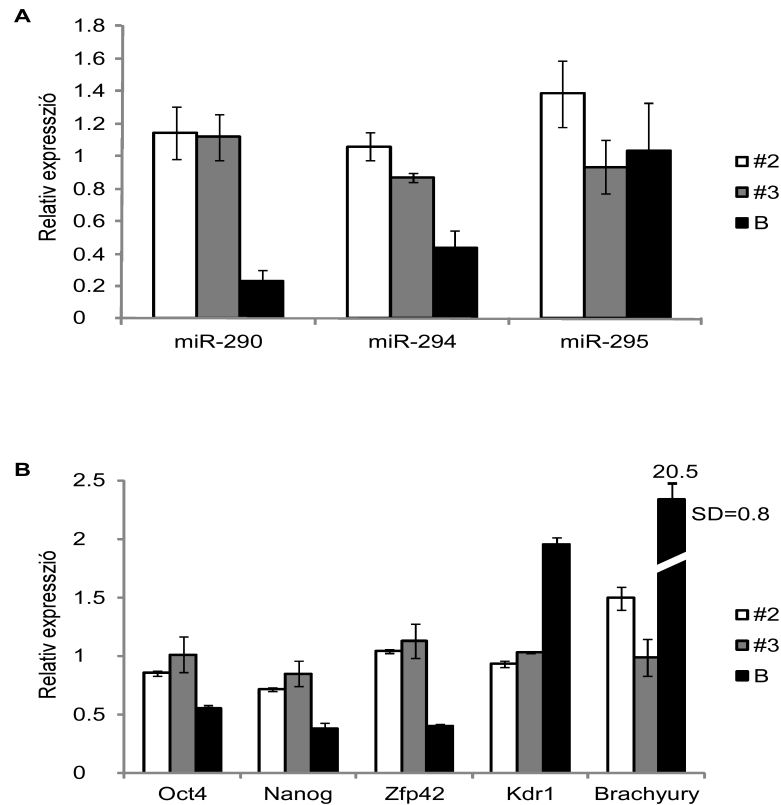
A kolónia képzés, a proliferációs képesség vizsgálata, őssejt- és korai differenciálódási markerek mérése, valamint a sejtciklus változásai mind arra utalnak, hogy a miR-290-295 klasztert túlexpresszázó ES sejtvonalak kevésbé érzékenyek a tápoldat szérumszintjének csökkenésére, és a kedvezőtlen körülmények között jobban képesek megtartani pluripotens tulajdonságaikat. A zselatinon, fibroblaszt nélkül tenyésztett sejtek szérumszint megvonására valóban gyakran reagálnak differenciálódással, azonban a szérumszint megvonása nem egyenértékű a sejtek *in vitro* differenciáltatásával.

Következő kérdésünk az volt, hogy elegendő-e a miR-290-295 klaszter folyamatos termelése ahhoz, hogy az ES sejtek megőrizzék pluripotens tulajdonságaikat. Háromféle módon

kezeltük a sejteket. Először az ES sejteket hosszabb ideig zselatinon tartottuk, ami (fibroblaszt sejtek hiányában) kedvezőtlen a pluripotens sejteknek, majd megmértük a sejtvonalak miR-290 expresszióját. A #2 és #3 ES sejtvonalak miR-290 szintje 5-ször illetve 4,9-szer magasabb volt, mint a kontroll B sejtvonale. A miR-294 2,4 illetve 2-szeres emelkedést mutatott, míg miR-295 szintben nem tapasztaltunk különbséget (**11A ábra**). Valószínű, hogy a sejtek endogén miR-290-295 expressziója csökkent, ami láthatóbbá tette a transzgenikus miR-290-295 klaszter hatását.

Összehasonlítottuk a kontroll B és a miR-290-295 túltermelő sejtvonalak összejt marker expresszióját. A qRT-PCR analízis erősebb relatív Oct4 expressziót mutatott a #2 és a #3 ES sejtvonalakban (0,86 és 1,2) a B kontroll sejtvonalehoz képest (0,6). Hasonlóképpen alakultak a Nanog (0,7 és 0,9 összevetve a B ES sejtek esetén kapott 0,4 értékkel) és a Zfp42 (1,0 és 1,1 szemben a kontroll B ES sejtekből mért 0,4 értékkel) mRNS expressziós mérésének eredményei. Ugyanakkor, Kdr1 korai differenciálódási marker kifejeződése alacsonyabb a miR-290-295 túltermelő ES sejtvonalakban (0,9 és 1,0, kontroll B ES sejtekben 1,9) (**11B ábra**). A TLDA analízis során a legnagyobb eltérést Brachyury (T) marker expressziójában mértük. Ha a vizsgált ES sejtvonalekat tovább tenyésztjük zselatinon, és két passzázzsal később mérjük a sejtek Brachyury szintjét, még nagyobb eltérést láthatunk a kontroll és a transzgenikus ES sejtvonalek között. B kontroll ES sejtek Brachyury expressziója 20-szor nagyobb értéket adott, mint a #3 sejtekké valamint, 13,7-szerese a #2 transzgenikus sejtvonaleból mért értéknek. Összefoglalva, a miR-290-295 klasztert túltermelő transzgenikus sejtvonalek jobban megőriztek pluripotens tulajdonságaikat a hosszabb idejű fibroblaszt mentes, zselatinon való tenyésztés alatt. A miR-290-295 klaszter konstitutív expressziója elősegítette az Oct4, a Nanog és a Zfp42 összejt specifikus markerek expresszióját, ami alátámasztja, hogy a vizsgált miRNS klaszter szerepet játszik a pluripotencia megőrzésében.

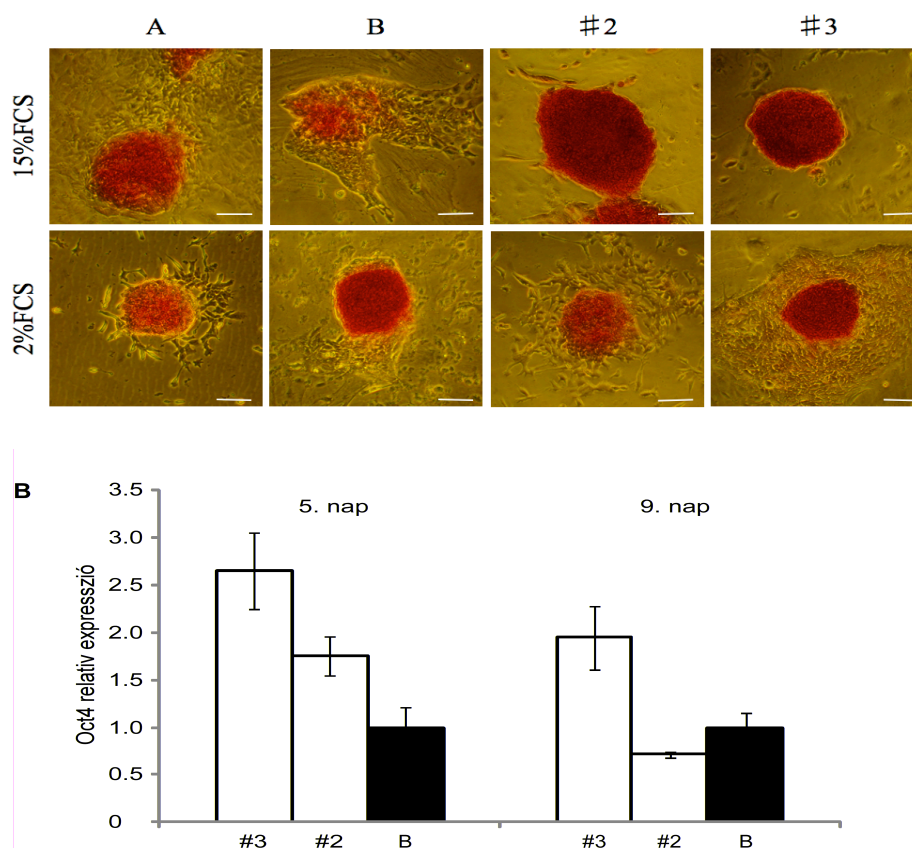
Második lépésként összevetettük, hogy a transzgenikus és a kontroll ES sejtvonalek hogyan reagálnak a hosszabb idejű szérummegvonásra. A sejtvonalekat kolónia képzését egyszerű AP festéssel követtük nyomon. 15% FCS-el kiegészített tápoldatban a kontroll B ES sejtkolóniák elveszítették kerek, kompakt morfológiájukat, míg a miR-290-295 klasztert túl expresszáló #2 és #3 kolóniák továbbra is az embrionális összejtekre jellemző tipikus morfológiát mutatták. Azonban, ha a sejtek alacsony szérumkoncentráció mellett tenyésztettük, öt nap elteltével a transzgenikus és a kontroll ES sejtek egyaránt nagy mértékű differenciálódást mutattak, ami azt jelzi, hogy a miR-290-295 klaszter ilyen kis mértékű túl expresszálatása nem elegendő a differenciálódás gátlásához (12. ábra).



**11. ábra:** A miR-290-295 klaszter támogatja a pluripotenciát hosszú, zselatin bevonatos csészén való tenyésztéskor.

Ha az ES sejteket hosszabb ideig fibroblaszt mentes környezetben tenyésztjük, pluripotenciájuk fokozatosan csökken, ezzel párhuzamosan csökken a miR-290-295 klaszter, és más őssejt markerek expressziója is. (A) A miR-290-295 túltermelő #2 és #3 sejtvonalak miR-290 és miR-294 expressziója magasabb marad. (B) A transzgenikus ES vonalak kissé emelkedett mértékben fejezik ki az Oct4, a Nanog, a Zfp42 pluripotencia markereket, ezzel párhuzamosan Kdr1 és Brachyury differenciálódási markerek expressziója alacsonyabb.

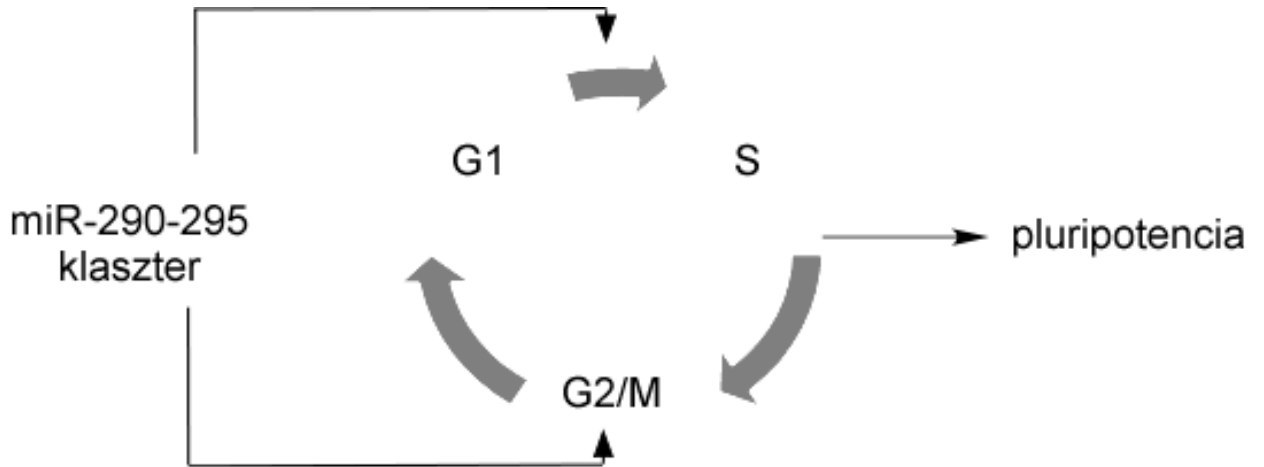
A miR-290-295 túltermelés differenciálódásra való hatását egy adott irányba való elköteleződés (neuroektodermális differenciáció) során is megvizsgáltuk. Kontroll B és transzgenikus #2 illetve #3 ES sejteket kilenc napig retinsav (RA) jelenlétében differenciáltattunk, miközben az Oct4 pluripotencia marker expresszióját valós idejű RT-PCR-el követtük nyomon. Az ötödik napon a #2 és a #3 ES sejtvonal Oct4 kifejeződése 1,75 illetve 2,65-szoros magasabb volt mint a kontroll B sejtvonalé. A korábbi eredményekkel összhangban miR-290-295 túltermeltetése az Oct4 kisebb mértékű vesztéséhez, a pluripotencia jobb megőrzéséhez vezetett. Ugyanakkor a retinsavas kezelés kilencedik napján az Oct4 nagyon gyenge expresszióját mértük mindhárom ES sejtvonalban.



**12. ábra:** A miR-290-295 nem képes a differenciálódás megállítására, csak a folyamat lassítására.

A miR-290-295 túltermelő ES sejtvonalak kolóniái szép kompaktak, kerek szélűek és AP festésre pozitívak 15% szérumban tartalmú tápoldatban, fibroblasztok hiányában. Ezzel szemben az 'A' és 'B' kontroll ES sejtvonalak kolóniái sokszor differenciáltak a kolóniák szélén. Szérumban megvonásakor minden vizsgált sejtvonala differenciálódni kezd. (B) Retinsav differenciálódás során az Oct4 pluripotencia marker expresszióját követtük nyomon qRT-PCT-el. Oct4 relatív expressziója 2,65-ször illetve 1,75-ször magasabb volt a #2 és #3 transzgenikus sejtvonalakban a differenciálódás 5. napján, mint 'B' kontroll ES sejtekben. Ugyanakkor, a retinsav kezelés 9. napjára Oct4 expressziós különbsége már nem volt számottevő.

Összefoglalva a kísérleti eredményeket, elmondhatjuk, hogy a miR-290-295 klasztert kódoló genomi régió ismétlődő elemekből áll, elősegíti az embrionális őssejtek pluripotenciájának megőrzését, és ezt a tulajdonságát valószínűleg a sejtciklus szabályozásán keresztül érvényesíti (**13. ábra**).



**13. ábra:** A miR-290-295 és a pluripotencia szabályozás modellje egér embrionális őssejtekben. A miR-290-295 klaszter miRNS-ei közvetlenül gátolják a sejtciklus egyes negatív szabályzóit. A sejtciklus ezáltal könnyebben átfut az ellenőrző pontokon (G1/S vagy G2/M), és a sejtciklus felgyorsul és a sejtek proliferációs ideje lerövidül. Mindez hozzájárul a pluripotens sejtekre jellemző rövid sejtciklusra, amiben nincs jelen G1.



## **5. Új tudományos eredmények**

- 1. miR-290-295 klaszter túlexpresszáltatása csökkenti a sejtek LIF megvonásra és szérum megvonásra adott válaszát:**
  - a. Segíti az ES kolónia képzési képesség és magas proliferációs készség fenntartását.
  - b. Gátolja a korai differenciálódási markerek megjelenését, így a brachyury fehérje expresszióját is.
  - c. Részt vesz a pluripotens embrionális őssejtekre jellemző sejtciklus profil megtartásában.
  
- 2. miR-290-295 klaszter egyik valószínű közvetlen targetje az Fbx15.**
  
- 3. miR-290-295 klaszter késlelteti az egér ES sejtek RA indukálta neurális és random irányú differenciálódását, de nem képes meggátolni a differenciálódást.**

## 6. Megbeszélés és javaslatok

Számos tanulmány támasztja alá, hogy a miRNS útvonal alapvető fontosságú az őssejtek tulajdonságainak kialakításában. A korai munkák főképp a teljes miRNS útvonal szerepét vizsgálták, ezért elsősorban a miRNS biogenezisben inaktivált mutánsokra támaszkodnak. A Dicer homozigóta egér embriók korán, a gasztruláció során elhalnak. Ezek az embriók Oct4-re kevésbé festődnek, ami a pluripotens sejtpopuláció drasztikus csökkenését jelzi (Bernstein és mtsai., 2003). Azok a transzgenikus ES sejt vonalak, melyekből hiányzik a Dicer mindkét katalitikus RNáz III doménje, lassan osztódnak, a sejtek felhalmozódnak a G0/G1 sejt ciklus fázisban, nem mutatnak teratoma vagy kiméra képzést (Murchison és mtsai., 2005). Dicer mutáns ES sejt vonalak EB csomói kevésbé differenciálódnak és csak alacsony mértékben expresszálják az ismert differenciálódási markereket (Hnf4, Brachyury (T), Bmp4, Gata1) (Kanellopoulou és mtsai., 2005). A DGCR8 mutáns ES vonal a miRNS biogenezis egy másik kezdeti lépésében gátolt. DGCR8 homozigóta ES sejtek morfológiailag normálisnak tűnnek, kifejezik az őssejt-specifikus markereket, de lassabban proliferálnak (Sohn és mtsai., 2007). A sejtek nagyobb arányban fordulnak elő G0/G1 fázisban, ami alátámasztja, hogy a miRNS útvonal szükséges a megfelelő sejt ciklus-fázis eloszlás kialakulásához és a gyors osztódáshoz. A Dicer knock-out ES sejt vonalakhoz hasonlóan a leukémia-inhibitor faktor (LIF) megvonásakor, vagy retinsavval való differenciáltatáskor a DGCR8 sejtek megőrizték pluripotens tulajdonságaikat, és csak kis mértékben differenciálódtak vagy képeztek teratomát (Wang és mtsai., 2008). A miRNS útvonal szerepe őssejtekben tehát régóta áll az érdeklődés középpontjában, mégis kevés tanulmány született az egyes jól definiált őssejt-specifikus miRNS-ek szerepéről (Ivanovska mtsai., 2008; Wang és Belloch, 2009). Őssejtek differenciálódásával kapcsolatos miRNS klaszterek közül a legjobban ismert a miR-1, miR-133 lókuszt. Ezek a miRNS-ek részt vesznek a szívizom és harántcsíkolt izom differenciációjában. A miRNS pár két lókuszon is megtalálható: miR-1-1 és miR-133a-1 a 18. kromoszómán, miR-1-2 és miR-133a-2 pedig a 22. kromoszómán. A két miRNS egy policisztronikus pri-miRNS-ről keletkezik, növelik a mezoderális gének expresszálo sejtek arányát és a mezoderális gének relatív expresszióját ES sejtek *in vitro* differenciáltatásakor (Ivey és mtsai., 2008). A differenciáltatás későbbi szakaszában azonban ellentétesen hatnak, miR-1 valószínűleg HDAC4 (hiszton deacetiláz 4) gátlásán keresztül elmozdítja szívizom és harántcsíkolt izom irányú elköteleződést, míg miR-133 a SRF (serum response factor) gátlásával visszafogja a miogenezist (Chen és mtsai., 2006). Ennek *in vivo* jelentőségét transzgenikus egérben is kimutatták. Szívizom specifikusan túlexpresszált miR-1 csökkenti a ventrikuláris szívizomsejtek számát, és ezáltal a kamra falának vastagságát,



mivel miR-1 a multipotens sejtek túl korai differenciációjához vezet. miR-1 túlexpresszáltatása tehát embrionálisan letális.

*In silico* vizsgálat egyértelműen mutatja, hogy az egér miR-290-29 klaszter duplikációk sorozatával keletkezett. A genomi ismétlődések vizsgálata kimutatta, hogy a miR-290 az egér miR-290-295 klaszter legősibb tagja. Egyben ez az egyetlen miRNS a klaszterben, amelyik a placentás emlősök körében konzervált, és jelen van minden eddig szekvenált méhlepényes emlős genomban. Egérben miR-290 másodlagos szerkezete tükrözi a duplikációs eseményeket. Emberben két genomi pozíció mutat hasonlóságot a miR-290-295 klaszterrel: a 19. kromoszómán a miR-371-373 klaszter, valamint az ezzel szomszédos miR-512 klaszter. A miR-371-373 klaszter eredete homályos: szekvencia összehasonlítások alapján miR-371 lehet az ősi miRNS, míg a prekursorok másodlagos szerkezetének összevetése alapján a klaszter az egér miR-291a-ra hasonlít leginkább. A miR-512 klaszter nem más, mint egy 100 kb hosszú genomi tandem ismétlődő szekvencia halmaz, mely számos miR-519 eredetű elemet és néhány miR-512-höz hasonló szekvencia darabot foglal magában. Ezeket megrövidült LINE szekvenciák tagolják. A miR-512 hasonlít a humán miR-371-re és az egér miR-290-re, a miR-519 pedig az egér miR-291a-val, vagy humán miR-373-al mutat rokonságot. A miR-512 klaszter expresszál számos humán karcinóma sejtvonalban, hES sejtekben és a méhlepényben. 2010-ben több tudományos cikk is említi a miR-371-373 és miR-512 klaszter LINE-szerű elemeit, de arról sajnos nincs irodalmi adat, hogy ezek a szekvenciák részt vettek e a miRNS klaszterek kialakulásában, illetve, hogy mikor történhetettek a duplikációs események. Az embrionális őssejtek és karcinóma sejtek osztódási sebessége gyors, és a méhlepény is tartalmaz nagyon aktívan proliferáló sejtpopulációkat (Schepeler és mtsai., 2008; Saito és mtsai., 2009; Josson és mtsai., 2008). Mivel a miR-290-295 klaszter humán ortológjáról (miR-371-373) ismert, hogy a G1/S tranzíciót szabályozza a tesztikuláris ivarsejt tumorokban (Voorhoeve és mtsai., 2006), valószínű, hogy a miR-512 klaszter is rendelkezik sejtciklus szabályozó képességgel, és hozzájárul a tumorsejtek gyors proliferációjához.

Célunk volt magyarázatot adni arra, hogy miért szükséges a miR-290-295 klaszter központi szekvenciájának (amely a klaszter minden tagjában jelen van, és alapvetően meghatározza a target mRNS-ek populációját) ilyen mértékű felhalmozására egér embrionális őssejtekben, és mi lehet ezeknek a miRNS-eknek a funkciója a pluripotens sejtekben, illetve a differenciálódás kezdetén. Három ES sejtvonalat választottunk, melyek szignifikánsan magasabb miR-290 expressziót mutattak, de a különbség nem volt olyan mértékű, hogy a miR-290-295 klaszter miRNS-ei befolyásolják az endogén miRNS-eket, vagy a fiziológiás

target mRNS-eken kívül random targetekre is hassanak (offtarget hatás). A dolgozatban használt stabil transzgenikus ES klónok létrehozásakor transzfelejtést követően az egy sejtől származó kolóniákat egyesével 96 lyukú plate-re helyeztük át, és a növekedő kolóniákat külön teszteltük miR-290 expresszióra az endogén sno135-el szemben. Az általunk kiválasztott három klón miR-290 expressziója jól elkülönült a kontroll klónoktól. Minden kísérlet (proliferációs assay, kolóniaképzés mérése, TLDA kártya, sejt-ciklus analízis) indításakor külön megmérjük az éppen akkor használt kontroll és transzgenikus sejt vonal miR-290 expresszióját. Így végül több mint tíz mérési eredmény alapján igazolhattuk biztonságosan, hogy a kiválasztott transzgenikus ES klónok túltermelték a miR-290-295 klasztert. A transzkriptóm analízisen kívül nem találtunk szignifikáns eltérést a transzgenikus ES sejt vonalakban, talán a magas endogén miR-290-295 koncentráció miatt.

Szérummegvonáskor azonban a miR-290-295 túltermelő ES sejt vonalak kevésbé reagáltak a kedvezőtlen környezeti körülményekre, mint a kontroll (vad típusú) ES sejt vonalak, továbbra is gyorsan osztódtak és hatékonyan hoztak létre AP pozitív kolóniákat. Ezek az eredmények megfelelnek annak, amit a teljes miRNS útvonalban gátolt ES sejt vonalak irodalmi adatai alapján vártunk (Wang és mtsai. és mtsai., 2008).

Annak érdekében, hogy jobban megértsük, pontosan mi okozza a fenti *in vivo* eltérést, elvégeztük a transzkriptóm részleges elemzését a miR-290-295 túltermelő vonalakban. Eredményeink alapján a korai differenciálódásra jellemző gének nagy része alacsonyabb mértékben fejeződik ki magas miR-290-295 szint mellett, ugyanakkor az őssejtekre jellemző gének expressziója nem mutatott változást. Ez azt mutatja, hogy a miR-290-295 klaszter elősegíti az egér ES sejtek pluripotens állapotának megőrzését és visszatartja a korai differenciálódást. Mindhárom csíralemezre jellemző differenciálódási markerek expressziója alacsonyabb volt a transzgenikus ES sejt vonalakban, ami arra utal, hogy miR-290-295 klaszter hatása nem korlátozódik az elköteleződés bizonyos irányára, hanem valamilyen, pluripotenciát általános módon befolyásoló mechanizmuson keresztül hat. Az immunhisztokémiai vizsgálat fehérje szinten is alátámasztotta a transzkriptóm elemzés eredményeit.

Az embrionális őssejtek sejt ciklus szabályozásából hiányzik a G1 ellenőrzési pont. Ez előnyös a sejtek számára, mert egyrészt lehetővé teszi a sejtek gyors proliferációját ebben a (fiziológiailag) rövid időszakban, másrészt elősegíti azoknak a sejteknek a kizárását, amelyeknek DNS-e nem ép. Számos tanulmányból ismert, hogy a teljes miRNS útvonal elvesztése megváltoztatja a sejt ciklus-fázisok eloszlását, és csökkenti az embrionális őssejtek

differentiálódási képességét. Nem tapasztaltunk eltérést, amikor a miR-290-295 túltermelő ES sejtvonalak sejtciklus eloszlását vetettük össze kontroll ES sejtvonalakéval magas szérumszint mellett. Ennek oka talán az, hogy már a vad típusú embrionális őssejtek is telítettek miR-290-295 miRNS-ekkel a klaszter fokozott expressziója miatt. A szérumszint csökkentésekor azonban a miR-290-295 túltermelő ES sejtek felhalmozódnak az S fázisban. Ezzel párhuzamosan a sejtek aránya csökken G0/G1 és G2/M fázisokban. Ezek a megfigyelések az alábbi következésre vezettek: (1) miR-290-295 klaszter több ponton is befolyásolja a sejtciklust. A G1-S tranzíció előmozdítása mellett a G2-M átmenetet is szabályozza. Jól ismert, hogy a miRNS útvonal szabályozza a G1-S tranzíciót ES sejtekben (Wang és mtsai., 2008; Wang és Belloch, 2009). Ivanovska és mtsai. igazolták a miR-106b család szerepét is a G1-S átmenet során (Ivanovska és mtsai., 2008). A miR-290-295 klaszter miRNS-einek 5' része (2-8 bázis), amely alapvetően meghatározza a miRNS targetjeit, azonos a miR-106b 5' szekvenciájával, ami arra utal, hogy hasonló (átfedő) funkciót láthatnak el. A miR-290-295 humán ortológja (hsa-miR-371-373) a p21 sejtciklus gátló fehérje jelenlétében is képes a G1-S ellenőrzési pont törlésére humán tesztikuláris tumorsejtekben (TGCT vagy testicular germ cell tumor) (Voorhoeve és mtsai., 2006). A miRNS útvonal funkcióvesztés mutánsaira jellemző, hogy a sejtek felhalmozódnak a sejtciklus G1 fázisában, ugyanakkor arányuk csökken S és G2/M fázisokban (Murchison és mtsai., 2005; Kanellopoulou és mtsai., 2005). Ezek a változások szignifikánsak, de nem nagy mértékűek. (2) A miR-290-295 klaszter kétszeres túltermelése hasonló mértékű (de természetesen ellentétes előjelű) változásokat idézett elő az általunk vizsgált egér embrionális őssejtvonalakban, mint a teljes miRNS útvonal hiánya. Eredményeink tehát arra engednek következtetni, hogy a miRNS bioszintézis mutáns ES sejtvonalak esetében a sejtciklus változásait főképp a miR-290-295 klaszter expressziójának hiánya okozza.

Kétséges azonban, hogy ez a szabályozás direkt vagy indirekt módon érinti-e a sejtciklust. Több tanulmány szerint a miR-290-295 klaszter epigenetikai szabályozáson keresztül hat. Sinkkonen és mtsai. kimutatták, hogy differenciálódó ES sejtekben a *de novo* metiláció miR-290-295 klaszter szabályozása alatt áll, és ez a reguláció szükséges az Oct4 őssejt-specifikus faktor stabil repressziójához, mely a differenciálódás előfeltétele (Sinkkonen és mtsai., 2008). A miR-290-295 elsődleges targetjének az Rbl2-t jelölték meg. Az Rbl2 hozzájárul a Dnmt3 *de novo* metiláz repressziójához. Benetti és mtsai. részletesen elemezték, milyen útvonalon keresztül szabályozza a miR-290-295 az Rbl2-függő Dnmt3 expressziót, valamint kimutatták, hogy a miRNS klaszter indirekt módon befolyásolja a telomér hosszúságát is (Benetti és mtsai., 2008). Másrészt több eredmény igazolja, hogy a miR-290-295 közvetlen targetjei a sejtciklus regulátorok. Hsa-miR-371-373 elősegíti a human primer sejtek gyors osztódását,

gátolja a CDK inhibitorok expresszióját, p53 és p21 fehérjéktől downstream szabályozza a sejtciklust, valószínűleg a LATS (LArge Tumor Suppressor) közvetlen transzlációs gátlásával (Voorhoeve és mtsai., 2006). Lehetséges, hogy miR-290-295 közvetlenül és indirekt módon egyaránt szabályozza a sejtciklust. A miRNS-ek targetjeit rövid 5' régiójuk határozza meg. Mivel ez a szekvencia nagyon rövid, az általánosan elfogadott nézet szerint nem egy, hanem számos mRNS-en hatnak, az aktuális transzkriptomtól függően. Ez a szabályozási mód különösen alkalmassá teszi a miRNS-eket arra, hogy egy biológiai folyamatot (pl. sejtciklus) több ponton vagy több-féleképpen (direkt és indirekt úton) reguláljanak.

Abból a célból, hogy meghatározzuk, az általunk felállított kísérleti elrendezésben hathat-e a sejtciklus szabályozásra közvetlenül a miR-290-295 klaszter, olyan lehetséges targeteket kerestünk, amelyek mRNS-ei jelen vannak egér embrionális őssejtekben. Különböző target predikciós programok eredményeinek összevetése azt mutatta, hogy lehetséges cél-mRNS-ek között nagy arányban fordulnak elő sejtciklus szabályozók. A G1/S átmenet közismert regulátorát, p21-et nem vizsgáltuk, mert Ivanovska és mtsai. már publikálták, hogy a miR-106b közvetlen targete p21 a HMEC humán emlőepítél sejtekben és a HCT116 humán vastagbél rák sejtvonalonban. Hsa-miR-106b szekvenciája „uaaagugcugacagucagau”, míg mmu-miR-291-3p szekvenciája „aagugcuuccacuuguguc”, tehát a két miRNS target felismerő „core” régiója azonos. Ebből arra következtettünk, hogy mindkét miRNS képes p21 közvetlen transzlációs gátlására, és inkább a többi lehetséges sejtciklus szabályzó targetre koncentráltunk. Ezek közül az Fbx15-öt és a Wee1-et vizsgáltuk tovább *in vitro* kísérletekben. A Wee1 a G2-M átmenet negatív regulátora, a mutáns sejtek korán lépnek M fázisba ezért kis méretűek (Tominaga és mtsai., 2006). Az Fbx15 ubiquitinációra jelöli ki dinaktin-1-et. A centroszomális dinaktin készlet csökkenése abnormalis centriolum szétváláshoz vezet G1 fázisban és késlelteti a sejtek S fázisba lépését (Zhang és mtsai., 2007; Shin és mtsai., 2008). A Wee1 és az Fbx15 teljes 3'UTR szakaszát luciferáz riporter gén kódoló régiója mögé klónoztuk, és a transzfektált sejtek luciferáz aktivitását mértük. Mivel a miR-290-295 klaszter endogén expressziója magas az őssejtekben, a luciferáz-Fbx15 3'UTR és luciferáz-Wee1 3'UTR konstrukciók exogén miRNS hozzáadása nélkül is mutatták a miR-290-295 klaszter hatását. A relative Renilla luciferáz aktivitás további csökkenését tapasztaltuk a miR-290-295 túltermelő ES sejtvonalak transzfektálásakor. Ez az összegződő hatás a miR-290-295 miRNS-ek és a választott targetetek közötti specifikus kölcsönhatásra utal. Mivel a fibroblaszt sejtekben nem expresszál miR-290-295 klaszter, ezekben a sejtekben nem csökkent a riporter gén aktivitása. Hasonlóképpen, a reverz 3' UTR konstrukciók sem voltak hatékonyak egyetlen sejtvonalonban sem. A luciferáz esszé eredményeit fehérje szinten is igazoltuk immunfestéssel és Western blot analízissel. Bár az Fbx15 mRNS szintje nem változott, a

fehérje csökkent jelenlétét tapasztaltuk a miR-290-295 túlexpresszázó transzgenikus ES sejtvonalakban. Ugyan nem vizsgáltuk részletesen a target mRNS-ek stabilitását, de kísérleteink arra engednek következtetni, hogy a miR-290-295 klaszter legalább részlegesen a transláció gátlásával csökkenti az FXBL5 fehérje szintjét. A Wee1-et nem teszteltük fehérje szinten, mert a protein nincs jelen az ES sejtekben, csak a differenciálódás során jelenik meg. Ezek alapján úgy gondoljuk, hogy az Fbxl5 a miR-290-295 klaszter egyik fontos funkcionális targetje lehet *in vivo* is.

A szérummegvonás a sejtciklus feltartóztatásához vezet, ez egy olyan lépés, ami gyakran megelőzi a differenciálódást *in vivo* körülmények között is. Annak érdekében, hogy megtudjuk, mi lehet a miR-290-295 klaszter funkciója a differenciálódás korai szakaszában, a sejteket hosszabb ideig éhezettük, illetve neuroektodermális irányba kezdtük differenciáltatni. Mindkét kezelés azonos eredményt adott: a folyamat elején a miR-290-295 túltermelő sejtek megőrizték a pluripotens sejtekre jellemző kolónia morfológiát és továbbra is erős Oct4 expressziót mutattak. Ugyanakkor hosszabb távon a megnövekedett miR-290-295 expresszió nem volt képes megakadályozni a differenciálódást, és az Oct4 pluripotencia marker elvesztését.

Összefoglalva, munkánk során tehát megmutattuk, hogy a miR-290-295 túltermelése gyorsítja a proliferációt, és segíti a sejtek kolónia képzését egér embrionális őssejtekben. A klaszter hozzájárul a korai differenciálódás késleltetéséhez, amint azt mRNS szinten és a különböző differenciáltatási kísérletekben láttuk. A klaszter miRNS-ek közvetlenül hatnak a sejtciklus szabályozó fehérjeinek expressziójára, és az Fbxl5 translációs gátlásával hozzájárulnak a G1/S tranzíciós ellenőrző pont gyors elhagyásához. Valószínűnek tartjuk, hogy a miR-290-295 klaszter több sejtciklus regulátor együttes gátlásával biológiailag is jelentős mértékben hozzájárul ahhoz, hogy az embrionális őssejtekben ne jöjjön létre a G1/S tranzíciós ellenőrzés, ezen kívül a miR-290-2295 klaszter a sejtciklus több más pontját is szabályozza. Eredményeink alapján a miR-290-295 klaszter elősegíti az ES sejtek pluripotens állapotának fenntartását, ezt elsősorban a sejtciklus közvetlen, több pontú szabályozásával éri el, így gátolja a sejtek korai differenciálódást.

## 7. Summary

The mmu-miR-290-295 cluster codes for a family of microRNAs (miRNAs) that are expressed *de novo* during early embryogenesis and are specific for mouse embryonic stem cells (ESC) and embryonic carcinoma cells (ECC). Detailed sequence analysis and alignment studies of miR-290-295 precursors demonstrated that the cluster has evolved by repeated duplication events of the ancient miR-290 precursor. Taken together the results of repeat search and sequence alignment, we speculate that miR-290 and/or miR-291a could be the ancestor of the miR-290-295 cluster. By duplication they generated miR-292 and miR-291b. Later the stretch of these four miRNA precursors partially duplicated and established the present mouse miR-290-295 cluster. The human genome contains two loci that align with miR-290 precursor: miR-371 site in miR-371-373 cluster and miR-512 site in miR-512 cluster. Members of miR-512 cluster are expressed in several cancer cell lines, in hES cells and in placenta.

We show that under serum starvation, overexpression of miR-290-295 miRNAs withhold ES cells from early differentiation, ensures their high proliferation rate and capacity for forming alkaline phosphate positive colonies. Transcriptome analysis of ninety stemness and early differentiation related genes revealed that overexpression of miR-290-295 cluster retained ES cells in stem cell-like stage by depressing expression of differentiation markers. Repression of mesodermal differentiation in the presence of high miR-290-295 expression has been recently reported (Zovoilis et al., 2009). Importantly, in the present study, we show that differentiation markers of all three germ layers were downregulated upon miR-290-295 overexpression. Transcriptome analysis indicates a general effect of miR-290-295 cluster on stemness/differentiation rather than suppression of a specific type of differentiation. Immunohistochemistry of selected protein markers confirm the results of the transcriptome analysis at protein level.

To understand the underlying mechanism of the overall depression of differentiation in miR-290-295 overexpressing ES cells, we investigated the cell cycle phase distribution of control and miR-290-295 transgenic stem cell lines. We could conclude that: (1) miR-290-295 cluster effects cell cycle at multiple points. It might assist G1/S transition and regulate G2/M transition as well. (2) Twofold overexpression of miR-290-295 cluster proved to be sufficient to cause accumulation of S phase cells and to decrease the ratio of G0/G1 and G2 cells. These alterations are significant but not robust. Importantly, similar extent of variation has been observed in previous studies focused on cell cycle phase distribution of Dicer knock-down ES cells (Murchison et al., 2005; Kanellopoulou et al., 2005). Thus, our results suggest that the

absence of miR-290-295 cluster is the predominant cause of cell cycle disturbance in the miRNA biogenesis mutant ES cell lines and that miR-290-295 miRNAs contribute to the natural absence of G1 checkpoint in embryonic stem cells.

By the means of well known target prediction programs we observed that cell cycle regulators are abundant among the suggested targets of miR-290-295 cluster. Fbx15 and Wee1 were selected and were shown to be positive in luciferase reporter assay. Wee1 is a negative regulator of G2/M transition and Fbx15 suppresses G1/S transition. The above results were confirmed by immunohistochemistry and Western blot analysis.

To deduce the possible function of miR-290-295 in differentiation, we prolonged the serum starvation or promoted neuroectodermal differentiation by trans-retinoic acid. In the initial period of both treatments miR-290-295 overexpression detains the cells from differentiation, underlining its suggested role in stem cell maintenance. However, increased miR-290-295 level could not withhold differentiation in later stages of commitment as marked by increased number of differentiating ES cell colonies and a rapid drop of Oct4 expression in both control and transgenic ES cell lines.

In summary, we suggest that miR-290-295 cluster effects cell cycle at different checkpoints, accelerates G1/S transition and has an important role in establishing the special characteristics of ES cell cycle. Members of miR-290-295 cluster probably directly act on cell cycle regulators and possibly create a positive regulatory loop between cell cycle and pluripotency. miRNAs can coregulate multiple targets and thus can target a biological process at multiple points. This flexibility of miRNA regulation makes miRNAs extremely appropriate for timing early differentiation events. We assume that miR-290-295 cluster can retain ES cells in their pluripotent state mainly by regulating cell cycle at multiple points by affecting multiple targets, assuring that ES cells are able to maintain the typical ES cell cycle phase distribution and avoid differentiation.

## 8. Mellékletek

### M1 Irodalomjegyzék

- Abbott, A.L., Alvarez-Saavedra, E., Miska, E.A., Lau, N.C., Bartel, D.P., Horvitz, H.R., and Ambros, V. (2005) The let-7 MicroRNA family members mir-48, mir-84, and mir-241 function together to regulate developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Cell* 9:403-414.
- Abrahante, J.E., Miller, E.A., and Rougvie, A.E. (1998) Identification of heterochronic mutants in *Caenorhabditis elegans*. Temporal misexpression of a collagen::green fluorescent protein fusion gene. *Genetics* 149:1335-1351.
- Adewumi, O., Aflatoonian, B., Ahrlund-Richter, L., Amit, M., Andrews, P.W., Beighton, G., Bello, P.A., Benvenisty, N., Berry, L.S., Bevan, S., Blum, B., Brooking, J., Chen, K.G., Choo, A.B., Churchill, G.A., Corbel, M., Damjanov, I., Draper, J.S., Dvorak, P., Emanuelsson, K., Fleck, R.A., Ford, A., Gertow, K., Gertsenstein, M., Gokhale, P.J., Hamilton, R.S., Hampl, A., Healy, L.E., Hovatta, O., Hyllner, J., Imreh, M.P., Itskovitz-Eldor, J., Jackson, J., Johnson, J.L., Jones, M., Kee, K., King, B.L., Knowles, B.B., Lako, M., Lebrin, F., Mallon, B.S., Manning, D., Mayshar, Y., McKay, R.D., Michalska, A.E., Mikkola, M., Mileikovsky, M., Minger, S.L., Moore, H.D., Mummery, C.L., Nagy, A., Nakatsuji, N., O'Brien, C.M., Oh, S.K., Olsson, C., Otonkoski, T., Park, K.Y., Passier, R., Patel, H., Patel, M., Pedersen, R., Pera, M.F., Piekarczyk, M.S., Pera, R.A., Reubinoff, B.E., Robins, A.J., Rossant, J., Rugg-Gunn, P., Schulz, T.C., Semb, H., Sherrer, E.S., Siemen, H., Stacey, G.N., Stojkovic, M., Suemori, H., Szatkiewicz, J., Turetsky, T., Tuuri, T., van den Brink, S., Vintersten, K., Vuoristo, S., Ward, D., Weaver, T.A., Young, L.A., and Zhang, W. (2007) Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol* 25:803-816.
- Amit, M., Carpenter, M.K., Inokuma, M.S., Chiu, C.P., Harris, C.P., Waknitz, M.A., Itskovitz-Eldor, J., and Thomson, J.A. (2000) Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 227:271-278.
- Assou, S., Le Carrou, T., Tondeur, S., Strom, S., Gabelle, A., Marty, S., Nadal, L., Pantesco, V., Reme, T., Hugnot, J.P., Gasca, S., Hovatta, O., Hamamah, S., Klein, B., and De Vos, J. (2007) A meta-analysis of human embryonic stem cells transcriptome integrated into a web-based expression atlas. *Stem Cells* 25:961-973.
- Babiarz, J.E., Ruby, J.G., Wang, Y., Bartel, D.P., and Blelloch, R. (2008) Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev* 22:2773-2785.
- Bain, G., Kitchens, D., Yao, M., Huettner, J.E., and Gottlieb, D.I. (1995) Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* 168:342-357.
- Balzer, E., and Moss, E.G. (2007) Localization of the developmental timing regulator Lin28 to mRNP complexes, P-bodies and stress granules. *RNA Biol* 4:16-25.
- Banito, A., Rashid, S.T., Acosta, J.C., Li, S., Pereira, C.F., Geti, I., Pinho, S., Silva, J.C., Azuara, V., Walsh, M., Vallier, L., and Gil, J. (2009) Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes Dev* 23:2134-2139.
- Bao, S., Tang, F., Li, X., Hayashi, K., Gillich, A., Lao, K., and Surani, M.A. (2009) Epigenetic reversion of post-implantation epiblast to pluripotent embryonic stem cells. *Nature* 461:1292-1295.
- Barnes, D., Kunitomi, M., Vignuzzi, M., Saksela, K., and Andino, R. (2008) Harnessing endogenous miRNAs to control virus tissue tropism as a strategy for developing attenuated virus vaccines. *Cell Host Microbe* 4:239-248.



- Bashirullah, A., Pasquinelli, A.E., Kiger, A.A., Perrimon, N., Ruvkun, G., and Thummel, C.S. (2003) Coordinate regulation of small temporal RNAs at the onset of *Drosophila* metamorphosis. *Dev Biol* 259:1-8.
- Bell, J.C., and Kim, D. (2008) MicroRNAs fine-tune oncolytic viruses. *Nat Biotechnol* 26:1346-1348.
- Benetti, R., Gonzalo, S., Jaco, I., Munoz, P., Gonzalez, S., Schoeftner, S., Murchison, E., Andl, T., Chen, T., Klatt, P., Li, E., Serrano, M., Millar, S., Hannon, G., and Blasco, M.A. (2008) A mammalian microRNA cluster controls DNA methylation and telomere recombination via Rbl2-dependent regulation of DNA methyltransferases. *Nat Struct Mol Biol* 15:268-279.
- Bernstein, E., Kim, S.Y., Carmell, M.A., Murchison, E.P., Alcorn, H., Li, M.Z., Mills, A.A., Elledge, S.J., Anderson, K.V., and Hannon, G.J. (2003) Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* 35:215-217.
- Betschinger, J., Mechtler, K., and Knoblich, J.A. (2006) Asymmetric segregation of the tumor suppressor *brat* regulates self-renewal in *Drosophila* neural stem cells. *Cell* 124:1241-1253.
- Bettinger, J.C., Lee, K., and Rougvie, A.E. (1996) Stage-specific accumulation of the terminal differentiation factor LIN-29 during *Caenorhabditis elegans* development. *Development* 122:2517-2527.
- Bhattacharyya, S.N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E.I., and Filipowicz, W. (2006) Stress-induced reversal of microRNA repression and mRNA P-body localization in human cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71:513-521.
- Bibikova, M., Laurent, L.C., Ren, B., Loring, J.F., and Fan, J.B. (2008) Unraveling epigenetic regulation in embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2:123-134.
- Boiani, M., and Scholer, H.R. (2005) Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:872-884.
- Bracken, C.P., Gregory, P.A., Kolesnikoff, N., Bert, A.G., Wang, J., Shannon, M.F., and Goodall, G.J. (2008) A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* 68:7846-7854.
- Brons, I.G., Smithers, L.E., Trotter, M.W., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Howlett, S.K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R.A., and Vallier, L. (2007) Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 448:191-195.
- Brown, B.D., Cantore, A., Annoni, A., Sergi, L.S., Lombardo, A., Della Valle, P., D'Angelo, A., and Naldini, L. (2007a) A microRNA-regulated lentiviral vector mediates stable correction of hemophilia B mice. *Blood* 110:4144-4152.
- Brown, B.D., Gentner, B., Cantore, A., Colleoni, S., Amendola, M., Zingale, A., Baccarini, A., Lazzari, G., Galli, C., and Naldini, L. (2007b) Endogenous microRNA can be broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state. *Nat Biotechnol* 25:1457-1467.
- Brown, B.D., and Naldini, L. (2009) Exploiting and antagonizing microRNA regulation for therapeutic and experimental applications. *Nat Rev Genet* 10:578-585.
- Brown, B.D., Venneri, M.A., Zingale, A., Sergi, L., and Naldini, L. (2006) Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer. *Nat Med* 12:585-591.
- Burdon, T., Stracey, C., Chambers, I., Nichols, J., and Smith, A. (1999) Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* 210:30-43.
- Calabrese, J.M., Seila, A.C., Yeo, G.W., and Sharp, P.A. (2007) RNA sequence analysis defines Dicer's role in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:18097-18102.

- Cao, F., Li, X., Hiew, S., Brady, H., Liu, Y., and Dou, Y. (2009) Dicer independent small RNAs associate with telomeric heterochromatin. *RNA* 15:1274-1281.
- Cardozo, T., and Pagano, M. (2004) The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:739-751.
- Care, A., Catalucci, D., Felicetti, F., Bonci, D., Addario, A., Gallo, P., Bang, M.L., Segnalini, P., Gu, Y., Dalton, N.D., Elia, L., Latronico, M.V., Hoydal, M., Autore, C., Russo, M.A., Dorn, G.W., 2nd, Ellingsen, O., Ruiz-Lozano, P., Peterson, K.L., Croce, C.M., Peschle, C., and Condorelli, G. (2007) MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med* 13:613-618.
- Caudy, A.A., Ketting, R.F., Hammond, S.M., Denli, A.M., Bathoorn, A.M., Tops, B.B., Silva, J.M., Myers, M.M., Hannon, G.J., and Plasterk, R.H. (2003) A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. *Nature* 425:411-414.
- Chang, T.C., Zeitels, L.R., Hwang, H.W., Chivukula, R.R., Wentzel, E.A., Dews, M., Jung, J., Gao, P., Dang, C.V., Beer, M.A., Thomas-Tikhonenko, A., and Mendell, J.T. (2009) Lin-28B transactivation is necessary for Myc-mediated let-7 repression and proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:3384-3389.
- Chen, D., Farwell, M.A., and Zhang, B. MicroRNA as a new player in the cell cycle. *J Cell Physiol* 225:296-301.
- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., and Shiekhattar, R. (2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436:740-744.
- Chiu, Y.L., and Rana, T.M. (2002) RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Mol Cell* 10:549-561.
- Cho, W.C. (2007) OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Mol Cancer* 6:60.
- Choi, W.Y., Giraldez, A.J., and Schier, A.F. (2007) Target protectors reveal dampening and balancing of Nodal agonist and antagonist by miR-430. *Science* 318:271-274.
- Clevers, H. (2006) Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127:469-480.
- Colin, A., Faideau, M., Dufour, N., Auregan, G., Hassig, R., Andrieu, T., Brouillet, E., Hantraye, P., Bonvento, G., and Deglon, N. (2009) Engineered lentiviral vector targeting astrocytes in vivo. *Glia* 57:667-679.
- Couto, L.B., and High, K.A. Viral vector-mediated RNA interference. *Curr Opin Pharmacol* 10:534-542.
- De Palma, M., Venneri, M.A., Galli, R., Sergi Sergi, L., Politi, L.S., Sampaolesi, M., and Naldini, L. (2005) Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* 8:211-226.
- Doench, J.G., Petersen, C.P., and Sharp, P.A. (2003) siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev* 17:438-442.
- Dravid, G., Ye, Z., Hammond, H., Chen, G., Pyle, A., Donovan, P., Yu, X., and Cheng, L. (2005) Defining the role of Wnt/beta-catenin signaling in the survival, proliferation, and self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 23:1489-1501.
- Dvash, T., Sharon, N., Yanuka, O., and Benvenisty, N. (2007) Molecular analysis of LEFTY-expressing cells in early human embryoid bodies. *Stem Cells* 25:465-472.
- Dvorak, P., Dvorakova, D., Koskova, S., Vodinska, M., Najvirtova, M., Krekac, D., and Hampl, A. (2005) Expression and potential role of fibroblast growth factor 2 and its receptors in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 23:1200-1211.
- Ebert, M.S., Neilson, J.R., and Sharp, P.A. (2007) MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat Methods* 4:721-726.
- Ecker, J.R., and Davis, R.W. (1986) Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:5372-5376.

- Enver, T., Soneji, S., Joshi, C., Brown, J., Iborra, F., Orntoft, T., Thykjaer, T., Maltby, E., Smith, K., Abu Dawud, R., Jones, M., Matin, M., Gokhale, P., Draper, J., and Andrews, P.W. (2005) Cellular differentiation hierarchies in normal and culture-adapted human embryonic stem cells. *Hum Mol Genet* 14:3129-3140.
- Eulalio, A., Huntzinger, E., Nishihara, T., Rehwinkel, J., Fauser, M., and Izaurralde, E. (2009) Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA* 15:21-32.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.
- Frasch, M. (2008) A matter of timing: microRNA-controlled temporal identities in worms and flies. *Genes Dev* 22:1572-1576.
- Funato, N., Ohtani, K., Ohyama, K., Kuroda, T., and Nakamura, M. (2001) Common regulation of growth arrest and differentiation of osteoblasts by helix-loop-helix factors. *Mol Cell Biol* 21:7416-7428.
- Gentner, B., Schira, G., Giustacchini, A., Amendola, M., Brown, B.D., Ponzoni, M., and Naldini, L. (2009) Stable knockdown of microRNA in vivo by lentiviral vectors. *Nat Methods* 6:63-66.
- Giot, L., Bader, J.S., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., Hao, Y.L., Ooi, C.E., Godwin, B., Vitols, E., Vijayadamodar, G., Pochart, P., Machineni, H., Welsh, M., Kong, Y., Zerhusen, B., Malcolm, R., Varrone, Z., Collis, A., Minto, M., Burgess, S., McDaniel, L., Stimpson, E., Spriggs, F., Williams, J., Neurath, K., Ioime, N., Agee, M., Voss, E., Furtak, K., Renzulli, R., Aanensen, N., Carrolla, S., Bickelhaupt, E., Lazovatsky, Y., DaSilva, A., Zhong, J., Stanyon, C.A., Finley, R.L., Jr., White, K.P., Braverman, M., Jarvie, T., Gold, S., Leach, M., Knight, J., Shimkets, R.A., McKenna, M.P., Chant, J., and Rothberg, J.M. (2003) A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* 302:1727-1736.
- Greber, B., Lehrach, H., and Adjaye, J. (2007) Fibroblast growth factor 2 modulates transforming growth factor beta signaling in mouse embryonic fibroblasts and human ESCs (hESCs) to support hESC self-renewal. *Stem Cells* 25:455-464.
- Gu, P., Reid, J.G., Gao, X., Shaw, C.A., Creighton, C., Tran, P.L., Zhou, X., Drabek, R.B., Steffen, D.L., Hoang, D.M., Weiss, M.K., Naghavi, A.O., El-daye, J., Khan, M.F., Legge, G.B., Wheeler, D.A., Gibbs, R.A., Miller, J.N., Cooney, A.J., and Gunaratne, P.H. (2008) Novel microRNA candidates and miRNA-mRNA pairs in embryonic stem (ES) cells. *PLoS One* 3:e2548.
- Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S., and Bartel, D.P. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466:835-840.
- Hamazaki, T., Kehoe, S.M., Nakano, T., and Terada, N. (2006) The Grb2/Mek pathway represses Nanog in murine embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 26:7539-7549.
- Hammell, C.M., Lubin, I., Boag, P.R., Blackwell, T.K., and Ambros, V. (2009) nhl-2 Modulates microRNA activity in *Caenorhabditis elegans*. *Cell* 136:926-938.
- Hanna, J., Markoulaki, S., Mitalipova, M., Cheng, A.W., Cassady, J.P., Staerk, J., Carey, B.W., Lengner, C.J., Foreman, R., Love, J., Gao, Q., Kim, J., and Jaenisch, R. (2009) Metastable pluripotent states in NOD-mouse-derived ESCs. *Cell Stem Cell* 4:513-524.
- Harvey, K., and Tapon, N. (2007) The Salvador-Warts-Hippo pathway - an emerging tumour-suppressor network. *Nat Rev Cancer* 7:182-191.
- Hatfield, S., and Ruohola-Baker, H. (2008) microRNA and stem cell function. *Cell Tissue Res* 331:57-66.
- Hayes, B., Fagerlie, S.R., Ramakrishnan, A., Baran, S., Harkey, M., Graf, L., Bar, M., Bendoraite, A., Tewari, M., and Torok-Storb, B. (2008) Derivation, characterization, and in vitro differentiation of canine embryonic stem cells. *Stem Cells* 26:465-473.

- Henderson, J.K., Draper, J.S., Baillie, H.S., Fishel, S., Thomson, J.A., Moore, H., and Andrews, P.W. (2002) Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells* 20:329-337.
- Heo, I., Joo, C., Kim, Y.K., Ha, M., Yoon, M.J., Cho, J., Yeom, K.H., Han, J., and Kim, V.N. (2009) TUT4 in concert with Lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation. *Cell* 138:696-708.
- Houbaviy, H.B., Dennis, L., Jaenisch, R., and Sharp, P.A. (2005) Characterization of a highly variable eutherian microRNA gene. *RNA* 11:1245-1257.
- Houbaviy, H.B., Murray, M.F., and Sharp, P.A. (2003) Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell* 5:351-358.
- Ibarra, I., Erlich, Y., Muthuswamy, S.K., Sachidanandam, R., and Hannon, G.J. (2007) A role for microRNAs in maintenance of mouse mammary epithelial progenitor cells. *Genes Dev* 21:3238-3243.
- Ivanovska, I., Ball, A.S., Diaz, R.L., Magnus, J.F., Kibukawa, M., Schelter, J.M., Kobayashi, S.V., Lim, L., Burchard, J., Jackson, A.L., Linsley, P.S., and Cleary, M.A. (2008) MicroRNAs in the miR-106b family regulate p21/CDKN1A and promote cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 28:2167-2174.
- Ivey, K.N., Muth, A., Arnold, J., King, F.W., Yeh, R.F., Fish, J.E., Hsiao, E.C., Schwartz, R.J., Conklin, B.R., Bernstein, H.S., and Srivastava, D. (2008) MicroRNA regulation of cell lineages in mouse and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2:219-229.
- Jagannath, A., and Wood, M.J. (2009) Localization of double-stranded small interfering RNA to cytoplasmic processing bodies is Ago2 dependent and results in up-regulation of GW182 and Argonaute-2. *Mol Biol Cell* 20:521-529.
- James, D., Levine, A.J., Besser, D., and Hemmati-Brivanlou, A. (2005) TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development* 132:1273-1282.
- Jiang, J., and Hui, C.C. (2008) Hedgehog signaling in development and cancer. *Dev Cell* 15:801-812.
- Jing, Q., Huang, S., Guth, S., Zarubin, T., Motoyama, A., Chen, J., Di Padova, F., Lin, S.C., Gram, H., and Han, J. (2005) Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell* 120:623-634.
- Johnson, C.D., Esquela-Kerscher, A., Stefani, G., Byrom, M., Kelnar, K., Ovcharenko, D., Wilson, M., Wang, X., Shelton, J., Shingara, J., Chin, L., Brown, D., and Slack, F.J. (2007) The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res* 67:7713-7722.
- Johnson, S.M., Lin, S.Y., and Slack, F.J. (2003) The time of appearance of the *C. elegans* let-7 microRNA is transcriptionally controlled utilizing a temporal regulatory element in its promoter. *Dev Biol* 259:364-379.
- Josson, S., Sung, S.Y., Lao, K., Chung, L.W., and Johnstone, P.A. (2008) Radiation modulation of microRNA in prostate cancer cell lines. *Prostate* 68:1599-1606.
- Judson, R.L., Babiarz, J.E., Venere, M., and Blelloch, R. (2009) Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat Biotechnol* 27:459-461.
- Kaliman, P., Vinals, F., Testar, X., Palacin, M., and Zorzano, A. (1996) Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors block differentiation of skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 271:19146-19151.
- Kanamoto, T., Terada, K., Yoshikawa, H., and Furukawa, T. (2006) Cloning and regulation of the vertebrate homologue of lin-41 that functions as a heterochronic gene in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Dyn* 235:1142-1149.
- Kanellopoulou, C., Muljo, S.A., Kung, A.L., Ganesan, S., Drapkin, R., Jenuwein, T., Livingston, D.M., and Rajewsky, K. (2005) Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev* 19:489-501.

- Kelly, E.J., Hadac, E.M., Greiner, S., and Russell, S.J. (2008) Engineering microRNA responsiveness to decrease virus pathogenicity. *Nat Med* 14:1278-1283.
- Kennell, J.A., Gerin, I., MacDougald, O.A., and Cadigan, K.M. (2008) The microRNA miR-8 is a conserved negative regulator of Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:15417-15422.
- Kiriakidou, M., Tan, G.S., Lamprinaki, S., De Planell-Saguer, M., Nelson, P.T., and Mourelatos, Z. (2007) An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell* 129:1141-1151.
- Krutzfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K.G., Tuschl, T., Manoharan, M., and Stoffel, M. (2005) Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 438:685-689.
- Le, M.T., Teh, C., Shyh-Chang, N., Xie, H., Zhou, B., Korzh, V., Lodish, H.F., and Lim, B. (2009) MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. *Genes Dev* 23:862-876.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843-854.
- Li, J., Wang, G., Wang, C., Zhao, Y., Zhang, H., Tan, Z., Song, Z., Ding, M., and Deng, H. (2007) MEK/ERK signaling contributes to the maintenance of human embryonic stem cell self-renewal. *Differentiation* 75:299-307.
- Liao, J., Wu, Z., Wang, Y., Cheng, L., Cui, C., Gao, Y., Chen, T., Rao, L., Chen, S., Jia, N., Dai, H., Xin, S., Kang, J., Pei, G., and Xiao, L. (2008) Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors. *Cell Res* 18:600-603.
- Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S., and Johnson, J.M. (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433:769-773.
- Lin, C.H., Jackson, A.L., Guo, J., Linsley, P.S., and Eisenman, R.N. (2009) Myc-regulated microRNAs attenuate embryonic stem cell differentiation. *EMBO J* 28:3157-3170.
- Lin, Y.C., Hsieh, L.C., Kuo, M.W., Yu, J., Kuo, H.H., Lo, W.L., Lin, R.J., Yu, A.L., and Li, W.H. (2007) Human TRIM71 and its nematode homologue are targets of let-7 microRNA and its zebrafish orthologue is essential for development. *Mol Biol Evol* 24:2525-2534.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. (2004) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305:1437-1441.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., Downing, J.R., Jacks, T., Horvitz, H.R., and Golub, T.R. (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435:834-838.
- MacRae, I.J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C.V., and Doudna, J.A. (2008) In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:512-517.
- Maller Schulman, B.R., Liang, X., Stahlhut, C., DelConte, C., Stefani, G., and Slack, F.J. (2008) The let-7 microRNA target gene, *Mlin41/Trim71* is required for mouse embryonic survival and neural tube closure. *Cell Cycle* 7:3935-3942.
- Maniataki, E., and Mourelatos, Z. (2005) A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev* 19:2979-2990.
- 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., and Young, R.A. (2008) Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell* 134:521-533.

- Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Luhrmann, R., and Tuschl, T. (2002) Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 110:563-574.
- Martinez, J., and Tuschl, T. (2004) RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev* 18:975-980.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., and Tuschl, T. (2004) Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 15:185-197.
- Melton, C., Judson, R.L., and Blelloch, R. Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature* 463:621-626.
- Morita, K., and Han, M. (2006) Multiple mechanisms are involved in regulating the expression of the developmental timing regulator *lin-28* in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* 25:5794-5804.
- Moss, E.G., Lee, R.C., and Ambros, V. (1997) The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA. *Cell* 88:637-646.
- Murchison, E.P., Partridge, J.F., Tam, O.H., Cheloufi, S., and Hannon, G.J. (2005) Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12135-12140.
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., and Roder, J.C. (1993) Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8424-8428.
- Neumuller, R.A., Betschinger, J., Fischer, A., Bushati, N., Poernbacher, I., Mechtler, K., Cohen, S.M., and Knoblich, J.A. (2008) Mei-P26 regulates microRNAs and cell growth in the *Drosophila* ovarian stem cell lineage. *Nature* 454:241-245.
- Nichols, J., and Smith, A. (2009) Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* 4:487-492.
- Nimmo, R.A., and Slack, F.J. (2009) An elegant miRror: microRNAs in stem cells, developmental timing and cancer. *Chromosoma* 118:405-418.
- Nishino, J., Kim, I., Chada, K., and Morrison, S.J. (2008) Hmga2 promotes neural stem cell self-renewal in young but not old mice by reducing p16Ink4a and p19Arf Expression. *Cell* 135:227-239.
- O'Day, E., and Lal, A. MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer. *Breast Cancer Res* 12:201.
- O'Farrell, F., Esfahani, S.S., Engstrom, Y., and Kylsten, P. (2008) Regulation of the *Drosophila* *lin-41* homologue *dappled* by *let-7* reveals conservation of a regulatory mechanism within the LIN-41 subclade. *Dev Dyn* 237:196-208.
- Ouellet, S., Vigneault, F., Lessard, M., Leclerc, S., Drouin, R., and Guerin, S.L. (2006) Transcriptional regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21) gene by NFI in proliferating human cells. *Nucleic Acids Res* 34:6472-6487.
- Ozato, K., Shin, D.M., Chang, T.H., and Morse, H.C., 3rd (2008) TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 8:849-860.
- Park, S.M., Shell, S., Radjabi, A.R., Schickel, R., Feig, C., Boyerinas, B., Dinulescu, D.M., Lengyel, E., and Peter, M.E. (2007) *Let-7* prevents early cancer progression by suppressing expression of the embryonic gene *HMGGA2*. *Cell Cycle* 6:2585-2590.
- Parry, D.H., Xu, J., and Ruvkun, G. (2007) A whole-genome RNAi Screen for *C. elegans* miRNA pathway genes. *Curr Biol* 17:2013-2022.
- Pegtel, D.M., Cosmopoulos, K., Thorley-Lawson, D.A., van Eijndhoven, M.A., Hopmans, E.S., Lindenberg, J.L., de Gruijl, T.D., Wurdinger, T., and Middeldorp, J.M. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:6328-6333.
- Pera, M.F., and Tam, P.P. (2010) Extrinsic regulation of pluripotent stem cells. *Nature* 465:713-720.

- Polyak, K., and Weinberg, R.A. (2009) Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 9:265-273.
- Pucci, F., Venneri, M.A., Bizziato, D., Nonis, A., Moi, D., Sica, A., Di Serio, C., Naldini, L., and De Palma, M. (2009) A distinguishing gene signature shared by tumor-infiltrating Tie2-expressing monocytes, blood "resident" monocytes, and embryonic macrophages suggests common functions and developmental relationships. *Blood* 114:901-914.
- Radfar, M., Wong, W., and Morris, Q.D. Predicting the target genes of intronic microRNAs using large-scale gene expression data. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 1:791-794.
- Rapp, U.R., Ceteci, F., and Schreck, R. (2008) Oncogene-induced plasticity and cancer stem cells. *Cell Cycle* 7:45-51.
- Rathjen, J., Lake, J.A., Bettess, M.D., Washington, J.M., Chapman, G., and Rathjen, P.D. (1999) Formation of a primitive ectoderm like cell population, EPL cells, from ES cells in response to biologically derived factors. *J Cell Sci* 112 ( Pt 5):601-612.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403:901-906.
- Robb, G.B., and Rana, T.M. (2007) RNA helicase A interacts with RISC in human cells and functions in RISC loading. *Mol Cell* 26:523-537.
- Roush, S.F., and Slack, F.J. (2009) Transcription of the *C. elegans* let-7 microRNA is temporally regulated by one of its targets, *hbl-1*. *Dev Biol* 334:523-534.
- Rybak, A., Fuchs, H., Hadian, K., Smirnova, L., Wulczyn, E.A., Michel, G., Nitsch, R., Krappmann, D., and Wulczyn, F.G. (2009) The let-7 target gene mouse *lin-41* is a stem cell specific E3 ubiquitin ligase for the miRNA pathway protein Ago2. *Nat Cell Biol* 11:1411-1420.
- Rybak, A., Fuchs, H., Smirnova, L., Brandt, C., Pohl, E.E., Nitsch, R., and Wulczyn, F.G. (2008) A feedback loop comprising *lin-28* and *let-7* controls pre-*let-7* maturation during neural stem-cell commitment. *Nat Cell Biol* 10:987-993.
- Sachdeva, M., Zhu, S., Wu, F., Wu, H., Walia, V., Kumar, S., Elble, R., Watabe, K., and Mo, Y.Y. (2009) p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:3207-3212.
- Sachdeva, R., Jonsson, M.E., Nelander, J., Kirkeby, A., Guibentif, C., Gentner, B., Naldini, L., Bjorklund, A., Parmar, M., and Jakobsson, J. Tracking differentiating neural progenitors in pluripotent cultures using microRNA-regulated lentiviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:11602-11607.
- Saito, Y., Suzuki, H., Tsugawa, H., Nakagawa, I., Matsuzaki, J., Kanai, Y., and Hibi, T. (2009) Chromatin remodeling at Alu repeats by epigenetic treatment activates silenced microRNA-512-5p with downregulation of Mcl-1 in human gastric cancer cells. *Oncogene* 28:2738-2744.
- Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P., and Brivanlou, A.H. (2004) Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* 10:55-63.
- Scadden, A.D. (2005) The RISC subunit Tudor-SN binds to hyper-edited double-stranded RNA and promotes its cleavage. *Nat Struct Mol Biol* 12:489-496.
- Schepeler, T., Reinert, J.T., Ostefeld, M.S., Christensen, L.L., Silahtaroglu, A.N., Dyrskjot, L., Wiuf, C., Sorensen, F.J., Kruhoffer, M., Laurberg, S., Kauppinen, S., Orntoft, T.F., and Andersen, C.L. (2008) Diagnostic and prognostic microRNAs in stage II colon cancer. *Cancer Res* 68:6416-6424.
- Scherr, M., Venturini, L., Battmer, K., Schaller-Schoenitz, M., Schaefer, D., Dallmann, I., Ganser, A., and Eder, M. (2007) Lentivirus-mediated antagomir expression for specific inhibition of miRNA function. *Nucleic Acids Res* 35:e149.
- Schmitt, F., Remy, S., Dariel, A., Flageul, M., Pichard, V., Boni, S., Usal, C., Myara, A., Laplanche, S., Anegon, I., Labrune, P., Podevin, G., Ferry, N., and Nguyen, T.H.

- Lentiviral vectors that express UGT1A1 in liver and contain miR-142 target sequences normalize hyperbilirubinemia in Gunn rats. *Gastroenterology* 139:999-1007, 1007 e1001-1002.
- Schwamborn, J.C., Berezikov, E., and Knoblich, J.A. (2009) The TRIM-NHL protein TRIM32 activates microRNAs and prevents self-renewal in mouse neural progenitors. *Cell* 136:913-925.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P.D. (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115:199-208.
- Segerson, K., Tang, L., and Moss, E.G. (2002) Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Dev Biol* 243:215-225.
- Sengupta, S., Nie, J., Wagner, R.J., Yang, C., Stewart, R., and Thomson, J.A. (2009) MicroRNA 92b controls the G1/S checkpoint gene *p57* in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 27:1524-1528.
- Shen, M.M. (2007) Nodal signaling: developmental roles and regulation. *Development* 134:1023-1034.
- Shin, J.S., Hong, S.W., Lee, S.L., Kim, T.H., Park, I.C., An, S.K., Lee, W.K., Lim, J.S., Kim, K.I., Yang, Y., Lee, S.S., Jin, D.H., and Lee, M.S. (2008) Serum starvation induces G1 arrest through suppression of Skp2-CDK2 and CDK4 in SK-OV-3 cells. *Int J Oncol* 32:435-439.
- Sinkkonen, L., Hugenschmidt, T., Berninger, P., Gaidatzis, D., Mohn, F., Artus-Revel, C.G., Zavolan, M., Svoboda, P., and Filipowicz, W. (2008) MicroRNAs control de novo DNA methylation through regulation of transcriptional repressors in mouse embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol* 15:259-267.
- Slack, F., and Ruvkun, G. (1997) Temporal pattern formation by heterochronic genes. *Annu Rev Genet* 31:611-634.
- Sohn, S.Y., Bae, W.J., Kim, J.J., Yeom, K.H., Kim, V.N., and Cho, Y. (2007) Crystal structure of human DGCR8 core. *Nat Struct Mol Biol* 14:847-853.
- Song, J.J., Liu, J., Tolia, N.H., Schneiderman, J., Smith, S.K., Martienssen, R.A., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2003) The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol* 10:1026-1032.
- Suh, N., Baehner, L., Moltzahn, F., Melton, C., Shenoy, A., Chen, J., and Blelloch, R. MicroRNA function is globally suppressed in mouse oocytes and early embryos. *Curr Biol* 20:271-277.
- Suzuki, M., Igarashi, R., Sekiya, M., Utsugi, T., Morishita, S., Yukawa, M., and Ohya, Y. (2004) Dynactin is involved in a checkpoint to monitor cell wall synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Cell Biol* 6:861-871.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-676.
- Takaoka, K., Yamamoto, M., Shiratori, H., Meno, C., Rossant, J., Saijoh, Y., and Hamada, H. (2006) The mouse embryo autonomously acquires anterior-posterior polarity at implantation. *Dev Cell* 10:451-459.
- Tanaka, S., Kunath, T., Hadjantonakis, A.K., Nagy, A., and Rossant, J. (1998) Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science* 282:2072-2075.
- Tang, F., Kaneda, M., O'Carroll, D., Hajkova, P., Barton, S.C., Sun, Y.A., Lee, C., Tarakhovskiy, A., Lao, K., and Surani, M.A. (2007) Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. *Genes Dev* 21:644-648.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147.



- Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N., and Zamore, P.D. (2004) A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science* 306:1377-1380.
- Tominaga, Y., Li, C., Wang, R.H., and Deng, C.X. (2006) Murine Wee1 plays a critical role in cell cycle regulation and pre-implantation stages of embryonic development. *Int J Biol Sci* 2:161-170.
- Vallier, L., Mendjan, S., Brown, S., Chng, Z., Teo, A., Smithers, L.E., Trotter, M.W., Cho, C.H., Martinez, A., Rugg-Gunn, P., Brons, G., and Pedersen, R.A. (2009) Activin/Nodal signalling maintains pluripotency by controlling Nanog expression. *Development* 136:1339-1349.
- Vallier, L., Reynolds, D., and Pedersen, R.A. (2004) Nodal inhibits differentiation of human embryonic stem cells along the neuroectodermal default pathway. *Dev Biol* 275:403-421.
- Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J.A. (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318:1931-1934.
- Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J.A. (2008) Cell-cycle control of microRNA-mediated translation regulation. *Cell Cycle* 7:1545-1549.
- Vella, M.C., Reinert, K., and Slack, F.J. (2004) Architecture of a validated microRNA::target interaction. *Chem Biol* 11:1619-1623.
- Vignuzzi, M., Wendt, E., and Andino, R. (2008) Engineering attenuated virus vaccines by controlling replication fidelity. *Nat Med* 14:154-161.
- Voorhoeve, P.M., le Sage, C., Schrier, M., Gillis, A.J., Stoop, H., Nagel, R., Liu, Y.P., van Duijse, J., Drost, J., Griekspoor, A., Zlotorynski, E., Yabuta, N., De Vita, G., Nojima, H., Looijenga, L.H., and Agami, R. (2006) A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell* 124:1169-1181.
- Wang, H.W., Noland, C., Siridechadilok, B., Taylor, D.W., Ma, E., Felderer, K., Doudna, J.A., and Nogales, E. (2009) Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex. *Nat Struct Mol Biol* 16:1148-1153.
- Wang, Y., Baskerville, S., Shenoy, A., Babiarz, J.E., Baehner, L., and Blelloch, R. (2008) Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. *Nat Genet* 40:1478-1483.
- Wang, Y., and Blelloch, R. (2009) Cell cycle regulation by MicroRNAs in embryonic stem cells. *Cancer Res* 69:4093-4096.
- Wang, Y.C., Chen, Y.L., Yuan, R.H., Pan, H.W., Yang, W.C., Hsu, H.C., and Jeng, Y.M. Lin-28B expression promotes transformation and invasion in human hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 31:1516-1522.
- Wei, Z., Yang, Y., Zhang, P., Andrianakos, R., Hasegawa, K., Lyu, J., Chen, X., Bai, G., Liu, C., Pera, M., and Lu, W. (2009) Klf4 interacts directly with Oct4 and Sox2 to promote reprogramming. *Stem Cells* 27:2969-2978.
- Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75:855-862.
- Wilder, P.J., Kelly, D., Brigman, K., Peterson, C.L., Nowling, T., Gao, Q.S., McComb, R.D., Capecchi, M.R., and Rizzino, A. (1997) Inactivation of the FGF-4 gene in embryonic stem cells alters the growth and/or the survival of their early differentiated progeny. *Dev Biol* 192:614-629.
- Williams, L., and Fletcher, J.C. (2005) Stem cell regulation in the Arabidopsis shoot apical meristem. *Curr Opin Plant Biol* 8:582-586.
- Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P.A., and Hogan, B.L. (1995) Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* 9:2105-2116.

- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., and Diederichs, S. (2009) Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 11:228-234.
- Wobus, A.M., Holzhausen, H., Jakel, P., and Schoneich, J. (1984) Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp Cell Res* 152:212-219.
- Wong, H.H., Lemoine, N.R., and Wang, Y. *Oncolytic Viruses for Cancer Therapy: Overcoming the Obstacles*. *Viruses* 2:78-106.
- Xu, B., Zhang, K., and Huang, Y. (2009a) Lin28 modulates cell growth and associates with a subset of cell cycle regulator mRNAs in mouse embryonic stem cells. *RNA* 15:357-361.
- Xu, N., Papagiannakopoulos, T., Pan, G., Thomson, J.A., and Kosik, K.S. (2009b) MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell* 137:647-658.
- Yang, X., Haurigot, V., Zhou, S., Luo, G., and Couto, L.B. Inhibition of hepatitis C virus replication using adeno-associated virus vector delivery of an exogenous anti-hepatitis C virus microrna cluster. *Hepatology*.
- Ye, X., and Liu, Q. (2008) Expression, purification, and analysis of recombinant *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 enzymes. *Methods Mol Biol* 442:11-27.
- Ying, Q.L., Nichols, J., Chambers, I., and Smith, A. (2003) BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 115:281-292.
- Ying, Q.L., Wray, J., Nichols, J., Battle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., and Smith, A. (2008) The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 453:519-523.
- Ylosmaki, E., Hakkarainen, T., Hemminki, A., Visakorpi, T., Andino, R., and Saksela, K. (2008) Generation of a conditionally replicating adenovirus based on targeted destruction of E1A mRNA by a cell type-specific MicroRNA. *J Virol* 82:11009-11015.
- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, II, and Thomson, J.A. (2009) Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324:797-801.
- Zeng, Y., Yi, R., and Cullen, B.R. (2003) MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9779-9784.
- Zhang, N., Liu, J., Ding, X., Aikhionbare, F., Jin, C., and Yao, X. (2007) FBXL5 interacts with p150Glued and regulates its ubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun* 359:34-39.
- Zhao, L., Kim, Y., Dinh, T.T., and Chen, X. (2007) miR172 regulates stem cell fate and defines the inner boundary of APETALA3 and PISTILLATA expression domain in Arabidopsis floral meristems. *Plant J* 51:840-849.
- Zovoilis, A., Smorag, L., Pantazi, A., and Engel, W. (2009) Members of the miR-290 cluster modulate in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *Differentiation* 78:69-78.

## **M2 Publikációs jegyzék**

### **Külföldön kiadott tudományos folyóiratok**

- Lichner, Zs., Silhavy, D., Burgyan, J. (2003): Double-stranded RNA-binding proteins could suppress RNA interference-mediated antiviral defences. *Journal of General Virology* 84. 975-80. **IF: 3,260**
- Lichner Z, Páll E, Kerekes A, Pállinger E, Maraghechi P, Bősze Z, Gócza E. (2011): The miR-290-295 cluster promotes pluripotency maintenance by regulating cell cycle phase distribution in mouse embryonic stem cells. *Differentiation*, 81(1):11-24. **IF: 3,311**

### **Kongresszusi kiadványokban megjelent közlemények angolul**

- Lichner, Zs., Páll, E., Bősze, Zs., Gócza, E. (2008): Investigation the role of stem cell specific mmu-miR-290-295 cluster. First International Conference of Functional Annotation 1of The Mammalian Genome, P18., p31. 2008.01.23-25., Rottach-Egern, Germany, poster, abstract
- Lichner Zs., Páll, E., Gócza, E. (2008): Investigation the role of stem cell specific mmu-miR-290-295 cluster. Institute of Experimental Medicine of the Hungarian Academy of Sciences, Stem cell mini-symposium, 2008.02.11. **lecture**
- Pall, E., Lichner, Zs., Bontovics, B., Gocza, E. (2008): Differentiation of embryonic stem cells: lessons from embryonic development. *Lucrări științifice Zootehnie și Biotehnologii*, 41 (1), 130-137. ISSN 1221-5287
- Vintilă, R.D., Ilie, D., Gavriluc, O., Gócza, E, Lichner, Zs., Vintilă, C., Nichita, I., Cotulbea, S., Tatu, C. (2008): Utricular epithelia in mice contains pluripotent stem cells *Lucrări științifice Zootehnie și Biotehnologii*, 41(1), p174-180., abstract
- Gócza, E., Lichner, Zs., Carstea, V.B., Dobó, K., Bontovics, B., Bősze, Zs. (2008): Examination of microRNA mmu-miR-290 expression level alteration in mouse embryonic stem cells with increasing passages number. *Transgenic Research* 17/5 pp.1008-1009, poster, abstract **IF: 2,809**
- Lichner, Zs., Páll, E., Bősze, Zs., Gócza, E. (2008): Overexpression of miR290-295 miRNA cluster in mouse ES. *Transgenic Research* 17/5. p1014, poster, abstract **IF: 2,809**
- Pall, E., Lichner, Zs., Groza, I., Gócza, E. (2008): LIF: its implication in mouse embryonic stem cells pluripotency. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary*

Medicine Cluj-Napoca, Veterinary Medicine, 65/1 pISSN-1843-5270, eISSN 1843-5378. absztrakt

Lichner, Zs., Páll, E., Bősze, Zs., Gócza, E. (2008): Overexpression of miR290-295 miRNA cluster in mouse ES. ESTOOLS Consortium Meeting, p20., Magyar Őssejt konferencia, Budapest, Hungary, 2008.05.05, poster, **lecture**, abstract

Gócza, E., Lichner, Zs., Páll, E., Pállinger É., P. Maraghechi, Bontovics, B., Bősze, Zs., (2009): Function of miR-290-295 micro RNA cluster in mouse embryonic stem cell self-renewal. ISSCR 7th Annual Meeting, p121, 757, Barcelona, Spain, July 8-11, 2009, poster, abstract

Maraghechi, P., Lichner, Zs., Hiripi, L., Lemos, A.P.C., Bősze, Zs. Gócza, E. (2009): On the role of LIF and bFGF in rabbit ESC line derivation, characterization of pluripotency marker expression in rabbit ESC lines. The 3rd International Meeting on Rabbit Biotechnology. Xian, China, June 4-5., 2009. poster, abstract, Worl Rabbit Sci. 16 (239), **IF: 0,453**

Gócza, E., Maraghechi, P., Lichner, Zs., Hiripi, L., Lemos, A.P.C., Bősze, Zs. (2009): Examination of the influence LIF and bFGF on the efficiency of rabbit ESC line derivation. Regenerative Medicine, 4(6) Suppl. 2. S183-184., World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig, Germany, October 29-31., 2009., abstract, poster, **IF: 2,929**

Maraghechi, P., Lichner, Zs., Hiripi, L., Lemos, A.P.C., Bősze, Zs., Gócza, E. (2010): Investigation of the effect of LIF and bFGF on rabbit ESC pluripotency and derivation efficiency. Transgenic Research 19(2) p341, poster, abstract **IF: 2,467**

Maraghechi, P., Lichner, Zs., Bősze, Zs., Gócza, E. (2010) Identification of embryonic stem cell- specific microRNAs. Non-Coding Genom conf. Heidelberg, abstract, poster

### **Kongresszusi kiadványokban megjelent közlemények magyarul**

Gócza E., Lichner Zs. (2007): Embrionális őssejtek sokszínű világa. Fókuszban az Őssejt-kutatás, Art Hotel, Budapest, 2007.03.29.

Dobó K., Carstea V.B., Stanca C., Lichner Zs.(2007): Egér embrionális őssejtek ivarsejt kiméra alkotó képességének vizsgálata. VII. Magyar Genetikai Kongresszus / XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, P034, p110, Balatonfüred, 2007.04.15-17., poszter

Lichner Zs., Páll, E., Bősze, Zs., Gócza, E. (2007): Szívizom-specifikus miRNS vizsgálata *in vitro*. VII. Magyar Genetikai Kongresszus / XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, P070, pp. 141-142, Balatonfüred, 2007.04.15-17., poszter

Lichner Zs., Páll, E., Bősze, Zs., Gócza, E. (2007): Szívizom-specifikus miRNS vizsgálata *in*

*vitro*. SZIE, Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola, III. fórum, p28. Gödöllő, előadás

Gócza, E., Lichner, Zs., Páll. E., Bontovics, B., Bősze, Zs. (2008): Embrionális eredetű őssejt-vonalak szerepe a differenciálódás során lejátszódó folyamatok mechanizmusainak tanulmányozásában. „RNS Országgyűlés, Visegrád”, pp. 5-8., 2008.04.03-04., absztrakt,

Gócza E., Lichner Zs., Páll E., Bontovics B., Maraghechi, P., Bősze Zs. (2008): A differenciálódás során lejátszódó folyamatok mechanizmusának tanulmányozása egér embrionális eredetű őssejtek felhasználásával. Charles River Laboratories, Partner találkozó, Gödöllő, 2008. 11.12., absztrakt

Gócza E., Lichner Zs., Páll E., Bontovics B., Maraghechi, P., Bősze Zs. (2008): A miR290-295 őssejt specifikus mikro RNS-ek, illetve őssejt specifikus transzkripciós faktorok expressziós mintázatának vizsgálata egér embrionális őssejt vonalakban. MBK Napok p8., Gödöllő, 2008.11.17-18., absztrakt

Bontovics B., Lichner Zs., Páll E, Carstea V.B., Maraghechi P., Bősze Zs., Gócza E. (2009): A miR-290-295 őssejt specifikus mikro RNS-ek, illetve őssejt specifikus transzkripciós faktorok expressziós mintázatának vizsgálata egér embrionális őssejt vonalakban. VIII. Magyar Genetikai Kongresszus, XV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Nyíregyháza, p135, PS06, 2009.04.17-19., absztrakt, poszter

Lichner Zs., Páll E., Bősze Zs., Pállinger É., P. Maraghechi, Gócza E (2009): Az mmu-miR-290-295 őssejt specifikus mikroRNS klaszter funkcionális analízise egér embrionális őssejt vonalakban. VIII. Magyar Genetikai Kongresszus, XV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Nyíregyháza, p136, PS07, 2009.04.17-19., absztrakt, poszter

Lichner, Zs., Páll. E., Bontovics, B., Pállinger É., P. Maraghechi, Bősze, Zs., Gócza, E.(2009): Az mmu-miR-290-295 mikro RNS klaszter szerepe az egér embrionális őssejtek sejtciklusának szabályozásában „Consilium Silvanus, Pone Navata” Visegrád, pp. 23-28., 2009.06.18-19., absztrakt

### **Köszönetnyilvánítás**

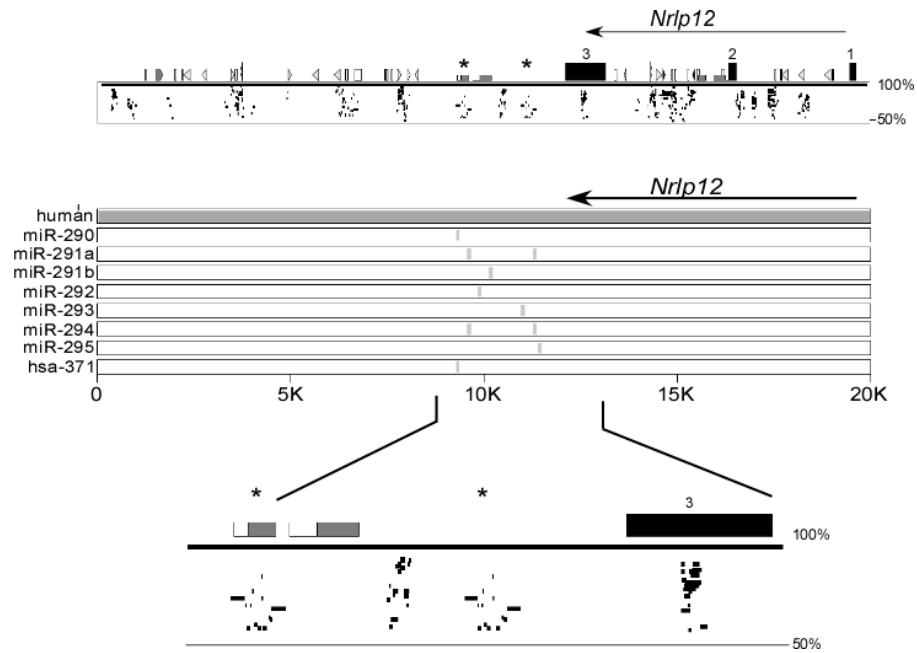
A dolgozat elkészítéséhez szükséges kísérleteket a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban végeztem. Köszönöm Dr. Nagy Ferencnek és Dr. Kiss György Botondnak az MBK volt és jelenlegi főigazgatóinak, hogy lehetővé tették a dolgozat elkészítését.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Góczy Elennek és Dr. Bősze Zsuzsannának a hosszúra nyúlt munkám során nyújtott folyamatos és nélkülözhetetlen segítségükért.

Hálával tartozom Dr. Hiripi Lászlónak, Dr. Baranyi Máriának, Dr. Bodrogi Lillának, Dr. Bender Baláznak, Dr. Ana Paula Catunda Lemosnak, Dr. Páll Emőkének, Dr. Pállinger Évának, Dr. Révay Baláznak, Grófné Marikának, Kerekes Andreának, Bontovics Babettnak, Pouneh Maraghechinek és az egész Genetikai Módosítás Program csoportnak a kísérletekben nyújtott segítségükért.

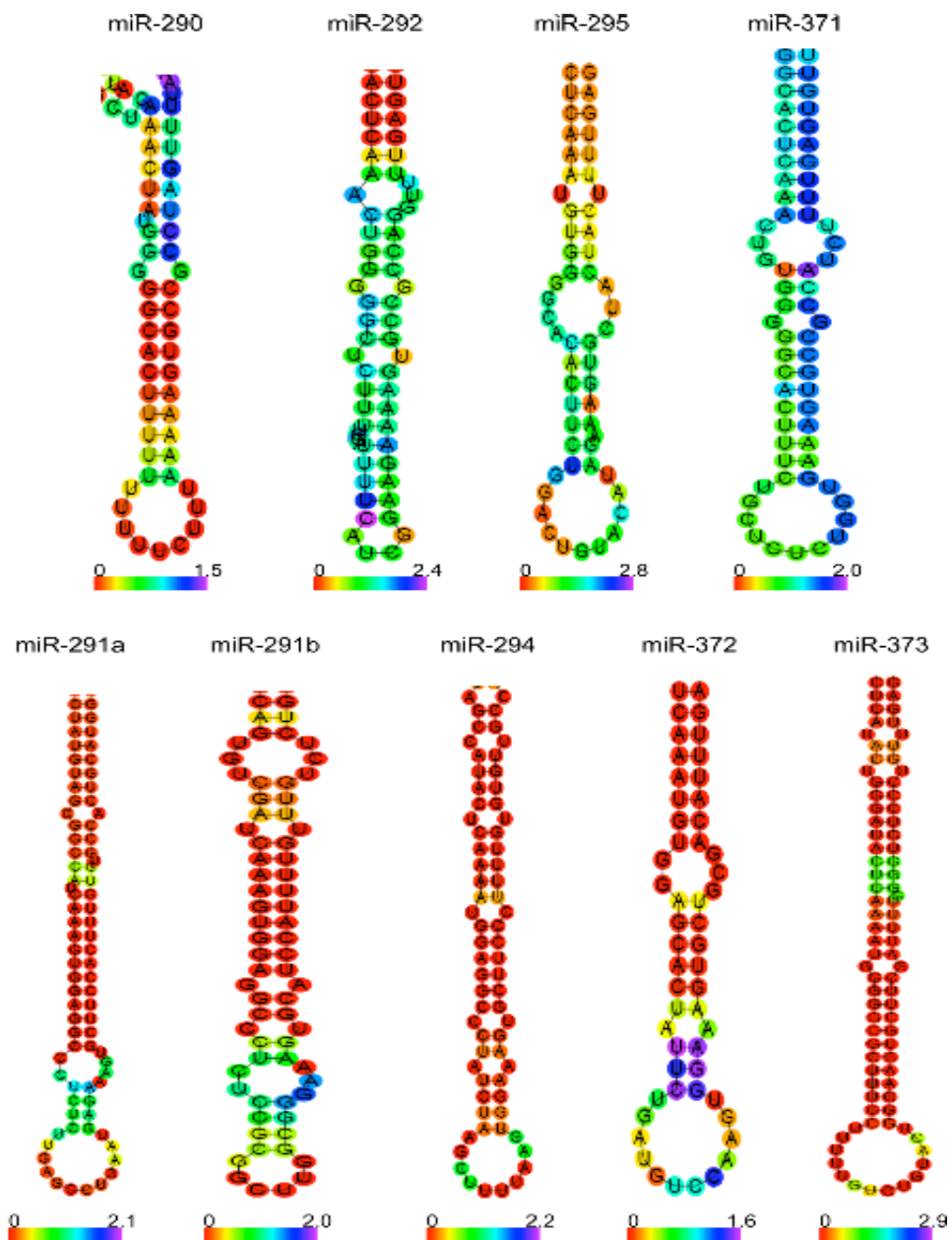
Munkám anyagi fedezetét a OM-00367/2004, OMFB-00368/2008 és ETT 405/2006, ANR-NKTH-Plurabit, 2009 pályázatok biztosították.

## Kiegészítő ábrák



## 1. Kiegészítő ábra

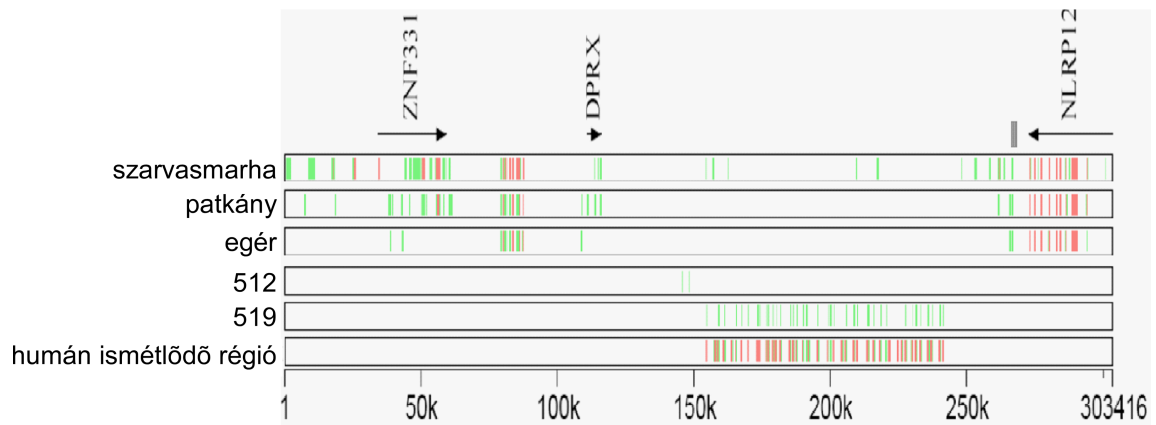
Egér miR-290-295 klaszter MultiPip plot analízise. Az ábra felő része a miR-290-295 klaszter pozícióját mutatja az egér genomában. A klaszterhez legközelebbi fehérje kódoló gén az *Nrlp12*. Az ábra középső részén a szürke téglalapok az ismétlődő szekvenciákat (duplikációkat) mutatják egér és humán klaszter összehasonlításakor. Az alsó panel az egér klaszter önmagával való összehasonlítása. Az ábra a duplikációs esemény eredményét mutatja.



2. Kiegészítő ábra

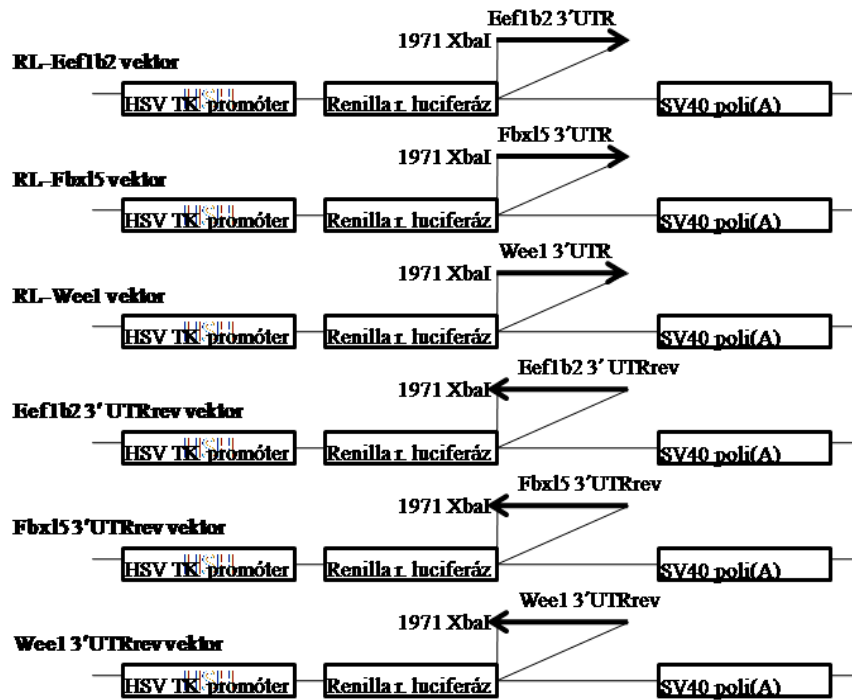
Az ábra az egér miR-290-295 klaszter és a human miR-371-373 klaszter miRNS prekurzorainak másodlagos szerkezetét mutatja.





3.Kiegészítő ábra

*Különböző emlősállatok miR-290-295 klaszter ortológ szekvenciáinak összehasonlítása MultiPipMaker programmal. A szürke téglalap a konzervált miR-290 szekvenciát mutatja.*



4. Kiegészítő ábra

Luciferáz esszéhez használt konstrukciók sematikus ábrája.

Az ábrán látható konstrukciók a Renilla reniformis luciferáz, mint riporter gént kódolják. Közvetlenül a fehérje kódoló szakasz utáni XbaI helyre klónoztuk a prediktált target gének teljes 3'UTR régióját szensz és antiszensz irányban. Azokat a konstrukciókat, amik anstizensz irányban tartalmazzák a miRNS felismerő helyet, kontrollként használtuk, a miRNS-target kötés specifitásának igazolására.