

**Szív, tumor és idegsejtek fókuszált miRNS és mRNS expressziós
analízise**

Ph.D értekezés

Faragó Nóra Katalin

Témavezető: Dr. Puskás László

MTA Szegedi Biológiai Központ, Funkcionális Genomika Laboratórium

**Biológia Doktori Iskola, SZTE-TTIK
2012**

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	3
GYAKRABBAN HASZNÁLT GÉN SZIMBÓLUMOK JEGYZÉKE.....	4
1. BEVEZETÉS.....	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	9
2.1 A miRNS-ek jellemzői, érési folyamatuk és a szabályozás mechanizmusa.....	9
2.2 A miRNS-ek szerepe a daganatképződésben.....	11
2.3 Glioblasztóma sejtek molekuláris karakterizálása.....	13
2.4 Többszörösen telítetlen zsírsavak alkalmazása a tumorterápiában.....	16
2.5 Interneuronok molekuláris karakterizálása.....	19
2.5.1 A neuronok csoportosításának nehézségei.....	20
2.5.2 A piramis sejtek.....	21
2.5.3 A neurogliaform sejtek.....	21
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	23
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	26
4.1 Sejtek tenyésztése és kezelése.....	26
4.2 Holografikus mikroszkópos vizsgálat.....	26
4.3 miRNS izoláló protokoll fejlesztése szívszövetre.....	26
4.4 Az RNS minőségi ellenőrzése.....	28
4.5 miRNS expresszió vizsgálata microarray technikával.....	28
4.6 miRNS expresszió meghatározása nanokapilláris QRT-PCR technikával.....	29
4.7 Valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció (QRT-PCR).....	30
4.7.1 miRNS expresszió mérése QRT-PCR technikával.....	30
4.7.2 Génexpresszió mérése QRT-PCR technikával.....	31
4.8 Génexpresszió vizsgálat digitális PCR technikával.....	32
4.9 Elektrofiziológia – whole-cell patch clamp technika.....	34

5. EREDMÉNYEK ÉS DISZKUSSZIÓ.....	35
5.1 Fibrózus szövetekből történő miRNS izolálás optimalizálása.....	35
5.2 Többszörösen telítetlen zsírsavakkal kezelt glioblasztóma sejtek miRNS és mRNA expressziós mintázata.....	40
5.2.1 PUFA-kezelt glioblasztóma sejtek vizsgálata holografikus mikroszkóppal.....	40
5.2.2 PUFA-kezelt glioblasztóma sejtek miRNS expressziós analízise.....	42
5.2.3 miRNS expressziós eredmények visszaigazolása a célgén vizsgálatával.....	46
5.2.4 PUFA-kezelt glioblasztóma sejtek mRNA expressziós analízise.....	47
5.2.5 Eredmények értékelése.....	49
5.3 Többszörösen telítetlen zsírsavak miRNS és mRNA expresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata.....	55
5.3.1 PUFA-tartalmú étrend hatása miRNS expresszióra.....	56
5.3.2 PUFA-tartalmú étrend hatása mRNA expresszióra	56
5.3.3 Értékelés és diszkusszió – szívszövet.....	57
5.3.4 Értékelés és diszkusszió – májszövet.....	61
5.4 Idegsejtek karakterizálása miRNS és mRNA mintázat alapján.....	64
5.4.1 Idegsejtek molekuláris jellemzése: módszerfejlesztés.....	64
5.4.2 Idegsejtek molekuláris jellemzése mRNA expresszió alapján.....	68
5.4.3 Idegsejtek molekuláris jellemzése miRNS expresszió alapján.....	71
6. KÖVETKEZTETÉSEK.....	73
7. ÖSSZEFOGLALÁS.....	75
8. SUMMARY.....	80
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	87
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	97
11. PUBLIKÁCIÓS LISTA.....	98
12. FÜGGELÉK.....	100

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE:

AA – arachidonsav (arachidonic acid)
Ct – küszöbciklus (cycle threshold)
DHA – dokozahexaén-sav (docosahexaenoic acid)
DMEM – Dulbecco sejtenyésztő médium (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
dPCR – digitális polimeráz láncreakció
EPA – eikozapentaén-sav (eicosapentaenoic acid)
EZH2 – hiszton-lizin N-metiltranszferáz
FCS – főtális borjú szérum (fetal calf serum)
FSN – fast spiker neuron
GABA – gamma-amino-vajsav (gamma-aminobutyric acid)
GAPDH – glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
GLA – gamma linolénsav (gamma-linolenic acid)
HTS – nagy áteresztőképességű szűrés (high-throughput screening)
MGMT – metil-guanin metil-transzferáz
miRNP – mikro RNS – ribonukleoprotein komplex
miRNS, miR – mikro RNS
mRNS – hírvivő RNS
NGF – neurogliaform sejt
PC – piramissejt
RISC – RNS-indukált csendesítő komplex (RNA induced silencing complex)
RNáz – ribonukleáz
rRNS – riboszomális RNS
RT – reverz transzkripció
SC-QPCR – egy-sejt valós idejű polimeráz láncreakció
siRNS – kis interferáló RNS (small interfering RNA)
TMZ – temozolomid
3' UTR – 3' nem transzlálódó régió (3' untranslated region)
5' UTR – 5' nem transzlálódó régió (5' untranslated region)

GYAKRABBAN HASZNÁLT GÉNEK JEGYZÉKE:

acox1 – acetil-koenzim A oxidáz 1
act1 – alfa aktinin 1
apol2 – apolipoprotein L-2
apoa5 – apolipoprotein A-V
bax – BCL2-asszociált X gén
bcl2 – B sejtes leukémia/limfóma 2
ccnd1 – ciklin D1
cox1, 2 – ciklooxigenáz 1, 2
cxcl12 – kemokin (C-X-C) ligand 12
egfr – eukarióta növekedési faktor receptor
ezh2 – hiszton-lizin N-metiltranszferáz
fas – TNF receptor superfamily member 6
hpert – hipoxantin foszforiboziltranszferáz
gabrd - gamma-aminovajsav (GABA) A receptor, delta
gapdh – gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz
igf – inzulin-szerű növekedési faktor
igf-1r – inzulin-szerű növekedési faktor 1 receptor
irs1, irs2 – inzulin receptor szubsztrát 1, 2
lypla3 – lizofoszfolipáz 3
mapk – mitogén-aktivált protein kináz
mgmt - O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
nfkB - nukleáris faktor kappa-B
nrf2 - nukleáris, eritroid-eredetű faktor 2
npY - neuropeptid Y
pafah1b1 – trombocita-aktiváló faktor acetilhidroláz, izoforma 1b, alegység 1
pdcd4 – programozott sejthalál 4
pecam1 – trombocita/endothél sejt adhézións molekula
pdgfra – vérlemezke eredetű növekedési faktor receptor A
ppara – peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor alfa

pten – foszfatáz és tenzin homológ

rps18 – riboszomális protein S18

sele - selectin E

selp - selectin P

sgms1 – szfingomielin szintáz 1

tp53 – tumor protein p53

tnf - tumor nekrosis faktor

tubb – béta tubulin

vegfa- vaszkuláris endotheliális növekedési faktor A

1. BEVEZETÉS

Az utóbbi évek molekuláris biológiai kutatásainak egyik legjelentősebb eredménye a mikro RNS molekulák (miRNS) felfedezése és jelentőségük felismerése volt. A betegségek genetikai hátterében a fehérjéket kódoló gének mindig aránytalanul nagy hangsúlyt kaptak, még 50 évvel a DNS modelljének leírása után is. Az életfolyamatok molekuláris bonyolultsága azonban igen sokféle feladatra specializálódott alkotót feltételez. Ennek megfelelően az emberi gének számát kezdetben több mint 100 ezerre becsülték, ám mai tudásunk alapján és a humán genom szekvenciájának birtokában, ez a szám csupán 25-28 ezerre tehető. A túlbecslés egyik oka, hogy az átíródó primer mRNS-ekből alternatív splicinggal számos különböző módosulat keletkezhet, nagyszámú protein variánst eredményezve. A kutatók figyelme egészen a 90'-es évekig elsősorban ezekre a kódoló régiókra irányult, amelyek a humán genomnak alig több mint 1%-át teszik ki. Mára azonban egyértelművé vált, hogy számos, a génexpressziót befolyásoló regulátor elem éppen a nem kódoló intergenikus DNS szakaszokra lokalizálódik. Az utóbbi évtized felismerése az is, hogy a nem transzlálódó kis RNS molekulák (mikro RNS-ek) fontos szabályozó szerepet töltenek be a fehérjék keletkezésének szabályozásában. A mikro RNS-ek olyan RNS molekulák, melyek hosszúsága általában 17-25 nukleotid, nem kódolnak fehérjét, de mRNS kölcsönhatásuk révén hatással vannak a sejtek működésére. Ezek a kisméretű RNS molekulák, ugyanis képesek a mRNS-k 3' UTR-régiójához kapcsolódni, és ezáltal transzlációjukat gátolni, illetve lebontási folyamataikat elősegíteni.

A miRNS-ek jelentőségére először 1993-ban figyeltek fel. A Harvard egyetemen Victor Ambros és munkatársai évek óta igyekeztek megfejteni a *Caenorhabditis elegans* *lin-14* génjének a lárvafejlődésben betöltött szerepét. Azt tapasztalták, hogy a LIN-14 proteinek abundanciájáért egy rövid RNS szakasz felelős, melyet a *lin-4* gén kódol. A *lin-4* szekvenciáról előbb egy 61 nukleotid hosszúságú prekursor RNS, majd ebből egy 22 nukleotidos, érett miRNS molekula keletkezik, amely komplementere a *lin-14* mRNS 3' UTR régió bizonyos szakaszainak, ezáltal képes azokhoz hozzákapcsolódni (1).

A miRNS-eket kódoló gének megtalálhatóak a legkülönbözőbb fajok, így az ember genomjában is. Kifejeződésük egy adott szervezeten belül sejt- illetve szövetspecifikus. Az ezidáig azonosított humán miRNS szekvenciák száma meghaladja az ezret

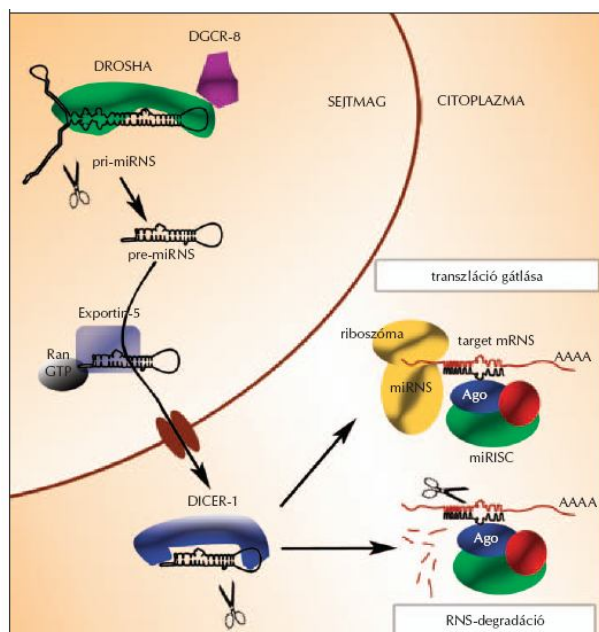
(www.mirbase.org). Szabályozó funkciójukból következően, egy miRNS molekula egyszerre több gén kifejeződésének a regulációjában is szerepet játszhat, jelenlegi ismereteink szerint a humán gének mintegy 30 %-a áll miRNS-ek szabályozása alatt. A miRNS-ek potenciális célmolekuláinak azonosítása elsősorban bioinformatikai módszerek segítségével történik. Bár még számos kérdés tisztázásra vár, az már most nyilvánvaló, hogy a miRNS-ek több alapvető sejtélettani folyamatban, mint például a sejtproliferáció, a differenciáció, a jelátvitel és az apoptózis szabályozás, meghatározó szerepet játszanak. Célmolekuláik sokszínű funkcióját figyelembe véve érthető, hogy a miRNS expressziós mintázat a differenciálódás, illetve különböző kórfolyamatok során megváltozhat (2). A miRNS-ek patogenetikai szerepét eddig számos betegség, többek közt neurodegeneratív kórképek és autoimmun betegségek esetében is igazolták. A legtöbb irodalmi adat azonban a miRNS-ek daganatképződésben betöltött szerepéről áll rendelkezésünkre. Máig számos tumortípus esetében írtak le jellemző expressziós mintázatot, amely bizonytalan diagnózis esetén jelentősen megkönnyítheti a daganat osztályozását, illetve a betegség kimenetelének előrejelzését. Ezenkívül szakirodalmi adatok igazolják azt is, hogy a miRNS-ek szabályozó szerepet töltenek be a különböző citotoxikus anyagokkal szembeni szenzitivitás/rezisztencia kialakításában (3).

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A mikro RNS-ek jellemzői, érési folyamatuk és a szabályozás mechanizmusa

A miRNS-eket kódoló gének lokalizációjuk szerint lehetnek intra- vagy intergénikusak. A miRNS-ek legnagyobb része annotált, fehérjét kódoló gének intronikus szakaszaira lokalizálódik, amelyek a transzkripció során kivágásra kerülnek a prekurzor mRNS-ből. Ezek az intragenikus miRNS gének a fehérjét kódoló exonokkal azonos DNS szálon helyezkednek el, önálló promóterrel nem rendelkeznek, így az annotált gén részeként kerülnek átírásra (4). A miRNS-ek kisebb része fehérjét nem kódoló, intergénikus régiókban található, így ezek független transzkripciót egységet alkotnak.

A miRNS-ek az élővilágban szinte mindenütt jelenlevő szabályozó molekulák, amelyek az evolúció során nagyfokú konzerváltságot mutatnak. Bioszintézisük főbb lépései az élővilágban univerzálisak (1.ábra).



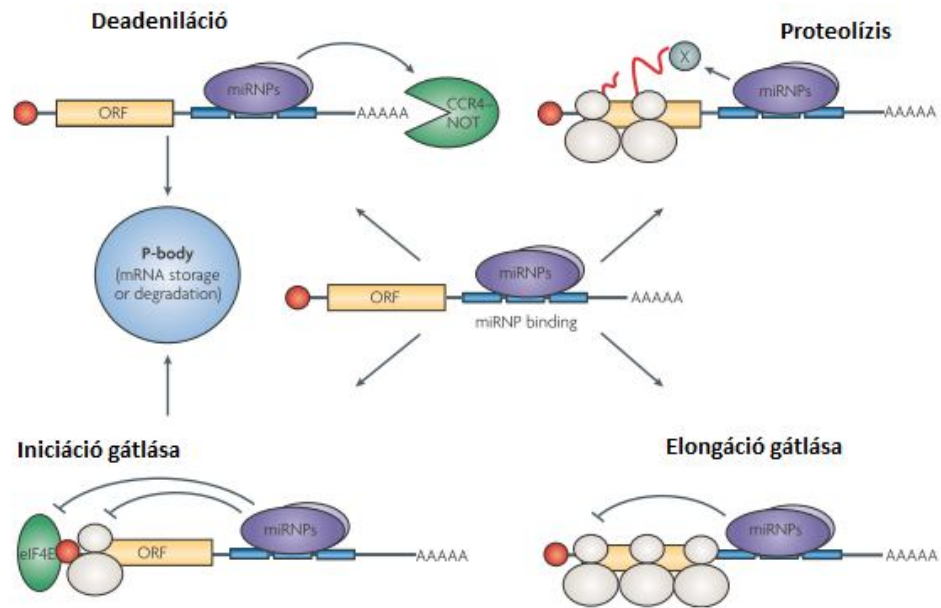
1.ábra. A miRNS molekulák érési folyamata

A miRNS molekulák szerkezeti jellegzetessége, hogy prekurzor alakjaik az mRNS-ektől eltérően kettős szálat alkotnak. A szintézis első lépése a sejtmagban zajlik. A miRNS molekulák prekurzorát (pri-miRNS) az RNS-polimeráz II. (POL II.) enzim szintetizálja önálló génről, vagy más gének intronikus régiójaként. A pri-miRNS egy megközelítőleg 1

kilobázis hosszúságú hajtókanyar szerkezetű molekula. Az átalakítás első lépése a stem loop (törzshurok) rész leválasztása. A hajtókanyar bázisánál elhelyezkedő körülbelül 10 bázispár hosszúságú hélix szerkezet nélkülözhetetlen ehhez a lépéshez. Ezt ismeri fel a Drosha enzimből (III-as típusú endoribonukleáz) és kofaktorából, a DGCR8-ből álló enzimkomplex, amely a pri-miRNS-t a bázisánál hasítja. Ez a hasítás egy körülbelül 70 nukleotid hosszúságú, hajtú szerkezetű köztes terméket eredményez, amit pre-miRNS-nek nevezünk. A következő lépés a pre-miRNS aktív transzporttal való kijuttatása a sejtmagból, amelyben az exportin-5 és kofaktora, a Ran GTP-kötő formája vesz részt. A citoplazmába kijutó pre-miRNS beépül egy ribonukleoprotein-komplexbe (miRNP vagy miRISC), amelynek szerveződése dinamikus folyamat. A beépülő pre-miRNS végső átalakítását egy másik ribonukleáz, a DICER és kofaktora, a TRBP (Tar RNA binding protein) végzi, a terminális hurok eltávolításával. Ebben a komplexben a duplex szál szétválik és a 3'-5' komplementer szál degradálódik. Az így képződő érett mikro-RNS-ek kötődése a cél-mRNS-ekhez a RISC-kel kapcsolatosan történik meg. A komplexbe épült miRNS szerkezeti információt hordoz, amely alapján a komplex specifikus mRNS-ek degradációját, vagy transzlációját szabályozza, jellemzően a 3' végi, nem transzlálódó részhez (3' UTR) kapcsolódva (5).

Bioinformatikai becslések alapján a fehérjét kódoló gének körülbelül egyharmada áll miRNS szabályozás alatt. Arról, hogy a miRNS molekulák hogyan ismerik fel a célmolekulákat még nem áll rendelkezésre pontos információ. A miRNS kötőhelyek magasabbrendű fajokban általában az mRNS molekulák 3'-, illetve ritkábban az 5'UTR régiójában találhatók. Ezeket a szekvenciákat ismerik fel és kötik meg specifikusan a miRISC-ben integrált miRNS-ek. A miRNS-eket kódoló gének a legkülönbözőbb fajok, így az ember genomjában is megtalálhatók, expressziójuk egy adott szervezeten belül szövetspecifikus (6, 7). Állatokban és emberben a poszttranszkripció gécscsökkentés négyféleképpen történhet (2.ábra). A lehetséges mechanizmusok a következők:

- 1) A miRNS kötődése a mRNS 3' UTR régióban a polyA farok deadenilációját, ezáltal szabad 3' véggel rendelkező mRNS kialakulását eredményezi.
- 2) A szabályozó miRNS a már transzlálódott protein lebomlását eredményezi.
- 3) A miRISC komplex a transzláció iniciációját gátolja a riboszomális 60S alegység kapcsolódásának akadályozásán keresztül.
- 4) A miRISC komplex a transzláció elongációját gátolja.



2.ábra A miRNS-eken keresztül megvalósuló poszttranszkripciós géncsendesítés lehetséges mechanizmusai. (Filipowicz és mtsai. ábrája alapján)

A miRNP komplex 3' UTR-hez való kötődése 4 különböző módon idézhet elő gátlást: deadeniláció, iniciáció gátlása, proteolízis, elongáció gátlása.

2.2 A miRNS-ek szerepe a daganatképződésben

A miRNS-ek tumorszupresszorok és protoonkogének poszttranszkripciós gátlásán keresztül szabályozzák a jelátvitel és a sejtciklus folyamatait. Ebből következik, hogy expressziójuk változása a sejtsztódás egyensúlyának felborulásához, fokozott sejtproliferációhoz és daganatképződéshez vezet. A miRNS-ek tumorigenezisben betöltött szerepére utal az is, hogy az ezeket kódoló gének több mint fele, olyan sérülékeny kromoszomális régiókban található, amelyek aberrációja gyakran megfigyelhető daganatokban. Az utóbbi években a tumorbiológiai kutatások egyre nagyobb hangsúlyt fektettek a különböző daganattípusok miRNS expresszió alapján történő osztályozására. A mRNS expressziós mintázat alapján történő vizsgálatokkal szemben a miRNS-ek előnye, hogy mivel egy miRNS molekula egyszerre több száz cél mRNS expresszióját szabályozhatja, így már jóval kisebb számú miRNS marker is elegendő jól elkülöníthető csoportok felállításához (8, 9).

A miRNS-ek patogenetikai szerepét elsőként B-sejtes krónikus lymphoid leukémia esetén igazolták. Ezt követően azonban számos daganattípusban írtak le szignifikánsan megváltozó miRNS expressziós mintázatot, többek közt pancreas (10), pajzsmirigy (11), tüdő (12), máj (13), gyomor (14), petefészek (15) és különböző idegrendszeri daganatok (glioblastoma multiforme, neuroblastoma) esetében is (16). Daganatokban az ép szövethez képest változást mutató expressziójú miRNS-ek a klasszikus onkogén-tumorsupresszor vonal alapján osztályozhatók. Azaz a tumorszövetben fokozott expressziót mutató miR-ek onkogén (onkomir), míg a represszáltak tumorsupresszor tulajdonságúak. Mivel az *in silico* becslések alapján a miRNS-ek egyszerre akár több száz protoonkogén és tumorsupresszor tulajdonságú célmolekulát is szabályozhatnak, így daganatképzésben betöltött szerepük tisztázásához elengedhetetlen célpontjaik és azok biológiai funkciójának azonosítása is.

Mindez arra utal, hogy a miR-ek expressziós mintázatának tanulmányozása különböző tumorok esetében több szempontból is nagy jelentőségű. Egyrészt közelebb vihet a daganatok patogenezisének pontosabb megértéséhez, másrészt segítségével olyan biomarkerek azonosíthatók, melyek alkalmazása nagymértékben megkönnyíti a tumorok felismerését és osztályozását. Ilyen biomarkereket alkalmaznak többek közt a follicularis pajzsmirigy-tumorok esetében is. Ezek kórszövettani elkülönítése rendkívül nagy gyakorlatot igényel, kétes esetekben azonban néhány miRNS marker (*miR-197*, *miR-221*, *miR-346*) expressziójának vizsgálata segítheti a diagnózist, illetve a későbbi terápia megválasztását (17). A *miR-221* expresszió-változása azonban nem csak tumoros szövetekben, hanem a környező, szövettanilag még ép területeken is megfigyelhető. Ez felveti annak lehetőségét, hogy a miR expresszió megváltozása a tumorképződés kezdeti jele, így segítségével a betegség már korai stádiumban is felismerhető. A miR expresszió vizsgálata a prognózis megállapításának szempontjából is jelentős lehet, mivel egyes daganatok esetében a tumor agresszivitása, az áttétképződés és a betegek túlélési ideje mind prediktálhatók a miRNS profil alapján (18). Végül, de nem utolsósorban a változást mutató miRNS-ek és az általuk szabályozott gének a jövőben a daganatterápia új célpontjait is jelenthetik.

2.3 Glioblasztóma sejtek molekuláris karakterizálása

A glioblastoma multiforme (GBM) a központi idegrendszert érintő daganatos megbetegedések közel 20%-át teszi ki. Napjainkban a leggyakoribb és legnehezebben kezelhető típusú primer agytumorként tartják számon. Malignus astrocytákból felépülő neuroepithelialis daganat, amely kiindulhat a halántéki (lobus temporalis) és a homloklebenyből (lobus frontalis) is, valamint képes áttérjedni az ellenoldali agyféltekébe is (19). A tumor rendkívül gyorsan képes növekedni, ezáltal képes nyomásfokozódást, valamint életveszélyt előidéző beékelődést is kiváltani. Elhelyezkedésétől függően esetenként ugyan sebészileg eltávolítható, ám a komplex műtéti-, sugár- és gyógyszeres kezelés ellenére is igen gyorsan, rendszerint hónapok alatt kiújul. Az agresszív kezelések ellenére is, a betegek átlagos túlélése valamennyi agytumor típus között ennél a legalacsonyabb, mindössze 14 hónap. A malignus agydaganatokra jellemző a diffúz infiltráció az agyszövetbe és az emelkedett rezisztencia a hagyományos daganatterápiákkal szemben (20). Az utóbbi években elért jelentős terápiás fejlődés ellenére a malignus gliomák korai diagnosztizálása és sikeres kezelése továbbra is nagy kihívást jelent.

Hasonlóan más daganatokhoz, a glioblasztómák esetében is alapvető fontosságú a tumorsejtek molekuláris karakterizálása, különös tekintettel a metasztázisképző hajlammal összefüggésbe hozható markerek azonosítására. Ennek ismeretében ugyanis nemcsak a prognózis megállapítása, hanem az optimális daganatellenes terápia megtervezése is lényegesen leegyszerűsödne. Az agytumorsejtek esetében a terápia legfontosabb molekuláris célpontjai a növekedési faktorok, illetve ezek receptorai. A hagyományos kemoterápiák mellett, az elmúlt évtizedben újabb típusú készítmények is megjelentek, amelyek ezeken a daganatképződésben, növekedésében és áttétképződésben is kulcsszerepet játszó célpontokon hatnak. A target gének mellett egyre nagyobb hangsúlyt kapnak a molekuláris biomarkerek is, amelyek nagymértékben megkönnyíthetik a tumorok osztályozását, ezáltal támpontot adhatnak az optimális terápia megválasztásához. Ilyen például az *egfr* (epidermal growth factor receptor), melynek overexpressziója esetén valószínűsíthető, hogy primer glioblasztómáról van szó, valamint a *tp53* (tumor protein 53) gén, amelynek mutációja megnöveli a tumor szekunder glioblasztómává alakulásának esélyét (21). Ezek az ismeretek a klinikai gyakorlatban is nélkülözhetetlenek, ugyanis a két változat gyógyszer- és sugár-érzékenysége nagyon eltérő lehet.

Az utóbbi években a gyógyszerkutatásban a már hagyományosnak mondható gén-célpontok mellett, az érdeklődés egyre inkább a gének természetes inhibitorai, a miRNS-ek felé fordult. A gliomákban számos kulcsfontosságú miRNS overexpresszált állapotban van, melyek így negatívan szabályoznak olyan sejtciklust befolyásoló géneket, amelyek nélkülözhetetlenek a sejtosztódás normális működéséhez. Ilyen magas szinten expresszálandó miRNS molekulák például az X kromoszómán lokalizálódó *miR-221* és a *miR-222*. Expressziójuk nagymértékű növekedését kimutatták már glioblasztóma, prosztatarák és pajzsmirigy karcinóma esetében is. Galardi és munkatársai (22) glioblasztóma sejtek miRNS expressziós változásait vizsgálva, azonosítottak két transzkripciósfaktort (NF- κ B, c-Jun), melyek együttes bekötődése megnöveli a *miR-221/222* expresszióját, ezáltal tumorok keletkezését indukálva. Visone és kutatócsoportja (23) pajzsmirigy tumorsejteken TaqMan QRT-PCR technikával vizsgáltak néhány, speciálisan tumorokban indukálódó miRNS expressziós mintázatát, valamint az ezek által szabályozott gének kifejeződését. Eredményeik alapján ugyancsak ez a két miRNS molekula tehető felelőssé a p57^{Kip} sejtciklus szabályozó gén expressziójának csökkenéséért is.

Egy 2011-ben megjelent tanulmányban két olyan molekulát vizsgáltak, amelyek hatásukat a kromatinállomány módosításán keresztül fejtik ki. Az már korábban is ismert volt, hogy az egészséges agyszövetben nagy mennyiségben előforduló *miR-153* alig detektálható szinten expresszálandó glioblasztóma sejtvonalakban. Mindez arra enged következtetni, hogy a *miR-153* olyan géneket regulál, amelyek az apoptózis szabályozásában játszanak szerepet, ezáltal tumor szupresszorként funkcionál. Ezt támasztja alá az a tény is, hogy azokban a glioblasztóma sejtvonalakban, ahol a *miR-153* expresszióját indukálták, azt tapasztalták, hogy két antiapoptotikus hatású célgén (*bcl2*, *mcl1*) expressziója lecsökken, ami apoptózishoz vezet. Xu J. és munkatársai (24) a kromatin-módosító molekulákkal történő kezelést követően, a *miR-153* hasonlóan nagyfokú overexpresszióját tapasztalták. Mindkét anyag esetében igazolták, hogy a kezelés hatására szignifikánsan csökkent a tumorsejtek túlélése. Ennek oka lehet a *miR-153* szintjének ugrásszerű növekedése, ami több apoptózisban kulcsszerepet játszó gén expressziójának csökkenését eredményezte. Ilyen expresszió-változást tapasztaltak többek közt az antiapoptotikus hatású *irs2*, a *bcl2* és az *mcl1* esetében is.

A fentiekhez hasonlóan a *miR-124a* expressziója is jelentősen lecsökkenhet tumorsejtek esetében. Ez egy elsősorban agyszövetben expresszáldó miRNS, amely számos sejtproliferációban, sejtciklus szabályozásban és apoptózisban szerepet játszó gén szabályozásáért felel. Fowler és kutatócsoportja kimutatta (25), hogy azoknál a glioblasztómában szenvedő pácienseknél, akiknél a *miR-124a* expressziója szignifikáns csökkenést mutat, lényegesen alacsonyabb az átlag túlélési idő, ami arra enged következtetni, hogy a *miR-124a* a tumor növekedésének inhibitoraként funkcionál. Ezt követően, *in vitro* glioblasztóma sejtvonalakban is megvizsgálták a *miR-124a* expresszió tumorsejtekre gyakorolt hatását. Mind a glioblasztóma sejtekben detektált *miR-124a* szint drasztikus csökkenése, mind az ezzel korreláló génexpressziós változások arra utalnak, hogy ezen molekula konstitutív expressziója elengedhetetlen a sejtproliferáció és migráció normál működéséhez.

Az agytumorkban bizonyítottan alacsony szinten expresszáldó mikro RNS molekulák közé tartozik a *miR-101* is, amely elsősorban apoptózisban és sejtciklus szabályozásban szerepet játszó gének működését szabályozza (26). Több kísérletsorozat is igazolta, hogy a *miR-101* szabályozása alatt álló *ezh2* gén terméke markerként használható a betegség kimenetelének és agresszivitásának prediktálására. *In vitro* eredmények alapján az *ezh2* gén valamennyi vizsgált glioblasztóma sejtvonalban rendkívül magas szinten expresszáldik, ami korrelál a *miR-101* szint csökkenésével. Ezen eredmények alapján szolgálhatnak egy potenciális terápiának, amely az EZH2 protein gátlásán keresztül akadályozza a tumorsejtek proliferációját és az angiogenezist.

A miRNS mintázat mellett, génexpressziós markerek alapján is megjósolható, mind a betegség kimenetele, mind a különböző kemoterápiás szerekre adott válasz. Ilyen markergén például a *pten*, amely a különböző tumoros szövetekben nagyon gyakran deletált formában van jelen (27). Több száz páciens bevonásával végzett klinikai vizsgálatok igazolták, hogy azokban az esetekben, ahol a *pten* gén deletált, az átlagos túlélési idő lényegesen lerövidül. A daganat kemoszenzitivitása ugyancsak prediktálható molekuláris markerek alapján (28). Az *mgmt* gén egy olyan DNS hibajavító enzimet kódol, amely többek közt a kemoterápiás szerek által okozott léziók megszüntetését segíti elő. Ennek köszönhető, hogy azok a sejtek, ahol az MGMT (metil-guanin metil-transzferáz) protein nagy mennyiségben termelődik, sokkal kevésbé szenzitívek a kemoterápiás kezelésre.

Mindez arra enged következtetni, hogy amennyiben géncsendesítés révén csökkenthető az *mgmt* aktivitása, úgy a sejtek citosztatikumokkal szembeni szenzitivitása is növelhető. A klinikumban az egyik leggyakrabban használt glioblasztóma ellenes szer a temozolomid. Ez egy alkiláló ágens, amely hatását a tumorsejtek DNS-ének metilációján keresztül fejti ki, ami a sejtek apoptózisához vezet. Megfigyelték, hogy azokban az esetekben, ahol a tumorsejtekben nagy mennyiségben termelődik MGMT, a daganat teljesen rezisztens a temozolomid kezelésre (29).

A fenti eredmények alapján az *mgmt*, a *pten* és a hozzájuk hasonló markerek együttes analízise alapján prediktálható, mind a különböző daganatterápiákra adott válasz, mind a betegség kimenetele.

2.4 Többszörösen telítetlen zsírsavak alkalmazása a tumorterápiában

A többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA) több élettani funkciót töltenek be az emlős szervezetben. Jelentős hatást gyakorolnak a génexpresszióra, szabályozva a négy transzkripciós faktor családot, továbbá fontos szerepet játszanak gyulladáscsökkentő és antiproliferatív metabolitok generációjában, ezzel modulálva az immunválaszt.

A többszörösen telítetlen zsírsavak közül a legjelentősebbek az eikozapentaén-sav (EPA), a dokozahexaén-sav (DHA) és a gammalinolénsav (GLA), melyek élettani hatása többirányú. Közvetlenül hatnak a zsírsanyagcserére, részt vesznek a sejtmembránok felépítésében, hormonszerű hatást fejtenek ki, kardioprotektív hatásúak, közvetlenül hatnak az agyi génaktivitásra, valamint szerepük van az idegrendszer fejlődésében (30, 31). Bár a többszörösen telítetlen zsírsavakat évek óta alkalmazzák kiegészítő terápiaként különböző gyulladásos, valamint daganatos betegségek esetén, ennek ellenére még mindig nem teljesen ismertek azok a molekuláris mechanizmusok, melyek a pozitív hatás kiváltásában szerepet játszanak.

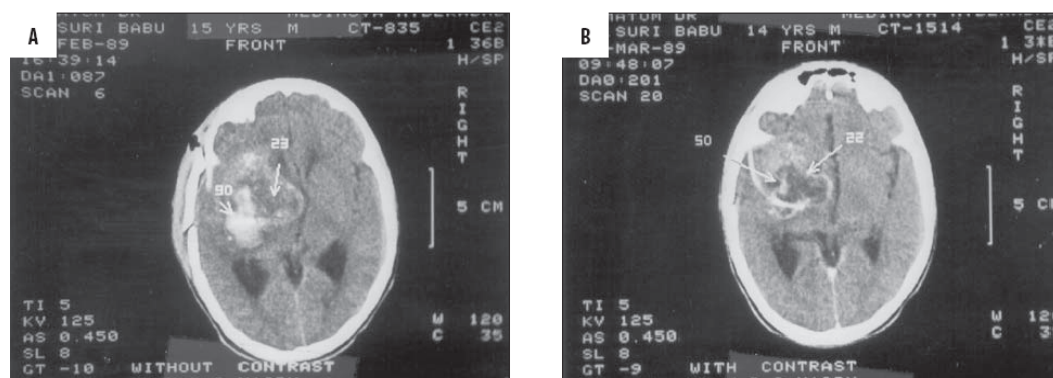
A gyulladásos és daganatos betegségek mellett kardiovaszkuláris betegségekben is kísérleteznek többszörösen telítetlen zsírsavak adagolásával. Egy, az USA-ban végzett, több mint 10 ezer szívinfarktuson átesett páciens bevonásával végzett klinikai vizsgálat során, a betegek napi 900 mg PUFA tartalmú kapszulát kaptak. A vizsgálok 3 és fél évvel később azt állapították meg, hogy az n-3 PUFA fogyasztása szignifikánsan csökkentette a halálozást, különös tekintettel a hirtelen szívhalálra. Ezen eredményeket összevetve korábbi

szívbetegségeken végzett vizsgálatokkal alapján feltételezhető, hogy az n-3 PUFA antiaritmiás hatású (32, 33).

A daganatterápiában a többszörösen telítetlen zsírsavakat azonban nem csak étrend kiegészítőként, hanem citosztatikumként is sikerrel alkalmazták már (34). A kiindulási ötlet azon a megfigyelésen alapult, hogy azoknál a népcsoportoknál (pl. japánok, eszkimók), ahol rendszeresen fogyasztanak tengeri halat, lényegesen alacsonyabb a rákos megbetegedések száma. Ezt a halakban nagy mennyiségben előforduló zsírsavaknak (DHA, EPA) tulajdonították. A normál sejtekkel ellentétben a daganatsejtek csak kis mennyiségben tartalmaznak lipid peroxidáz enzimeket és rezisztensek a lipid peroxidációs folyamatokra. Ez a tumorsejtek alacsony PUFA tartalmának tulajdonítható, ami abból következik, hogy ezekben a sejtekben rendkívül alacsony az $\Delta 6$ és $\Delta 5$ deszaturáz enzim aktivitása, ami pedig esszenciális a prekursor zsírsav molekulák többszörösen telítetlen zsírsavakká történő alakításához. Mindez felveti annak lehetőségét, hogy a többszörösen telítetlen zsírsavak fokozott bevitele megnöveli a lipidperoxidáz enzimek aktivitását, amelyek bizonyítottan apoptózis indukálására képesek.

Begin és munkatársai, *in vitro* vizsgálták a többszörösen telítetlen zsírsavak tumorsejtekre gyakorolt hatását (35). Azt tapasztalták, hogy míg a DHA semmilyen hatást nem váltott ki, addig az AA, EPA és a GLA egyformán toxikusnak bizonyultak glioblasztóma és adenokarcinóma sejtvonalak esetében is. További pozitívum, hogy bár tumorsejteken az AA és a GLA ugyanolyan mértékű apoptózist indukált, az utóbbi a normál sejtekre egyáltalán nem volt toxikus. A GLA szelektív tumorelles hatását támaszja alá az is, hogy ha ZR-75-1 emlőtumorból származó sejteket kevert kultúrában tenyésztettek humán fibroblaszt sejtekkel, akkor a daganatsejtek minden esetben túlnőttek az egészségeseken, és egy idő után teljesen kiszorították őket. Ha azonban a tenyészetet GLA-val kezelték, akkor az a tumorsejtek proliferációját meggátolva, illetve apoptózist indukálva, tiszta fibroblaszt tenyészetet eredményezett (36). Ezt követően Vartak és kutatócsoportja *in vivo* kísérletekkel is igazolták a GLA tumorelles hatását. Vizsgálataikat asztrocitómás patkányokon végezték és azt tapasztalták, hogy míg a GLA kezelés hatására a rosszindulatú asztrocita sejtek túlélése csökkent, addig az egészséges sejtek membránjába beépülő zsírsavak megnövelték azok oxidatív potenciálját (37, 38).

A többszörösen telítetlen zsírsavak tumorelles hatását agytumorban szenvedő pácienseken végzett fázis I-II. klinikai vizsgálatok is bizonyítják (39). Mivel etikai okokból placebo kontroll csoport vizsgálatára nem volt lehetőség, így a szer hatásosságát a tumor méretének csökkenése, illetve a páciensek átlagos túlélési ideje alapján mérték. A páciensek többségénél a kísérleti kezelést megelőzően már alkalmaztak kemoterápiás illetve sugárkezelést, ám ezek nem bizonyultak hatásosnak. A 3.A ábrán egy glioblasztómában szenvedő páciens computer tomográf felvétele látható, melyen a nyilakkal jelölt területen helyezkedik el a tumor. A felvételt követően a páciens egy 10 napos intrakraniális GLA injekció kúrát kapott (1mg/nap). Az utolsó kezelés után 28 nappal megismételték a CT felvételt, amit a 3.B ábra mutat be. Amint az a nyilakkal jelölt területen látható, a kezelés hatására a tumor mérete nagymértékben lecsökkent, ugyanakkor a páciensek sem a kezelés során, sem a későbbiekben nem tapasztaltak mellékhatásokat.



3.ábra. Glioblasztómás páciens computer tomográf felvételei GLA kezelés előtt és után

Bár a többszörösen telítetlen zsírsavak tumorokkal szembeni jótékony hatása immár bizonyított, a pontos hatásmechanizmusról még mindig nagyon keveset tudni és további klinikai vizsgálatok szükségesek a terápiában való hatásosságuk igazolására is. A DHA és EPA kezelés hatására bekövetkező molekuláris változásokat tanulmányozta Habermann és kutatócsoportja adenocarcinoma sejtekben (39). Microarray analízissel több, mint 100 olyan gént azonosítottak, amelyek expressziója szignifikánsan változott PUFA kezelés hatására. Ezek között megtalálható számos sejtciklus szabályozó, szignáltranszdukcióban és az apoptózisban szerepet játszó gén is. Mindkét kezelés esetében rendkívül erőteljes csökkenést észleltek a *cox-2* (*ptgs2*) gén expressziójában. A ciklooxygenáz, másnéven prosztaglandin, endoperoxid szintáz enzimrendszer a prosztaglandin bioszintézis két

kulcsenzimét kódolja: a konstitutívan termelődő *ptgs1*-et és az indukálható *ptgs2*-t. A *ptgs2* olyan arachidonsav metabolitok termelését indítja el, amelyek elsősorban a gyulladásos folyamatok kialakulásában játszanak szerepet. Az utóbbi években számos olyan gyógyszermolekula került kifejlesztésre, melyek a *ptgs2* gátlásán keresztül különböző gyulladásos megbetegedések kezelésére alkalmasak (40).

Vecchini és munkatársai hepatóma sejteken vizsgálták a többszörösen telítetlen zsírsavak génexpresszióra gyakorolt hatását (41). A tumorsejteket Wistar patkányok bőre alá ültették be, majd az állatokat magas PUFA tartalmú étrenden tartották. A diéta megkezdését követő 20. napon az állatokat terminálták és a beültetett tumorsejteket visszaizolálták. Azt tapasztalták, hogy a többszörösen telítetlen zsírsavakkal etetett állatoknál lényegesen magasabb volt az apoptotikus tumorsejtek száma, mint a normál étrenden tartott társaiknál. Az ezt követő génexpressziós vizsgálatok során számos szignáltranszdukcióban részt vevő gén mellett szignifikáns változást tapasztaltak a zsírsav szintáz (*fas*), az acetyl-CoA carboxiláz (*acaca*) és a *ptgs2* esetében is. A ciklooxygenáz repressziója a kezelt állatok esetében a sejtek csökkent arachidonsav szintjével magyarázható, amely a *ptgs2* csökkent termelődéséhez és apoptózishoz vezetett.

A többszörösen telítetlen zsírsavak hatását leg többet adenokarcinóma sejtvonalakon vizsgálták (42, 43). Ezeknek a kísérleteknek köszönhetően mára sikerült több száz olyan gént azonosítani, melyek bizonyítottan szerepet játszanak azokban a molekuláris folyamatokban, amelyek a tumor növekedésének gátlásáért, illetve a tumorsejtek apoptózisaért felelősek. Az eddigi eredmények alapján ezek közül is kiemelkedő jelentősége lehet a *ppara*, *bcl2*, *her2*, *sele*, *hnf4* és a *ptgs2* géneknek.

Bár számos klinikai vizsgálat igazolta, hogy a PUFA-k jótékony hatást fejtenek ki kardiovaszkuláris, gyulladásos, illetve daganatos megbetegedések esetén is, ennek ellenére a mai napig nem teljesen ismertek azok a molekuláris folyamatok, illetve gének, amelyekre a többszörösen telítetlen zsírsavak hatást gyakorolnak.

2.5 Interneuronok molekuláris karakterizálása

Az idegtudományi kutatások egyik legnagyobb kihívása az idegsejtek molekuláris alapokon történő azonosítása. Még a legegyszerűbb agyi folyamatokat is komplex hálózatokba rendeződő, ám morfológiailag és funkcionálisan rendkívül diverz neuronok

összehangolt működése irányítja. Az agykéreg idegsejtjeinek több mint 20%-át gátló idegsejtek, ún. interneuronok alkotják, melyek gátló hatásukat a posztzinaptikus interneuronon vagy piramissejteken gamma-amino vajsav ligand aktiválta ioncsatornákon keresztül fejtik ki (44). Az interneuronoknak számos altípusa létezik, amelyek morfológiájuk, fiziológiai, molekuláris és szinaptikus jellemzőik alapján különülnek el.

2.5.1 A neuronok csoportosításának nehézségei

Az interneuronok közös jellemzője, hogy míg elektrofiziológiai paramétereik jól definiáltak, addig molekuláris jellemzőikről a mai napig rendkívül kevés információ áll rendelkezésre. A legnagyobb probléma az idegsejtek csoportosítása során, hogy nincs általánosan elfogadott nézet arra vonatkozóan, hogy melyek azok a paraméterek, amelyek a legpontosabban meghatároznak egy neuront. Jelenleg a központi idegrendszert alkotó (CNS) sejtek elkülönítése elsősorban morfológiájuk, elektrofiziológiai jellemzőik, illetve neurotranszmittereik alapján történik (45). Ilyen megközelítés alapján kerültek csoportosításra az agykéreg GABAerg interneuronjai is, melyek – bár mind gamma-amino-vajsavat termelnek – morfológiailag és funkcionálisan egy rendkívül diverz csoportot alkotnak (46). Ehhez hasonló eredményt adott az elektrofiziológiai paraméterek, illetve a sejtmorfológia alapján történő csoportosítás is. Mindezek alapján szükségessé vált egy olyan komplex, elsősorban molekuláris alapú rendszer kidolgozása, amely a fenti jellemzők mellett nagy hangsúlyt fektet az egyes neuronok génexpressziós mintázatára is, különös tekintettel a működésük alapjául szolgáló ioncsatorna génekre. Az utóbbi néhány évben egyre több kutatócsoport próbálkozott az idegsejtek ilyen jellegű osztályozásával, illetve a már kialakított csoportok molekuláris alapokon történő igazolásával. Sugino és munkatársai egerek előagyából izoláltak 20 különböző idegsejt populációt és ezek génexpressziós mintázatát összehasonlítva alkottak funkcionális csoportokat (47). Subkhankulova és kutatócsoportja pedig az agykéreg II. és III. rétegéből izolált, tüzelési mintázatuk alapján különböző idegsejtek mRNS expresszióin alapuló csoportosításával bizonyította a molekuláris klaszterezés előnyeit (48). Mindkét kísérletsorozat eredményei szoros kapcsolatot mutattak a különböző neuronok fiziológiai és molekuláris paraméterei között. Ez arra utal, hogy az idegsejteken végzett génexpressziós vizsgálatok tökéletesen alkalmasak a neuronok diverzitásának tanulmányozására, illetve funkciójuk tisztázására.

A neuropeptid Y (*npv*) az egyik első molekuláris marker volt, amelyet idegsejtek osztályozására használtak (49). A 36 aminosav hosszúságú peptid, – amely elsősorban a cerebrális cortex II. és III. rétegében fordul elő – olyan agyi folyamatokban játszik kulcsszerepet, mint a szinaptikus transzmisszió, vagy az agyi vérellátás szabályozása. Karagiannis és mtsai. ezt a molekulát használták a cortexben elhelyezkedő, rendkívül diverz csoportot alkotó neuronok vizsgálatára, ezzel az elsők között alkalmazva molekuláris módszereket (QRT-PCR) az idegsejtek osztályozása során (50).

A molekuláris karakterizálás legnagyobb problémája, hogy az expressziós vizsgálatok relatíve nagy mennyiségű mintát igényelnek, ami ritka idegsejtek esetén általában nem hozzáférhető. Ez olyan technikák kifejlesztését teszi szükségessé, amelyek már egyetlen sejt esetében is alkalmasak, akár a teljes genomot érintő vizsgálatokra is.

2.5.2 A piramissejtek

A piramissejtek az agyban a legnagyobb számban megtalálható neuronok, amelyek az agykéreg sejtjeinek 70%-át alkotják, valamint megtalálhatóak a hippocampusban és az amygdalában. Nevüket jellegzetes háromszög alakú sejttestjükről kapták (51). A piramissejteket az emlős prefrontális kéreg legfontosabb serkentő neuronjaiként tartják számon, mivel glutamát felszabadításával képesek serkenteni a posztzinaptikus sejtjeiket. A kéri neuronhálózatok legnagyobb sejtcsoportjaként olyan kulcsfolyamatok szabályozását végzik, mint a tanulási folyamatok, valamint az idegi plaszticitás. Az idegrendszer többi sejtcsoportjához hasonlóan a piramissejtek osztályozására is elsősorban elektrofiziológiai jellemzőik szolgálnak alapul. Mivel a piramissejtek egy rendkívül jól azonosítható és izolálható csoportot alkotnak, valamint rendkívül gyakoriak, ezáltal különösen alkalmasak az idegsejtek molekuláris karakterizálása során kontroll csoportnak.

2.5.3 A neurogliaform sejtek

A gátló interneuronok egy kiemelkedő jelentőségű csoportját alkotják az úgynevezett neurogliaform sejtek. Ezeket az apró szómával és nagyszámú vékony dendrittel rendelkező neuronokat Ramon Y. Cajal írta le elsőként a 19. század végén. A többi interneuronnal ellentétben a neurogliaform sejtek nem csak egymással képesek elektromos szinapszisok kialakítására, hanem az agykéregben található minden GABAerg neuronnal

kapcsolatban állnak, ezáltal központi szabályozó szerepet töltenek be. A neurogliaform sejtek szerepét elsőként Dr. Tamás Gábor és kutatócsoportja írta le (52). Kimutatták, hogy a neurogliaform sejtekben keltett egyetlen akciós potenciál elég ahhoz, hogy posztszinaptikus piramissejtekben összetett GABA_A és GABA_B receptor mediált válaszokat generáljon. Ezáltal a neurogliaform sejtek az agykérgi hálózatok első és mindezidáig egyetlen olyan ismert sejtcsoportja, amelyek a gyors (ionotróp) gátlás mellett, lassú (metabotróp) gátlásra is képesek.

Néhány klinikailag is releváns kórképben a gyors és a lassú gátlás aránya nagymértékben eltolódik. Ilyen például a depresszió, amelyben a lassú gátlás dominanciája mutatható ki (53). Az epilepszia egyes formáinál is megfigyeltek súlyponteltolódást a gyors és a lassú gátlás között. Mivel eddigi eredmények alapján a neurogliaform sejt az egyetlen olyan interneuron típus, amely lassú gátlás kiváltására is képes, ezért fontos lenne ezek molekuláris karakterizálása, a működésükben kulcsszerepet játszó gének azonosítása. Ez alapot adhatna olyan hatóanyagok fejlesztéséhez, amelyek szelektíven ezeken a sejten hatnak, ezáltal szabályozhatóak lennének a gyors és a lassú gátlás arányait meghatározó folyamatok.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásaink során célunk olyan miRNS-ek vizsgálata volt, amelyek változó expressziót mutatnak tumorsejtekben, szabályozó szerepet töltenek be a különböző citotoxikus anyagokkal szembeni szenzitivitás/rezisztencia kialakításában, valamint néhány speciális funkciót betöltő idegsejt működésében. A kísérleteket a vizsgált minták típusa illetve az alkalmazott kezelések alapján négy csoportra osztottuk.

3.1 Fibrózus szövetekre is alkalmazható miRNS izoláló protokoll fejlesztése

A miRNS expresszió vizsgálatához elengedhetetlen a vizsgált minta tisztasága. A legtöbb kutatócsoport a mai napig teljes RNS-t használ a miRNS-ek vizsgálata során. Általában ennek előállítására a már hagyományosnak mondható szerves oldószerekkel történő extrahálással és alkoholos kicsapással történő izolálási módszert választják. Ennek egyik hátránya, hogy az izolálás során a vizsgálni kívánt rövid RNS szekvenciák jelentős része elveszik. Az így izolált totál RNS csak nagyon kis százalékban tartalmaz 30 nukleotidnál rövidebb szekvenciákat, ennek köszönhetően pedig jelentősen csökken a módszer érzékenysége. A probléma megoldására egyre több cég fejlesztett ki olyan speciális nukleinsav tisztító kiteket, amelyek a hagyományos szerves oldószerekkel történő extrahálást kombinálják a szilika-membrán alapú oszlopos technikával, ezáltal kifejezetten a kis méretű RNS molekulák megkötésére alkalmasak. Bár ezek a kitek a legtöbb szövettípus esetében kitűnően működnek, egyik sem alkalmas olyan fibrózus szövetekből történő miRNS izolálásra, mint például a szív vagy a tüdőszövet.

Célunk elsődlegesen egy olyan miRNS izoláló módszer kidolgozása volt, amely a lehető leggyorsabban, megbízható minőségű és viszonylag nagy mennyiségű mintát képes biztosítani az expressziós vizsgálatokhoz. A módszer optimalizálását követően, a rendszer beállítását a későbbi miRNS profil változásokon alapuló kísérleteinkhez használtuk.

3.2 Többszörösen telítetlen zsírsavakkal kezelt glioblasztóma sejtek miRNS és génexpressziós vizsgálata

Annak ellenére, hogy mind *in vitro* kísérletekben, mind klinikai vizsgálatokban sikeresen alkalmaztak többszörösen telítetlen zsírsavakat glioblasztóma kezelésére, még

mindig nagyon kevés információ áll rendelkezésre ezen anyagok miRNS és mRNS expresszióra gyakorolt hatásairól. Számos miRNS gén olyan kromoszomális régióban helyezkedik el, melyeknél tumorokban gyakori a genetikai aberráció, így kísérleteink során elsősorban ezek azonosítására fektettük a hangsúlyt.

Célkitűzéseink:

- azon miRNS-ek azonosítása melyek expressziója PUFA kezelés hatására eltérést mutat a kontrolltól.
- olyan elsősorban apoptotikus gének vizsgálata melyek miRNS-ek általi szabályozását még nem vizsgálták.
- a szignifikáns változást mutató miRNS-ek expressziós mintázatának összevetése a pozitív kontrollként használt temozolomid hatására bekövetkező változásokkal.
- azon sejtélettani változások és biokémiai útvonalak azonosítása, amelyek összefüggésben állnak a PUFA kezeléssel és a későbbiekben potenciális támadáspontok lehetnek glioblasztóma sejtekben.
- a zsírsavak és a temozolomid kezelés hatására eltérő vagy azonos változást mutató biomarkerek azonosítása, amelyek akár a gyógyászat területén is alkalmazást nyerhetnek.

3.3 Többszörösen telítetlen zsírsavakkal etetett patkányokból izolált szív és májszövet miRNS és génexpressziós vizsgálata

Számos klinikai vizsgálat igazolta, hogy a PUFA-k jótékony hatást fejtenek ki kardiovaszkuláris, gyulladásos, illetve daganatos megbetegedések esetén is. Ennek ellenére a mai napig nem teljesen ismertek azok a molekuláris folyamatok, illetve gének, amelyekre a többszörösen telítetlen zsírsavak hatást gyakorolnak.

Célkitűzéseink:

- olyan miRNS-ek és mRNS-ek azonosítása melyeket eddig zsírsavakkal kapcsolatban még nem vizsgáltak.
- amennyiben sikerül zsírsav metabolizmusban eddig még nem azonosított gént találni, annak milyen folyamatokban van szerepe.

- azon sejtélettani változások és biokémiai útvonalak azonosítása, amelyek a PUFA kezeléssel összefüggésbe hozhatók.

3.4 Idegsejtek karakterizálása miRNS és mRNS mintázat alapján

A gátló interneuronok egy kiemelkedő jelentőségű csoportjuk alkotják az úgynevezett neurogliaform sejtek, melyek az agykéregben található minden GABAerg neuronnal kapcsolatban állnak, ezáltal központi szabályozó szerepet töltenek be. A neurogliaform sejtek az agykérgi hálózatok első és mindezidáig egyetlen olyan ismert sejtcsoportja, amelyek gyors és lassú gátlásra is képesek. Bár nyilvánvaló, hogy ezek a sejtek központi szabályozó szerepük révén, számos klinikailag is releváns folyamat megértését segíthetik, működésükről és molekuláris jellemzőikről a mai napig rendkívül kevés információ áll rendelkezésre.

Célkitűzéseink:

- olyan módszerek optimalizálása és validálása piramissejteken, amelyek alkalmasak egyetlen sejt molekuláris vizsgálatára.
- a már hagyományosnak tekinthető expressziós vizsgálatok mellett egy forradalmian új technika, a digitális PCR alkalmazása egyetlen sejten.
- az agykérgi hálózatok gátlásában kiemelkedő szerepet játszó neurogliaform sejtek molekuláris karakterizálása.
- minél több olyan molekuláris marker azonosítása, amelyek segítik a neurogliaform sejtek többi interneurontól való elkülönítését, illetve amelyek kulcsfontosságúak lehetnek ezen speciális sejttypus működése során.
- olyan miRNS és mRNS molekulák azonosítása, amelyek eltérő expressziót mutatnak piramis és neurogliaform sejtekben.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Sejtek tenyésztése és kezelése

Vizsgálatainkhoz három humán glioblasztóma sejtvonalat használtunk (U373, GBM2, GBM5). Ezeket 37 °C-on, 5% CO₂ és 100% relatív páratartalom mellett penicillinnel, streptomycinnel és 10% FCS-sel kiegészített DMEM és RPMI tápoldatban tenyésztettük. A tumorsejteket 24 órán keresztül kezeltük többszörösen telítetlen zsírsavak különböző koncentrációival (AA: 50 és 75 µM, DHA: 50 és 75 µM, GLA: 75 és 150 µM). Pozitív kontrollként temozolomidot használtunk (50 és 100 µM), ami klinikai gyakorlatban a legszélesebb körben használt citosztatikum glioblasztóma kezelésére. A kezelt sejtek túlélését holografikus mikroszkóp segítségével követtük nyomon.

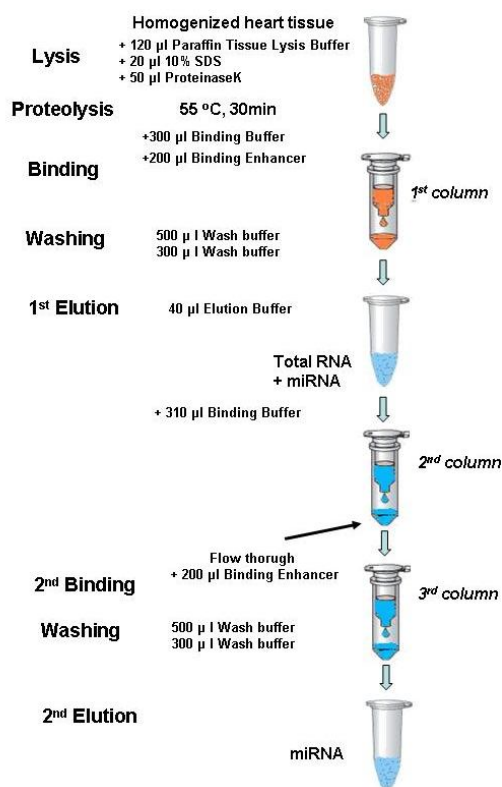
4.2 Holografikus mikroszkóp

A tumorsejtek túlélését a HoloMonitor™ M3 holografikus mikroszkóp (Phase Holographic Imaging AB, Lund, Svédország) segítségével vizsgáltuk (54). A HoloMonitor ötvözi a hagyományos fáziskontraszt mikroszópikus technikát a flow citometria előnyeivel. A készülék képes elkülöníteni a sejteket alakjuk és méretük szerint, illetve meghatározható vele az élő és halott sejtek aránya. Alkalmazása során valós-idejű információkat nyerhetünk a sejtek számáról, proliferációs és életképességéről, illetve morfológiai tulajdonságaikról, mint például alak, méret, denzitás. A 24 órás kezeléseket követően a sejttenyészeteket 10X és 40X nagyítással vizsgáltuk holografikus és fáziskontraszt technikával is.

4.3 miRNS izoláló protokoll fejlesztése szívszövetre

Az általunk optimalizált módszer alapja a miRNS izolálásra széles körben használt High Pure miRNA Isolation Kit (Roche). A standard protokoll hátránya, hogy fibrózus szövetek esetében egyáltalán nem alkalmazható, így ebbe újabb lépéseket beiktatva tettük szív és tüdőszövet vizsgálatára alkalmassá (4.ábra). Első lépésben a folyékony nitrogénben porított mintát egy speciális oldatban inkubáljuk 30-60 percen keresztül 55 °C-on. Az oldat 50 µl Proteináz K-t, 20 µl 10%-os SDS-t, valamint 120 µl lízispuffert (Roche), amelyet elsősorban paraffinba ágyazott minták feltárására fejlesztettek ki. Az inkubációt követően 325 µl Binding Buffer (Roche) és 320 µl Binding Enhancer (Roche) hozzáadása után a

mintát oszlopra visszük és egy 2 lépéses mosást (500 és 300 µl Washing Buffer) követően az oszlopra kikötődött RNS molekulákat eluáljuk.



4.ábra. Fibrózus szövetekből történő miRNS tisztítás sematikus ábrázolása

Ezen a ponton az eluátum egyaránt tartalmazza a rövidebb és hosszabb nukleinsav molekulákat is. A következő lépésben 310 µl Binding Buffer-t mérünk az elegyhez, majd azt egy újabb szilika oszlopra kötjük. A centrifugálás után az oszlop tartalmazza a nagyobb (elsősorban mRNS, rRNS) molekulákat, amelyek ezután innen egy mosási lépést követően könnyedén izolálhatóak. Az oszlopon átfolyó mintához, amely a fel nem kötődő kisméretű RNS molekulákat (miRNS-ek és degraded szekvenciák) tartalmazza, további 200 µl Binding Enhancer-t adunk, majd az elegyet egy új oszlopra visszük. A korábbiakhoz hasonlóan ezt az oszlopot is két lépésben mossuk, majd 40 µl Elution Buffer hozzáadásával eluáljuk. A módszer lényege tehát, hogy a tisztítási lépés mintaként 3 RNS izoláló oszloppal, a felkötőpuffer összetételét oszloponként változtatva történik, ami biztosítja a kisméretű RNS molekulák tökéletes elválasztását (55). Mivel az eljárás során egy külön

frakcióban a nagyméretű RNS molekulák is felkötődnek, így a módszer alkalmazása elegendő mintát biztosított mind a miRNS, mind a mRNS expressziós mérésekhez.

4.4. Az RNS minőségi ellenőrzése

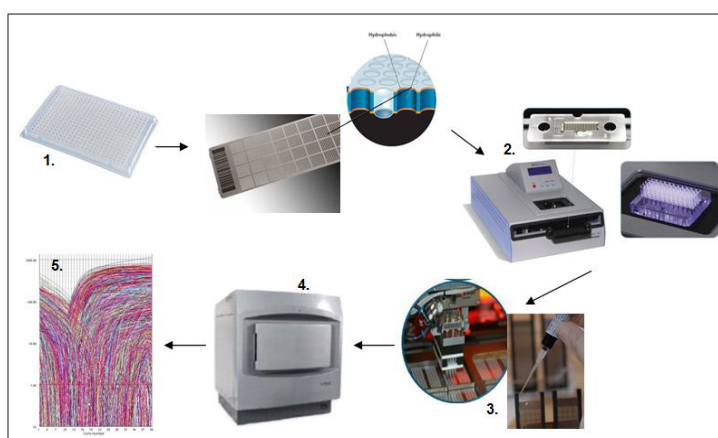
Az izolált miRNS és mRNS mennyiségét NanoDrop ND-1000 spektrofotométer, minőségét Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Tech. Inc., Santa Clara, USA) készülék segítségével határoztuk meg. A mikrochip futtatásokhoz Agilent RNA Nano 6000 chipet használtunk, a wellékbe 1-1 µl RNS-t mérve. A minták zárt chip kazettában automatikusan festődnek, innen egymás után a mérőkapillárisba jutnak, ahol a minta komponensei a kombinált elektrokinetikus-elektroforetikus elválasztás során, méretüknek megfelelő sorrendben áthaladnak a lézendetektor előtt. A kapott jelek digitálisan kerülnek rögzítésre és real-time elektroferogram, gélkép és adattáblázat formájában jelennek meg.

4.5 miRNS expresszió vizsgálata microarray technikával

A microarray vizsgálatokat Agilent rendszeren végeztük, amihez mintánként 50 ng miRNS-t jelöltünk meg Agilent's miRNA Complete Labeling and Hyb kit System (Agilent Technologies Palo Alto, CA, USA, p/n 5190-0456) felhasználásával. Első lépésben 25-25 ng, párhuzamos kezelésekből származó miRNS kevertünk össze, majd ezt 2 µl-re hígítottuk. A defoszforilációs lépéshez a mintákat 2 µl CIP reagens (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) hozzáadásával 30 percen keresztül 37 °C-on inkubáltuk, majd 2,8 µl DMSO-t hozzámérve 100 °C-on denaturáljuk. Ezt követően történt az RNS minták jelölése T4 RNS ligáz és Cyanine3-pCp felhasználásával 16 °C-on 2 órán keresztül. A fluoreszcensen megjelölt mintákat vákuumos bepárlás után 18 µl vízben oldottuk fel. Ezt követően blokkoló reagens és hibridizációs puffer (Agilent) hozzáadása után 20 órára a hibridizációs kamrákba helyeztük (55 °C). A chipet (Agilent 8x15k Rat miRNA Microarray, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA p/n G4473A) 350 validált miRNS próbát tartalmaztak. A hibridizáció után a lemezeket speciális pufferekkel mostuk. Az egyes array-k leolvasása, valamint az adatok normalizálása, kiértékelése Agilent Microarray Scanner-rel és a Feature Extraction Software-rel (8.5 verzió) történt (Agilent Tech. Inc., Santa Clara, USA).

4.6 miRNS expresszió meghatározása nanokapilláris QRT-PCR technikával

Az OpenArray™ nanokapilláris kvantitatív valós idejű PCR analízis ötvözi a microarray technológia nagy áteresztőképességét és érzékenységét a kvantitatív valós idejű PCR (QRT-PCR) specifikusságával. A nanokapilláris QRT-PCR során egy reakció 33 nl térfogatban zajlik le. Egy chipen összesen 3200 reakciótér található meg, így egyszerre 3200 QRT-PCR reakció futtatható. Minden chip 48 almátrixra osztható és almátrixonként 64 assay vizsgálható egyszerre, így ez a módszer egyedülálló lehetőséget biztosít nagyszámú minta elemzésére (5.ábra).



5.ábra. Az OpenArray nanokapilláris QRT-PCR működése

A sejt kultúrából izolált miRNS-t minőség-ellenőrzés után átírtuk (1), majd egy preamplifikációs lépést követően, a nanokapilláris chip reakciótéreibbe töltöttük (2). A chipet egy olajat tartalmazó üvegtartóban rögzítettük (3), majd megfelelő hőmérsékleten 40 cikluson keresztül inkubáltuk (4). A Ct értékek normalizálását és elemzését szoftveresen végeztük (5).

A miRNS expressziós vizsgálatokhoz saját paneleket állítottunk össze, melyek egyenként 112 fluoreszcens festékkel (FAM) jelölt miRNS TaqMan próbát tartalmaztak, így egy chipen 24 minta párhuzamos analízisét tudtuk elvégezni. Ehhez első lépésben 350 ng miRNS került átírásra a vizsgálni kívánt specifikus primerek felhasználásával (Applied Biosystems). Az így kapott cDNS-t ezután TaqMan miRNS próbák jelentlében preamplifikáltuk (95 °C-10 perc, 55 °C-2 perc után 12 ciklus: 95 °C-15 sec, 60 °C-4 perc). Az előamplifikálást követően a templát cDNS-hez TaqMan MasterMixet adunk, majd a nanokapilláris chip reakciótéreibet OpenArray™ Autoloader használatával precízen feltöltjük. Az OpenArray™ chipet egy olajat tartalmazó üvegtartóba helyezzük, melyet UV fénnyel

szilárdított ragasztóval rögzítünk, majd a chipet az BioTrove OpenArray™ NT Cyclor készülékbe helyezzük, ahol egyidejűleg 3 nanokapilláris chipet tudunk analizálni, így egyszerre több mint 9000 egyedi reakció futtatható. A lemezeket 91 °C-on 10 percen keresztül inkubáljuk, amit egy 40 ciklusos PCR reakció követ (54 °C 170 másodperc, 92 °C 45 másodperc). A készülék automatikusan detektálja a fluoreszcencia intenzitást minden pontban, mely adatokat a program futása végén egy összefoglaló csv táblázatban tudjuk menteni, majd értékelni. Az expressziós értékek normalizálása minden esetben globális középérték normalizáció segítségével történt, mivel irodalmi adatok mutatnak arra, hogy ez nagy áteresztőképességű miRNS vizsgálatok során sokkal megbízhatóbban működik, mint a kontrollgénekekkel történő normalizálás (56).

4.7 Valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció (QRT-PCR)

4.7.1 miRNS expresszió mérése QRT-PCR technikával

A OpenArray chipet eredményeinek validálása TaqMan alapú QRT-PCR technikával történt. Az első lépésben 350 ng tiszta miRNS-ből speciális, hurkolt szerkezetű miRNS primerek alkalmazásával cDNS-t állítottunk elő TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) segítségével, amely a következő összetevőket tartalmazta: 100 mM dNTP (dTTP-vel), 50 U/μL MultiScribe™ reverz transzkriptáz, 10x-es reverz traszkripció puffer, 20U/μL RN-áz gátló, nukleáz mentes víz. A reakció során alkalmazott inkubációs idők és hőmérsékletek a következők voltak: 16 °C 30 perc, 42 °C 30 perc, 85 °C 5 perc. Ezt követően a második lépésben valós idejű PCR amplifikáció történt TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), valamint univerzális miRNS TaqMan próbák alkalmazásával (1.táblázat).

Name	Assay ID	miRBase Accession
hsa-miR-1	002222	MIMAT0000416
hsa-miR-9	000583	MIMAT0000441
hsa-miR-19a	000395	MIMAT0000073
hsa-miR-19b	000396	MIMAT0000074
hsa-miR-21	000397	MIMAT0000076
hsa-miR-23b	000400	MIMAT0000418
hsa-miR-24	000402	MIMAT0000080

1. táblázat A miRNS izoláló protokollok összehasonlítása során alkalmazott próbák listája.

Az alkalmazott próbák mindegyike alkalmas humán, egér és patkány, egy részük pedig Drosophila miRNS-ek vizsgálatára is.

4.7.2 Génexpresszió mérése QRT-PCR technikával

Az OpenArray PCR során szignifikáns változást mutató miRNS szabályozása alatt álló génekre specifikus primereket terveztünk, melyeket kvantitatív valós idejű PCR (QRT-PCR) technika segítségével használtunk fel eredményeink igazolására. A primerek tervezése CLC Main Workbench 6.0.1. tervező szoftver (CLC Bio, Aarhus, Dánia) segítségével történt, minden esetben exon-exon határra tervezve. A szoftver 0-100-ig terjedő skálán pontozza a tervezett primerpárokat különböző jellemzőik alapján (GC tartalom, hosszúság, olvadási hőmérséklet, stb). Mindezeket figyelembe véve kísérleteink során csak olyan primereket használtunk, amelyeknél ennek a pontszámnak a minimális értéke 70.

A QRT-PCR vizsgálatokhoz mintánként 1 µg RNS-ből kiindulva reverz transzkripciót végeztünk a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-tel (Applied Biosystems, Foster City, USA). A génexpressziós méréseket Bioneer Exicycler™ 96 (Bioneer, Daejeon, Korea) készüléken végeztünk. Minden reakció 20 µl térfogatban zajlott, 2X FastStart Sybr Green Master Mix (Roche) felhasználásával. A reakcióelegyet első lépésben 15 percig 95 °C-on inkubáltuk a polimeráz enzim aktiválásához, majd 45 cikluson keresztül amplifikáltuk a következők szerint: 95 °C 15mp, 60 °C 25mp és 72 °C 25mp. A felhasznált primereket az 2. és a 3. táblázat foglalja össze. Referencia („housekeeping”) génnek a glicerinaldehid-3 foszfát dehidrogenázt (GAPDH) és a hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferázt (HPRT) használtuk. A méréseket 96-lyukú plate-en végeztük, minden esetben három technikai ismétlést futtatva. A vizsgált gének kontroll génekhez viszonyított relatív expressziójának (ΔCT) kiszámítása után az egyes csoportok közötti eltérések kimutatása „comparative CT” ($\Delta\Delta CT$) módszerrel történt.

Gene	Name	forward primer	reverse primer
TP53INP1	tumor protein p53 inducible nuclear protein 1	aagactcacgggcacagaag	gcagcaagagctgcaacata
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	tacctgaaccggcacctg	gccgtacagttccacaaagg
SIRT1	sirtuin 1	aaatgctggcctaataagagtg	tggcaaaaacagatactgattacc
ITGB3	integrin, beta 3	ttctcttggtctttaatgaagc	cacaaatgctaaaagtcacagaa
IRS2	insulin receptor substrate 2	ttctgtcccaccacttgaa	ctgacatgtgacatcctgggtg
KRAS	v-Ki-ras2 oncogene	tggacgaatatgatccaacaat	tccctcattgcactgtactcc
COX2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	cttcacgcatcagttttcaag	tcaccgtaaatatgattaaagtcac
CCND1	cyclin D1	gaagatcgtcgccacctg	gacctcctcctgcacttct
IRS1	insulin receptor substrate 1	tatgccagcatcagtttcca	tttgctgaggtcatttaggtctt

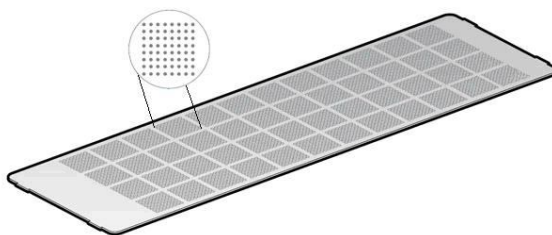
2. táblázat PUFA-kezelés hatására változó gének glioblasztóma sejtekben

Gene	Name	forward primer	reverse primer
ABCA1	ATP-binding cassette A1	cagacgatatctcgattcatgg	gagcgtgacttcgggtgg
ACOX1	acyl-CoA oxidase 1	cacctcgagggagagaaca	cgcacctggctgtagatgtt
ACVR1	activin A receptor, type I	ttggcctcgttctgtgg	tggtggctgtgaatctccact
APOA5	apolipoprotein A-V	cagaacagccagggcaaa	ccaagctaccttcaggctct
APOB	apolipoprotein B	cacctaaagatcaacagtcgcttc	tcgaaagccagaccactt
APOL2	apolipoprotein L, 2	tgctgctgactgaagatgga	cgtaaagtgtctgcgtcagc
CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5	ctcaccgtcatcctcgttg	gagtgggtccgagccata
CXCL12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12	ccctgccgattcttgag	gctttcagccttgcacaa
EP300	E1A binding protein p300	aagcaccagtgctcaagca	ccctggaggcattataggaga
ESR1	estrogen receptor 1	ttctttaagagaagcattcaagga	ttatcgatgggtcattgggtt
FAS	TNF receptor superfamily, member 6	ggcccatcttgctgcaa	tcactgtgtgcagtcct
GPX1	glutathione peroxidase 1	cgacatcgaaccgatataga	atgccttaggggttgcctagg
HFE2	hemochromatosis type 2	gtagcatcgggagccaac	tcaaaggctgcaggaagatt
INSR	insulin receptor	cagaaaaacctcttcaggcaat	ttcaagggtacttcgcttc
IRS1	insulin receptor substrate 1	tggacgtcacaggcagaat	gggatgcacgtaccatctac
ITGB3	integrin, beta 3	tgctaaatttgaggagaacga	cttatacaatgggtgttgcgtg
LEP	leptin	ccaggatcaatgacatttcaca	aatgaagtcacaaccgggtga
LPL	lipoprotein lipase	cagagaagggtcttgaga	ttcattcagcaggagctcaa
LYPLA3	lysophospholipase 3	tgaactgctcctgccagta	gttctgtgtaaacagcctga
MTHFR	methylenetetrahydrofolate reductase	acctgcacagagccaagc	cagtggctcacctacagggtct
NR1I2	nuclear receptor subfamily 1, I2	agcagtggccacctaacagt	ccaacatggttccacctctc
PCK1	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1	gatgacattgcctggatgaa	aaccgtttctgggtgatg
PECAM1	platelet/endothelial cell adhesion molecule	ctcagtcggctgacaagatg	aggctgcatagagcagcat
PPARA	peroxisome proliferator activated receptor alpha	tgccgactaccagtacttaggg	gctggagagaggggtgtctgt
PAFAH1B1	platelet-activating factor acetylhydrolase Ib	cacgaacatgtggtagaatgc	agaagggtccaggcttgc
SELE	selectin E	tctaagatgcgagcaatcagg	caggattctgcagacagttca
SELP	selectin P	aatccccgcagtgtaaag	gggtgtgtacagtcctatggtt
TNF	tumor necrosis factor	gcccagaccctcacactc	ccactccagctgctcctct
TPM1	tropomyosin 1	tccgaggctctcaaagatg	tgctactgcagcttcagcat
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	aaaaacgaaagcgcaagaaa	ttctccgctctgaacaagg

3. táblázat PUFA-kezelés hatására változó gének patkány szív és májszövetben

4.8 Génexpresszió vizsgálat dPCR technikával

A digitális polimeráz láncreakció (dPCR) a hagyományos PCR technika egy továbbfejlesztett formája, amely alkalmas a nagyon kis mennyiségű minta előamplifikáció nélküli kvantitálására (57, 58). A hagyományos eljárással szemben itt az egyes reakciók egymástól elszeparálva, külön reakciótérben zajlanak, ami sokkal érzékenyebbé teszi a mérést. A dPCR során minden egyes minta egy külön reakciótérbe kerül, ami még további alcellákra osztható, melyekben így pontonként meghatározható a vizsgált nukleinsav mennyisége (6.ábra).



6.ábra. OpenArray QRT-PCR plate elrendezése

A lemezek egymástól tökéletesen elszeparált reakciótereket tartalmaznak, amelyekben párhuzamosan akár 48 minta is vizsgálható.

A minták ilyen formában való elkülönítésének köszönhető, hogy a vizsgált molekulák a Poisson-eloszlás alapján helyezkednek el. Minden egyes vizsgált pontban 0 vagy 1 molekula helyezkedik el, azaz a detektált fluoreszcencia mindig pozitív vagy negatív választ ad, így a dPCR amplifikációt követően ezek a pozitív találatok könnyen összeszámolhatóak. A hagyományos PCR esetében a kezdeti kópiaszámra, csak a reakció során mért Ct értékekből tudunk következtetni. Ezzel szemben a dPCR esetében a reakció kezdetén minden pontban maximum egy található meg a vizsgálni kívánt molekulából, így a detektált pozitív-negatív válasz független az amplifikáció ciklusszámától és annak hatékonyságától, ami abszolút kvantifikációt tesz lehetővé, ezzel tovább növelve a módszer megbízhatóságát. A dPCR alkalmazási területei közül kiemelkedő jelentőséggel bírnak azok, amelyeknél csak nagyon kis mennyiségű kiindulási minta áll rendelkezésre. Ilyenek például egyes polimorfizmusok illetve patogének detektálását célzó vizsgálatok, valamint egyetlen sejt génexpressziós mintázatának meghatározása is (59, 60).

A neuronok molekuláris karakterizálását dPCR technikával végeztük el. A sejtek patch clamp-el történő izolálását követően első lépésben reverz transzkripciót végeztünk. Az RT reakció térfogata 5 μ L volt, amely a legyűjtött citoplazmán kívül SuperScript III enzimet (Invitrogen), dNTP-t, RNáz inhibitorot és génspecifikus primereket tartalmazott. Az átírás 50 °C-on zajlott, amit egy 75 °C-os inaktiválás követett. Az így nyert cDNS-hez Digital PCR enzimmixet (Applied Biosystems) és a vizsgálni kívánt gének TaqMan próbáit adtuk hozzá. Ezt az elegyet minden sejt esetében 4 subarraybe osztottuk szét, ami 256 reakciót jelent sejtenként. Ezt követően a chip feltöltése ugyanúgy zajlott mint a hagyományos OpenArray chippek esetében. A 40 ciklusos reakció után az eredményeket OpenArray Digital PCR Software segítségével értékeltük ki.

4.9 Elektrofiziológia – whole cell patch clamp technika

Az interneuronok vizsgálatához a mintákat Dr. Tamás Gábor és csoportja biztosította (SZTE, TTIK, Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék). A kísérletekhez fiatal (18-25 napos) Wistar patkányokat használtak. Az állatokból kipreparált agyakból 300 μm vastag metszeket készítettek. Ezeket mesterséges cerebrospinális folyadékba (MCSF) helyezték, melynek összetétele a következő volt: 130 mM NaCl; 3,5mM KCl, 1 mM NaHPO 4; 24mM NaHCO 3; 1mM CaCl 2; 3mM MgSO4; 10 mM D(+) glükóz. Az elektrofiziológiai vizsgálatokhoz a szeleteket 37°C-os elvezető kamrába helyezték, amelyen mesterséges cerebrospinális folyadékot áramoltattak át.

5. EREDMÉNYEK ÉS DISZKUSSZIÓ

5.1 Fibrózus szövetekből izolált miRNS mennyiségi és minőségi analízise

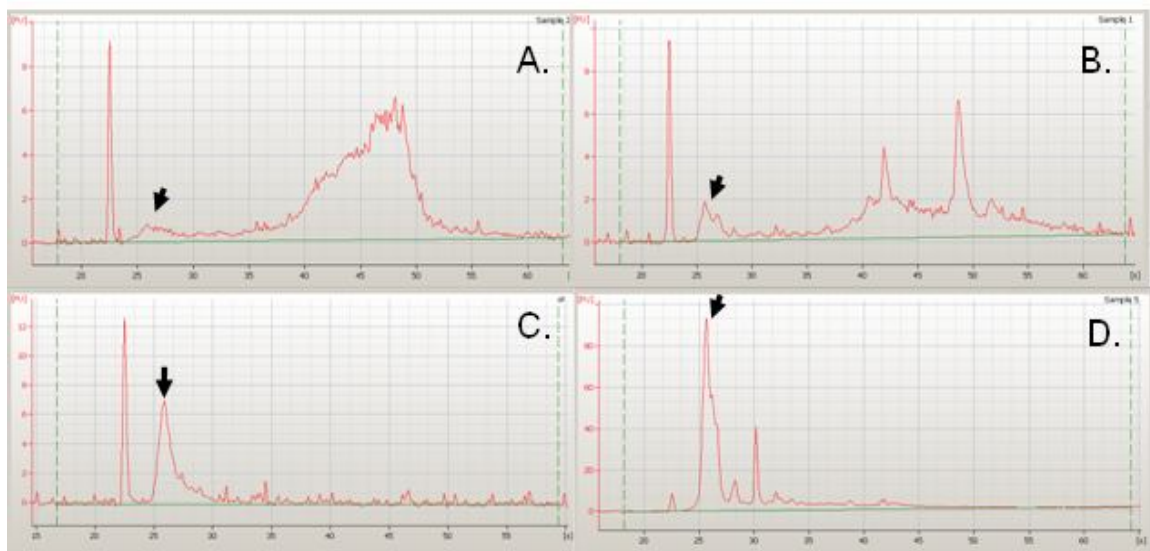
A fibrózus szövetekből történő miRNS izolálásához egy már létező, elsősorban paraffinba ágyazott minták feltárására kidolgozott protokollt vettünk alapul. Módszerünket (4.ábra) egér és patkányszív mintákon teszteltük. A lehető legpontosabb összehasonlítás kedvéért minden mintát 4 különböző módszerrel és 4 párhuzamos ismétléssel dolgoztunk fel, majd az így nyert RNS-t valós idejű PCR-rel vizsgáltuk. Az általunk optimalizált módszer mellett kipróbáltuk a hagyományos és az irodalmi adatokban leggyakrabban felbukkanó Trizolos tisztítást, a Proteináz K-val kombinált Trizolos tisztítást, illetve a Roche miRNS izoláló kitjét is az általuk javasolt protokollt követve. Az izoláláshoz minden esetben 50 mg szövetből indultunk ki. A minták nukleinsav tartalmát első lépésben spektrofotometriásan vizsgáltuk (4.táblázat). Bár a Trizollal történő RNS izolálás és az általunk kifejlesztett protokoll hasonló eredményt adott, fontos figyelembe venni, hogy amíg előbbi esetében a vizsgált minta minden RNS típust tartalmaz (rRNS, mRNS, miRNS), addig utóbbi esetében kizárólag kisméretű RNS molekulák kerültek detektálásra.

MÓDSZER	RNS HOZAM
<i>Trizol</i>	15,36*
<i>Trizol+ProtK</i>	16,35*
<i>Roche</i>	1,72
<i>Optimalizált</i>	10,97

4.táblázat. A különböző protokollok hatékonyságának összehasonlítása (µg-ban).

A *-al jelölt minták esetében a teljes RNS koncentráció került detektálásra.

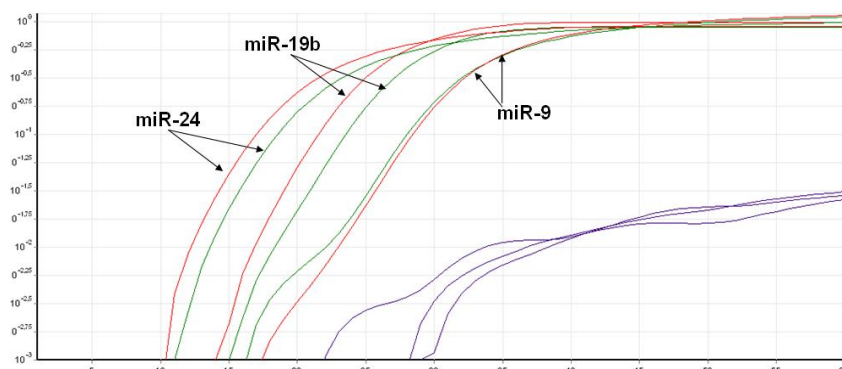
Ezt követően BioAnalyser 2100 (Agilent) készülék segítségével összehasonlítottuk az izolált RNS minták minőségét is. A módszer előnye, hogy a kapott jelek digitálisan kerülnek rögzítésre, továbbá real-time elektroferogram, gélkép és adattáblázat formájában is megjelennek. A Trizol alapú protokollok esetében a vártaknak megfelelően nagy mennyiségű rRNS-t és mRNS-t detektáltunk, és emellett körülbelül 2-5% miRNS-t. Az oszlopos módszereknél mindkét esetben tiszta miRNS-t kaptunk. Azonban az általunk optimalizált protokollal izolált minta körülbelül hatszor annyi miRNS-t tartalmazott, mint a hagyományos Roche kittel tisztított (7.ábra).



7.ábra. A 4 módszerrel detektálható miRNS elektroferogramos ábrázolása

A nyilak a különböző módszerekkel nyert miRNS molekulák mennyiségét jelölik: A: Trizol, B: Trizol+ProtK, C: Roche High Pure miRNA Kit, D: saját optimalizált protokoll.

A következő lépésben a 4 módszert valós idejű TaqMan-alapú PCR futásokban teszteltük. A tiszta miRNS-t tartalmazó mintákból 350 ng, míg a Trizollal izolált totál RNS populációkból 1000 ng került átírásra TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) felhasználásával. A mintákat 7 különböző miRNS TaqMan próbával futtattuk (1.táblázat). A Trizolos minták esetében – bár nagyobb mennyiségű minta került átírásra – egyetlen miRNS esetében sem kaptunk detektálható jelet (8.ábra). Ennek magyarázata lehet a minta rendkívül alacsony miRNS tartalma, illetve a fibrózus szívszövet nem megfelelő feltárása.



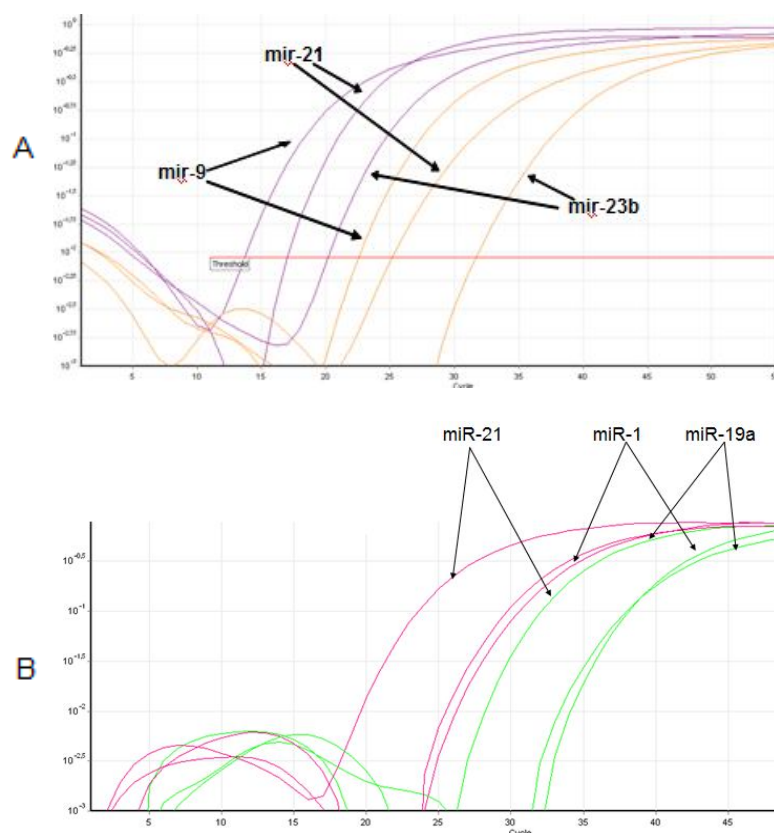
8.ábra. miRNS expresszió vizsgálata QRT-PCR technikával

Három miRNS molekula (miR-9, miR-19b, miR-24) vizsgálata Roche (zöld), Trizol (kék) és az általunk optimalizált (piros) módszer alkalmazásával. Bár a kísérleteket minden esetben 3 technikai párhuzamos futtatásával végeztük, az ábrán a könnyebb átláthatóság érdekében minden esetben csak egy került ábrázolásra.

Az oszlopos módszerek esetében mind a hét vizsgált miRNS molekula (*miR-1*, *miR-9*, *miR-19a*, *miR-19b*, *miR-21*, *miR-23b*, *miR-24*) amplifikációja sikeres volt. A QRT-PCR futások során az eddig vizsgált négy módszert összevetettük, más, a piacon levő miRNS izoláló kitekkel is (Qiagen: miRNeasy Kit, Ambion: mirVana miRNA Isolation Kit). Az általunk optimalizált protokoll minden miRNS esetében alacsonyabb Ct értékek mellett alacsonyabb szórást eredményezett, mint a többi vizsgált módszer (9.ábra). Mind a szórás, mind a Ct értékek átlagát három független QRT-PCR futás eredményéből számoltuk ki (5.táblázat).

miRNS	Protokoll	Átlag Ct	Szórás
miR-1	Optimalizált	12,86	0,57
	Roche	17,84	1,96
miR-9	Optimalizált	21,105	1,67
	Roche	26,77	3,17
miR-19a	Optimalizált	18,98	0,56
	Roche	21,55	0,93
miR-19b	Optimalizált	15,16	0,55
	Roche	18,25	2,34
miR-21	Optimalizált	16,12	0,47
	Roche	20,41	2,87
miR-23b	Optimalizált	22,44	0,14
	Roche	27,09	5,03
miR-24	Optimalizált	12,63	0,58
	Roche	14,06	1,38

5. táblázat Amplifikációs hatékonyság összehasonlítása a Roche és a saját módszer esetében

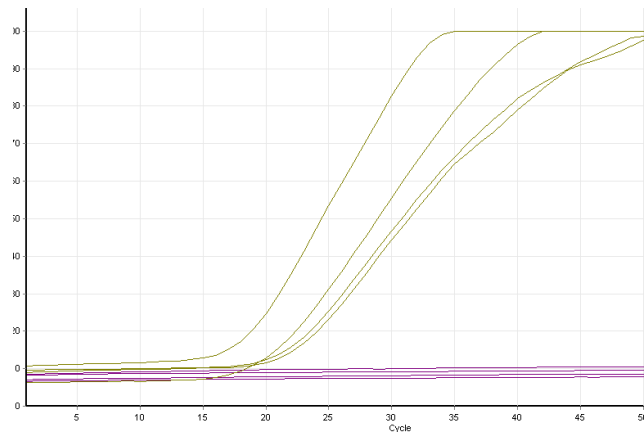


9.ábra miRNS expressziós változások összehasonlítása

A. Az általunk optimalizált (lila) és a Roche protokoll (narancs) esetében

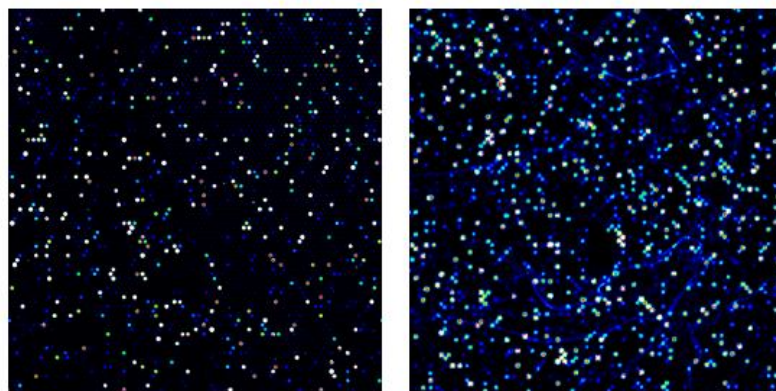
B. Az általunk optimalizált (piros) és az Ambion protokoll (zöld) esetében

Minden minta esetében lefuttattunk egy olyan kontroll QPCR kísérletet is amelyben a minták háztartási génekre (*hprt*, *gapdh*, *act1*, *tubb*) specifikus primerekkel való amplifikációját vizsgáltuk. A Trizol-alapú módszerek esetében mind a négy kontrollgén detektálható volt. Ezzel szemben az oszloppal izolált, tiszta miRNS-t eredményező protokolloknál egyik gén jelenlétét sem sikerült kimutatni. Ezek az eredmények is azt támasztják alá, hogy az áltunk kifejlesztett módszer nem csak nagy mennyiségű miRNS-t eredményez, hanem annak tisztasága is kifogástalan (10.ábra).



10.ábra. Háztartási gének vizsgálata a két Trizol-alapú (barna) és az általunk optimalizált (lila) módszer esetében

A különböző protokollok szerint izolált miRNS-ek minőségének további vizsgálatához a mintákat DNS-microarray technikával is teszteltük. Mivel a Trizol-alapú módszerekkel tisztított minták még a microarraynél sokkal érzékenyebb QRT-PCR vizsgálatok során sem adtak detektálható jelet, így a a DNS-chip kísérletekben már csak az oszlopos technikával izolált mintákat használtuk. A fluoreszcens jelölést követően a mintákat a chip felületére hibridizáltuk, majd a lemezeket konfokális lézer szkenerrel leolvastuk. A 11. ábrán látható a két leghatékonyabban működő módszer összehasonlítása.



11. ábra Agilent miRNS patkány chip hibridizálás után a Roche (balról) és a saját módosított protokollunk (jobbról) szerint

Ez alapján megállapítottuk, hogy az általunk optimalizált protokoll lényegesen több találatot eredményezett és ezek átlagos intenzitása is sokkal magasabb, mint a hagyományos módszer esetében. Míg ez utóbbit alkalmazva 118 miRNS molekula expresszióját sikerült detektálni, addig ugyanebben a szövetben az optimalizált módszer segítségével 172-t.

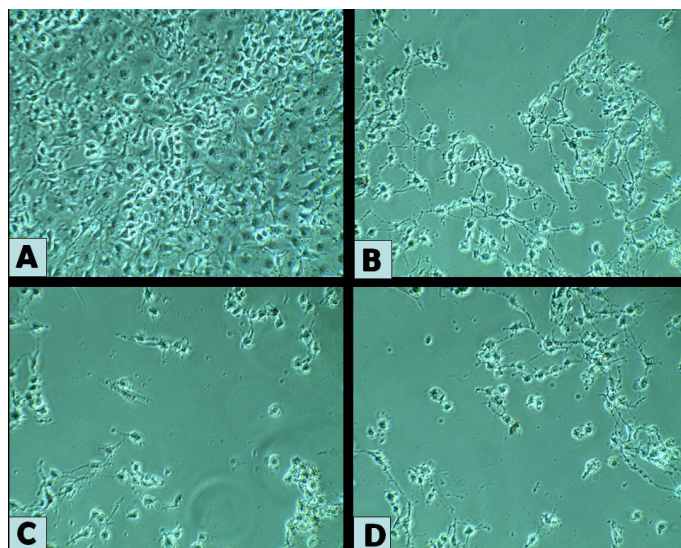
A fentieket figyelembe véve elmondhatjuk, hogy az általunk kifejlesztett módszer megoldást jelent a kis méretű RNS molekulák fibrózus szövetekből történő izolálására. Az így nyert nagy tisztaságú minta lényegesen megnöveli a miRNS expressziót vizsgáló módszerek szenzitivitását. A miRNS molekulák expresszió-változását a szívszövet különböző patológiás elváltozásai során ezidáig olyan folyamatokban mutatták ki, mint az ischemia/reperfúzió, a cardiomyopathia vagy az atherosclerosis. Ezen vizsgálatok klinikai hasznosíthatósága tehát rendkívül nagy lehet, hiszen napjainkban egyre inkább előtérbe kerülnek a miRNS molekulák úgy is, mint gyógyszerkísérletek potenciális targetjei. Ilyenek például a *miR-208* és a *miR-499*, melyek antagonistái ma már preklinikai fázisban levő gyógyszerjelöltek (61).

5.2 Többszörösen telítetlen zsírsavakkal kezelt glioblasztóma sejtek miRNS és mRNS expressziós mintázata

5.2.1 PUFA-kezelt glioblasztóma sejtek vizsgálata holografikus mikroszkóppal

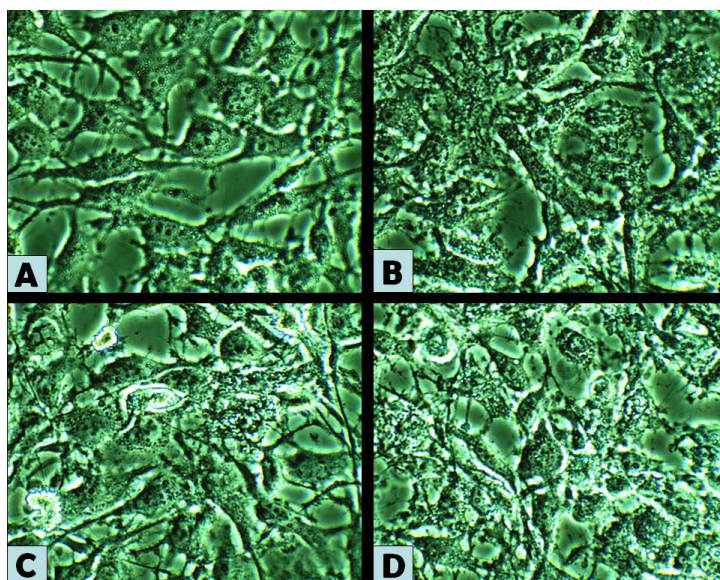
A tumorsejtek túlélését a kezelések után 24 órával HoloMonitorTM M3 holografikus mikroszkóp segítségével vizsgáltuk meg. Ennek segítségével minden kezelés esetében meghatároztuk az élő sejtek számát a tenyészetben, illetve a sejtek morfológiai tulajdonságaiból (alak, méret, denzitás) következtetni tudtunk a kezelés hatékonyságára. Minden kezelés esetében két koncentrációt alkalmaztunk, de a mikroszkópos felvételek alapján nem tapasztaltunk dózisfüggő változásokat, így a továbbiakban csak a magasabb koncentrációval kezelt sejteket használtuk. A 12. ábrán látható, hogy a PUFA kezelés nemcsak a tumorsejtek osztódását gátolta, hanem mindhárom esetben apoptózist indukált. 24 órával a kezelést követően nemcsak a kezelt tumorsejtek száma csökkent, hanem megjelentek apoptózisra jellemző sejtmorfológiai elváltozások is. Ahogy a 13. ábrán látható a gömb alakú glioblasztóma sejtek (A) mindhárom PUFA kezelés esetében jelentősen

megnyúltak, a sejtmembránok degradálódtak, a sejtmagok pedig fragmentálódtak, ami mind programozott sejthalál indukcióra utal.



12. ábra Többszörösen telítetlen zsírsavak hatása glioblasztóma sejtek (GBM2) osztódására holografikus mikroszkóppal vizsgálva

A sejteket vivőanyaggal (A), 100 μ M DHA-val (B), 100 μ M AA-val (C) és 150 μ M GLA-val (D) kezeltük 24 órán keresztül. (10X nagyítás)



13. ábra Többszörösen telítetlen zsírsavak hatása glioblasztóma sejtek (GBM2) morfológiájára holografikus mikroszkóppal vizsgálva.

A sejteket vivőanyaggal (A), 100 μ M DHA-val (B), 100 μ M AA-val (C) és 150 μ M GLA-val (D) kezeltük 24 órán keresztül. (40X nagyítás)

A sejtek életképesség-vizsgálatának elemzése során is ezzel egybevágó eredményeket kaptunk. Kontroll sejtek esetében a kiindulási sejtszámhoz képest 24 óra elteltével megduplázódott az élő sejtek száma. A PUFA kezelt tenyészetek közül az AA esetében volt a legmagasabb (66%) a sejtpusztulás mértéke 24 óra elteltével, ezt követte a TMZ (58%), a GLA (43%) és végül a DHA (38%). A mikroszkópos eredmények tehát mindhárom általunk alkalmazott PUFA molekula esetében igazolták, azok glioblasztóma sejtekre gyakorolt citotoxikus hatását.

5.2.2 PUFA-kezelt glioblasztóma sejtek miRNS expressziós analízise

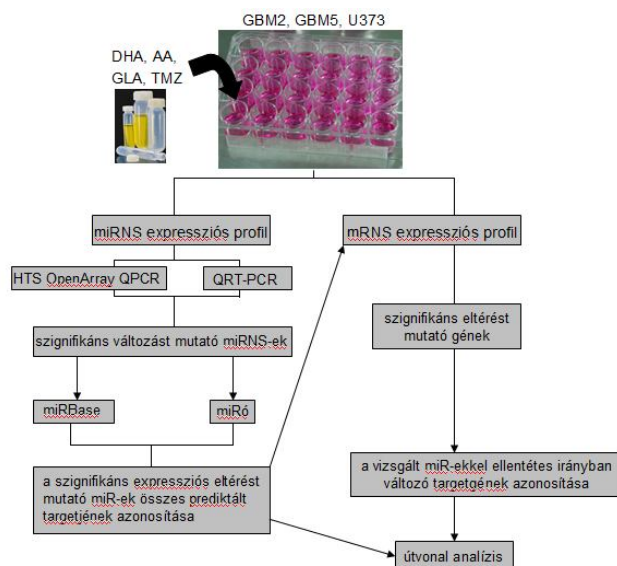
Következő lépésben 112, irodalmi adatok alapján kiválasztott miRNS PUFA kezelés hatására bekövetkező expressziós változásait vizsgáltuk nagy áteresztőképességű nanokapilláris QRT-PCR technikával három különböző glioblasztóma sejtvonalon (GBM3, GBM5, U373). A kezelés időtartama minden esetben 24 óra volt. A többszörösen telítetlen zsírsav molekulák (AA, GLA, DHA) mellett a klinikai gyakorlatban agytumорок kezelésére leggyakrabban használt kemoterápiás szer, a temozolomid hatását is vizsgáltuk. A temozolomidot kontrollként használva azokat a specifikus válaszokat próbáltuk azonosítani, amelyek az apoptózis következtében alakulnak ki, illetve amelyek a PUFA és a temozolomid kezelés esetében hasonlóak. A 27 vizsgálati csoportban csoportonként 3, összesen 81 minta vizsgálatát végeztük el (6. táblázat).

GBM2	GBM5	U373
DHA 50	DHA 50	DHA 50
DHA 100	DHA 100	DHA 100
AA 50	AA 50	AA 50
AA 100	AA 100	AA 100
GLA 75	GLA 75	GLA 75
GLA 150	GLA 150	GLA 150
TMZ 50	TMZ 50	TMZ 50
TMZ 100	TMZ 100	TMZ 100
kontroll	kontroll	kontroll

6. táblázat. A glioblasztóma sejtek kezeléséhez alkalmazott anyagok koncentrációja

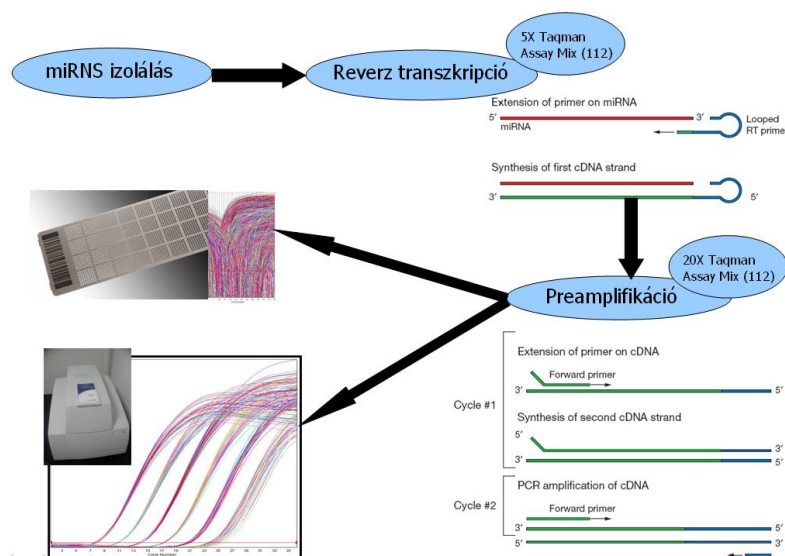
Mindhárom sejtvonal esetében ugyanazokat a koncentrációkat használtuk; DHA: 50 és 100 μ M, AA: 50 és 100 μ M, GLA: 75 és 150 μ M, TMZ: 50 és 100 μ M, kontrollként pedig vivőanyaggal (DMSO) kezelt sejteket alkalmaztunk.

A PUFA kezelt glioblasztóma sejtvonalak molekuláris és bioinformatikai vizsgálatára kidolgozott vizsgálatok főbb lépéseit a 14. ábra mutatja be.



14. ábra. PUFA kezelt glioblasztóma sejtvonalak molekuláris karakterizálásának lépései

A glioblasztóma sejtek miRNA expressziójának változását első lépésben nagy áteresztőképességű nanokapilláris QRT-PCR technológiával vizsgáltuk. Ennek folyamatát a 15. ábra mutatja be.



15. ábra. Nagy áteresztőképességű miRNA vizsgálat lépései

Az amplifikációs görbék elemzését, a nyers Ct értékek meghatározását és normalizását az OpenArray QRT-PCR software segítségével végeztük el. A kezelések hatására a 112 vizsgált miRNS közül 65 mutatott szignifikáns változást. Az értékelés során csak azokat az eredményeket vettük figyelembe, amelyeknél a Ct értékek 26 alatt maradtak, mivel előlött az OpenArray módszer megbízhatósága és reprodukálhatósága nagymértékben lecsökken, illetve az ismételt futások közti szórás magas. A kísérleti csoportok között szignifikáns expressziós eltérést mutató miRNS-ek azonosítására Student's t tesztet végeztünk ($p < 0,05$). Az összes általunk vizsgált miRNS molekula expressziós változását a 1. kiegészítő táblázat tartalmazza, amelyben minden cella az adott miR három futás alapján átlagolt, relatív expresszióját mutatja. Szignifikáns expressziós változásnak minden esetben minimum kétszeres növekedést/csökkenést fogadtunk el.

Az eredmények miRNS adatbázisokkal történő összevetését követően végül 19 olyan miRNS választottunk ki, amelyek PUFA kezelésre, illetve valamelyik sejtvonalra specifikus választ adtak (7.táblázat).

ASSAY	G2 AA100	G2 AA50	G2 DH100	G2 DH50	G2 GL100	G2 GL50	G2 TM100	G5 AA100	G5 AA50	G5 DH100	G5 DH50	G5 GL100	G5 GL50	G5 TM100	U3 AA100	U3 AA50	U3 DH100	U3 DH50	U3 GL100	U3 GL50	U3 TM100
hsa-miR-29a	3.20	4.86	5.43	4.61	n.d.	n.d.	-5.47	-3.88	-3.86	-4.82	-3.19	n.d.	n.d.	-4.27	-2.50	-4.70	n.d.	2.58	-6.85	n.d.	-10.13
hsa-miR-16	-0.29	0.51	-0.78	0.22	n.d.	n.d.	-3.78	3.66	2.13	n.d.	n.d.	0.15	-0.22	-3.89	-2.11	-1.80	-1.50	-1.61	-1.83	0.34	-5.82
hsa-miR-22	0.01	-0.16	0.57	-0.95	-3.54	-2.27	-3.39	-1.33	0.09	-0.93	0.15	n.d.	n.d.	-3.33	n.d.	n.d.	-0.01	0.13	-0.15	0.22	-1.87
hsa-miR-20b	3.58	3.25	-0.41	0.40	n.d.	n.d.	-2.47	-0.56	0.26	-0.04	0.49	-3.25	-1.06	-3.06	0.68	0.73	1.63	2.71	-0.05	0.09	-0.50
hsa-miR-29c	0.85	0.89	-4.50	-2.03	-1.75	-2.06	-2.41	-4.51	-3.90	-4.48	-1.90	4.07	n.d.	-2.40	1.50	-0.33	-0.38	0.55	3.59	3.00	-0.09
hsa-miR-30c	-2.79	-2.92	-4.09	-4.93	-2.48	-2.07	-2.11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.03	-0.37	-1.69	-2.64	0.43	n.d.	5.99	0.36	-0.79	-0.07
hsa-miR-17	-1.29	-1.08	-0.87	-0.78	-1.34	-0.29	-1.28	0.01	0.72	0.80	0.58	-4.07	-4.96	-1.30	n.d.	1.08	n.d.	n.d.	n.d.	2.15	-0.06
hsa-miR-25	-2.62	-1.15	-4.06	-1.40	-2.00	-1.22	-1.27	n.d.	n.d.	3.50	3.43	-0.75	n.d.	-1.13	0.73	-0.01	2.62	4.19	-0.94	0.20	0.06
hsa-miR-206	0.39	-0.49	-2.29	-0.29	-3.46	-2.37	-1.22	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.10	0.08	-0.93	-2.52	-2.23	-1.22	-0.71	0.46	0.36	0.08
hsa-miR-183	0.32	-0.84	0.60	0.80	n.d.	4.02	-1.09	n.d.	n.d.	1.38	0.47	0.24	0.69	-0.79	1.37	0.55	1.80	0.90	2.18	1.47	0.40
hsa-miR-224	0.27	0.24	-0.92	-0.32	-1.47	-2.41	-0.97	n.d.	-0.14	-2.36	-1.82	-3.83	-1.45	-0.37	0.61	0.14	2.57	2.43	0.59	1.60	0.53
hsa-miR-145	-5.70	-4.30	-7.35	-2.37	-2.72	0.26	-0.77	-1.76	-1.50	-1.19	-1.33	-1.78	-1.87	-0.14	0.89	0.73	0.65	0.37	0.95	0.97	1.36
hsa-miR-26a	-0.87	-0.09	-0.77	-0.27	-0.36	0.32	-0.57	-1.09	-1.17	-1.86	-0.66	-2.07	-1.01	-0.08	5.66	5.63	1.69	-0.42	3.17	n.d.	2.85
hsa-miR-181a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.83	0.75	-0.55	3.51	3.96	3.69	4.30	-0.84	0.28	-0.01	n.d.	2.42	-2.86	0.73	0.75	-0.08	4.01
hsa-miR-208	-1.97	-0.79	0.21	-0.55	-1.29	-2.44	-0.46	4.11	3.85	1.18	1.28	-0.64	0.53	0.86	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
hsa-miR-143	-1.28	0.33	-1.52	-0.90	0.25	n.d.	-0.37	-3.84	-3.82	-2.15	-1.19	1.51	0.06	1.61	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
hsa-miR-20a	0.76	0.59	-0.62	-0.33	-1.90	-1.60	-0.32	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.25	1.41	2.20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
hsa-miR-149	0.47	-0.40	-0.06	-0.01	-0.87	-0.60	1.20	0.93	0.08	3.19	0.74	3.80	2.63	4.82	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
hsa-miR-125b	0.73	-0.01	0.31	0.67	n.d.	n.d.	n.d.	-2.19	-2.82	-2.35	-1.35	0.01	-0.92	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

7. táblázat. PUFA kezelt glioblasztóma sejtekben szignifikáns változást mutató miRNS-ek.

A táblázatban az értékek kettes-alapú logaritmusát tüntettük fel, így az elfogadott változások: $-1 >$ represszió, $1 <$ overexpresszió.

A legszembetűnőbb változásokat mind a PUFA, mind a temozolomid kezelt sejteknél, olyan miRNS-ek esetében tapasztaltuk, amelyek az apoptózis szabályozásában játszanak kulcsszerepet. Ilyen például a mindhárom sejtvonal esetében változást mutató

miR-30c, *miR-25*, *miR-17*, *miR-26a*, *miR-29c*, *miR-31*, *miR-200a* és a *miR-206*. A temozolomid kezelés hatására bekövetkező változások közül a *miR-182* overexpressziója és a *miR-16*, illetve a *miR-183* repressziója a legjelentősebb. Ezzel szemben a többszörösen telítetlen zsírsavakkal történő kezelés esetében elsősorban a *miR-143* szint csökkenését és a *miR-20b* indukcióját figyeltük meg.

A kezelésekre adott válaszok különbözősége mellett, különbségeket tapasztaltunk az egyes sejtvonalak között is. Ezek az eltérések a különböző glioblasztóma sejtvonalakban eltérően működő szignalizációs útvonalaknak köszönhetőek. Ilyen sejtvonal specifikus választ mutatott a *miR-125b* a GBM5 sejtvonalakban, illetve a *miR-197* az U373 sejtek esetében. A *miR-145* expresszió-változása minden esetben jelentős volt, ám amíg a GBM sejtekben körülbelül ötszörös csökkenést, addig az U373 sejteknél minden esetben növekvő expressziót tapasztaltunk. Ugyancsak szignifikáns expresszió-változást tapasztaltunk a *miR-140*, a *miR-323* és a *miR-133b* esetében is azonban ezt csak az U373 sejtek esetében észleltük. Mivel a zsírsavak egyikénél sem tapasztaltunk jelentős eltérést a különböző koncentrációjú kezelések között, így a további kísérleteket minden esetben a magasabb koncentrációval végeztük.

Bár a nanokapilláris QRT-PCR ma már miRNS expresszió analízis esetében is validált módszernek számít (62), néhány miRNS kiválasztásával eredményeinket hagyományos QRT-PCR technikával is igazoltuk. A hat legjelentősebb változást mutató miR molekulát (*miR-16*, *miR-20b*, *miR-22*, *miR-30c*, *miR-143*, *miR-145*) mindhárom sejtvonal és mind a négy kezelés esetében TaqMan alapú QRT-PCR során vizsgáltuk. Az eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a HTS QRT-PCR mérések során kapott adatokat körülbelül 80 %-os megbízhatósággal sikerült visszaigazolni. illetve, hogy a hagyományos QRT-PCR használatával mindössze 4 %-al sikerült több adatot nyerni, mint a nagy áteresztőképességű módszerrel. Az eredményeket az 8. táblázat foglalja össze.

U373 GBM5 GBM2	miRNA-16	A	D	G	T	U373 GBM5 GBM2	miRNA-30c	A	D	G	T
	HTS QRT-PCR	-0,2	-0,78	n.d.	-3,78		HTS QRT-PCR	-2,78	-4,08	-2,4	-2,1
	QRT-PCR	-1,02	-1,02	-0,5	-1,59		QRT-PCR	-5,63	-1,86	-2,16	-1,44
	confirm	n	y	y	y		confirm	y	y	y	y
	HTS QRT-PCR	n.d.	3,49	-0,75	-1,13		HTS QRT-PCR	-3,88	-4,8	n.d.	-4,26
	QRT-PCR	0,1	0,87	-0,92	-3,32		QRT-PCR	-5,84	-2,71	-2,69	-2,72
	confirm	y	y	y	y		confirm	y	y	y	y
	HTS QRT-PCR	n.d.	-0,02	-0,15	-3,78		HTS QRT-PCR	-2,49	n.d.	-6,84	-10,1
	QRT-PCR	-1,25	-1,35	-1,66	-1,2		QRT-PCR	-4,88	-3,17	-4,78	-3,74
	confirm	n	n	y	y		confirm	y	y	y	y
	miRNA-20b	A	D	G	T		miRNA-143	A	D	G	T
	HTS QRT-PCR	3,58	-0,4	n.d.	-2,47		HTS QRT-PCR	-1,2	-1,5	2,61	-0,36
U373 GBM5 GBM2	QRT-PCR	1,18	-1,02	-0,11	-2,07	U373 GBM5 GBM2	QRT-PCR	-1,3	-5,38	-3,8	-2,44
	confirm	y	y	y	y		confirm	y	y	n	n
	HTS QRT-PCR	4,11	1,17	-0,6	0,85		HTS QRT-PCR	-1,76	-1,18	-1,77	-0,14
	QRT-PCR	3,81	4,34	4,02	2,31		QRT-PCR	-3,8	-3	-3,62	-1,53
	confirm	y	y	n	y		confirm	y	y	y	n
	HTS QRT-PCR	0,72	2,62	-0,93	0,05		HTS QRT-PCR	0,67	1,62	-0,04	-0,5
	QRT-PCR	2,37	1,18	0,41	0,63		QRT-PCR	-1,98	0,05	1,25	-1,45
	confirm	y	y	n	y		confirm	n	n	n	y
	miRNA-22	A	D	G	T		miRNA-145	A	D	G	T
	HTS QRT-PCR	0,01	0,57	-3,53	-3,38		HTS QRT-PCR	-5,7	-7,35	-2,72	-0,77
	QRT-PCR	-1,85	-0,87	-6,26	-2,16		QRT-PCR	-8,5	-1,5	-1,45	-1,64
	confirm	n	n	y	y		confirm	y	y	y	y
U373 GBM5 GBM2	HTS QRT-PCR	-1,08	-186	-2,07	-0,08	U373 GBM5 GBM2	HTS QRT-PCR	-2,19	-2,35	0,01	n.d.
	QRT-PCR	-2,15	-2,69	-3,18	-2,06		QRT-PCR	-4,75	-4,74	-2,1	-20,7
	confirm	y	y	y	n		confirm	y	y	n	n
	HTS QRT-PCR	-2,52	-1,21	0,45	0,08		HTS QRT-PCR	0,61	2,56	0,59	0,53
	QRT-PCR	-4,21	-4,1	-4,99	n.d.		QRT-PCR	1,61	1,54	0,5	1,47
	confirm	y	y	n	n		confirm	y	y	y	y

8.táblázat. A relatív miRNS expresszió korrelációja HTS QRT-PCR és hagyományos QRT-PCR alkalmazása során

A: AA100; D: DHA100; G: GLA150; T: TMZ100

5.2.3 miRNS expressziós eredmények validálása targetének vizsgálatával

A kezelések hatására, illetve a különböző sejtvonalakban szignifikáns expressziós eltérést mutató miRNS-ek lehetséges célmolekuláit különböző számítógépes target predikciós algoritmusok segítségével azonosítottuk. Az egyes algoritmusok különböző szempontokat eltérő súllyal vesznek figyelembe a predikció során. Jelenleg nincsen egységes állásfoglalás az egyes target predikciós adatbázisok preferenciáját illetően, így a target gének kiválasztása során a legszélesebb körben alkalmazott algoritmusok eredményeit vettük figyelembe. Így a potenciális targetek azonosítására a miRBase Targets (www.mirbase.org) és a miRó (ferrolab.dmi.unict.it/miro/) adatbázisokat használtuk.

Újabb megfigyelések alapján a miRNS-ek által előidézett jelentősebb proteinszint csökkenés emlős sejtekben elsősorban az mRNS degradáció következtében valósul meg. Így a biológiailag releváns célpontok azonosítását segíthetik a párhuzamosan elvégzett nagy áteresztőképességű miRNS és mRNS expressziós mérések. A vizsgált sejtekben emelkedett expressziót mutató miRNS-ek targetjei ennek értelmében csökkent kifejeződést mutatnak,

míg a csökkent expressziót mutató miRNS targetjei fokozott mértékben expresszálódnak. Ezt figyelembe véve olyan mRNS célpontok azonosítását tűztük ki célul, amelyek a PUFA kezelés hatására szignifikáns változást mutató miR-ekkel ellentétes irányban változnak. Ehhez az adatbázisokat irodalmi adatokkal összevetve saját génlistát hoztunk létre (9.táblázat), amely a kísérleti csoportok közt eltérést mutató miRNS-ek potenciális célpontját tartalmazta. Fontos hangsúlyozni, hogy az általunk kiválasztott target gének szinte mindegyike csak prediktált célpont, azaz a köztük és a vélhetően őket szabályozó miR-ek közt fennálló kapcsolat kísérletesen még nem került bizonyításra.

MIRNA	GENE	Process	MIRNA	GENE	Process	MIRNA	GENE	Process
miR-17	APP	apoptosis	miR-30c	IL1A	apoptosis	miR-143	SMNDC1	apoptosis
	FASTK	apoptosis		DDIT4	apoptosis		NGFR	apoptosis
	EGLN3	apoptosis		SIRT1	apoptosis		KRAS	apoptosis
	SGMS1	apoptosis		TP53INP1	apoptosis		COX2	apoptosis
	TP53INP1	apoptosis		IRS2	apoptosis		BBC3	apoptosis
miR-20b	TNFRSF21	apoptosis	miR-16	ITGB3	apoptosis	miR-22	ITM2B	apoptosis
	APP	apoptosis		CADM1	apoptosis		DPF2	apoptosis
	EGLN3	apoptosis		BLC2	B cell proliferation		SIRT1	apoptosis
	E2F1	apoptosis		CADM1	cell adhesion		EP300	apoptosis
miR-26a	FASTK	apoptosis	miR-145	PDCD4	cell aging	miR-200a	YARS	apoptosis
	DAPK1	apoptosis		RTKN	apoptosis		PDCD1	apoptosis
	PAK2	apoptosis		PDCD4	apoptosis		NLRP3	apoptosis
	BAG4	apoptosis		UBE22	apoptosis		SGMS1	apoptosis
	UBE4B	apoptosis		IRS1	apoptosis		CTNNB1	apoptosis
miR-29c	TP53INP1	apoptosis	miR-149	RASSF5	apoptosis	miR-206	NDUFS1	apoptosis
	BBC3	apoptosis		BBC3	apoptosis		BDNF	anti-apoptosis
	SLK	apoptosis		PDE1B	apoptosis		API5	apoptosis
	AHR	apoptosis		PHF17	apoptosis		ZMAT3	apoptosis
	TP53INP1	apoptosis	miR-25	TNFRSF19	apoptosis	miR-34	BAG4	apoptosis
	ELMO2	apoptosis		UBE22	apoptosis		SIRT1	apoptosis
	RYBP	apoptosis		DYRK2	apoptosis		SGPP1	apoptosis
	PPARD	apoptosis		SGPP1	apoptosis			

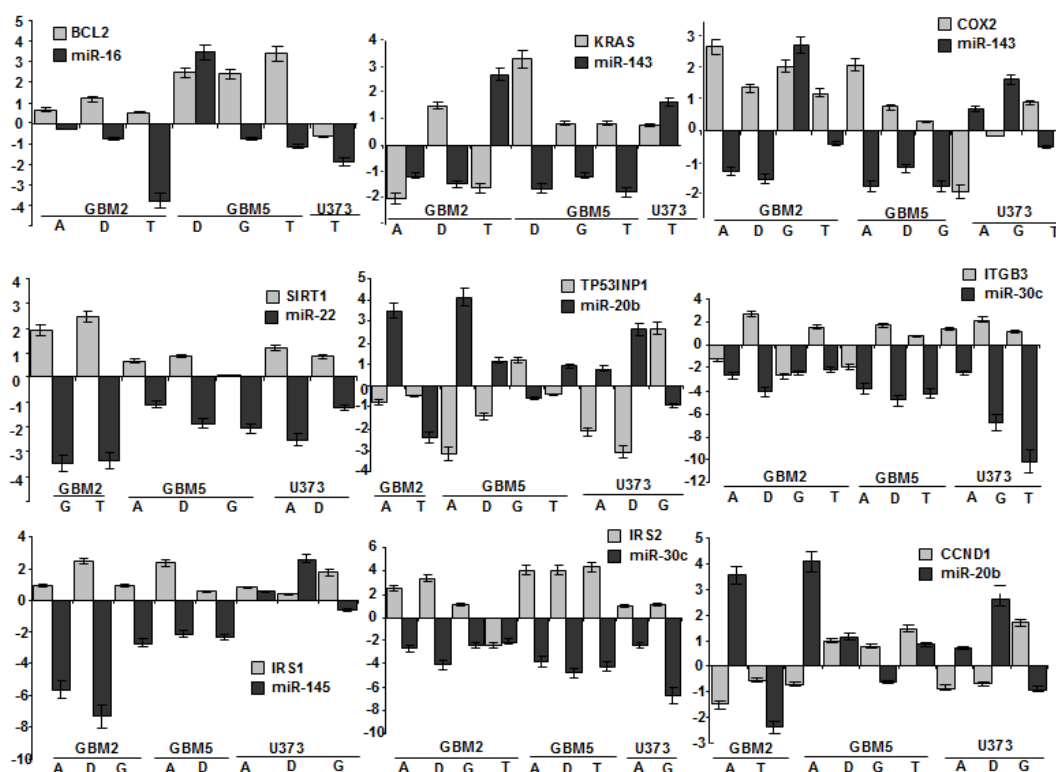
9. táblázat. PUFA kezelés hatására változást mutató miRNS-ek és apoptózisban szerepet játszó célgénjeik

5.2.4 PUFA-kezelt glioblasztóma sejtek mRNS expressziós analízise

A PUFA kezelés hatására változást mutató miRNS targetek többsége az apoptotikus gének közül került ki, ami arra utal, hogy az általunk vizsgált miRNS-ek is kulcsszerepet játszanak az apoptózis folyamatában. Ezek a miRNS-ek és az általuk szabályozott mRNS-ek regulációjában több átfedés is van. Ez azt jelenti, hogy egy mRNS molekula degradációját párhuzamosan több miRNS is szabályozhatja, illetve egyetlen miRNS molekula egyszerre több tucat gén kifejeződését szabályozza. Mindez arra enged következtetni, hogy ezekben a tumorsejtekben párhuzamosan több apoptózist szabályozó útvonal is működhet, amelyek

azonban nem függetlenek egymástól. Ilyen apoptózis-specifikus, közös szabályozás alá eső gének a következők: *tp53inp1*, *map3k5*, *pdc4*, *sirt1*, *app*, *bbc3*, *tnfrsf21*, *sgms1*.

Hipotézisünk igazolására a fenti adatok figyelembevételével 6 miRNS-t és 9 prediktált target gént választottunk ki további elemzésre. Ezen target gének mindegyike olyan fehérjét kódol, amelyek kiemelkedő szerepet játszanak a tumorsejtek programozott sejthalálának kiváltásában. A génexpressziós vizsgálatokhoz használt mRNA minden esetben ugyanazokból a sejtekből származott, amelyeken a miRNS expressziós profil már meghatározásra került. Az mRNA expressziós mintázat meghatározását hagyományos Sybr Green alapú QRT-PCR technikával végeztük, minden esetben három ismétléssel. Az alkalmazott primereket a 1. táblázat foglalja össze. Ahogy a 16. ábrán látható az mRNA szinten tapasztalt változások mind a 9 gén esetében korrelálnak a korábban detektált miRNS expressziós eltérésekkel.



16.ábra. PUFA és TMZ kezelés hatására változást mutató mRNA és miRNA expresszió korrelációja (A: 100 μ M AA, D: 100 μ M DHA, G: 150 μ M GLA, T: 100 μ M TMZ)

5.2.5 Eredmények értékelése és diszkusszió

A különböző glioblasztóma sejtvonalak túlélésében és apoptózisában szerepet játszó szignalizációs útvonalak megismerése kulcsfontosságú új, hatékonyabb tumorellenes szerek kifejlesztéséhez. A többszörösen telítetlen zsírsavak tumortherápiában történő alkalmazására már napjainkban is vannak kísérletek, mind önálló kemoterápiás szerként, mind más gyógyszerekkel kombinálva. Kísérleteink célja olyan miRNS-ek azonosítása volt, amelyek a tumorsejtek különböző kezelésekkkel szembeni szenzitívását befolyásoló géncsaládok szabályozásáért felelősek.

A többszörösen telítetlen zsírsav molekulák (AA, GLA, DHA) által kiváltott specifikus válaszok megkülönböztetéséhez pozitív kontrollként egy már forgalomban levő kemoterápiás szert, a temozolomidot használtuk. A temozolomid miRNS expresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata lehetővé tette azon specifikus sejtválaszok elkülönítését, amelyek csak a többszörösen telítetlen zsírsavak hatására indukálódnak.

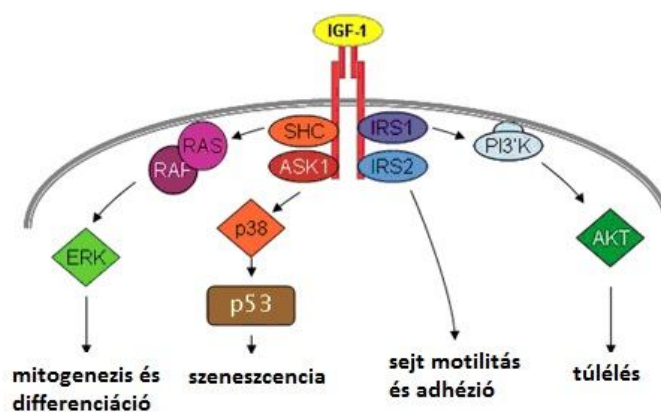
Nagy áteresztőképességű nanokapilláris QRT-PCR technikával 112 miRNS vizsgálatát végeztük el. 65 miRNS molekula esetében tudtunk relatív expresszió-változást detektálni. Ezek közt voltak olyan miR-ek, amelyek expressziója általánosan változik, azaz minden vizsgált sejtvonalban, mind a négy kezelés esetében hasonló irányú változást mutattak. Ezek közül a legszignifikánsabb változást a következők esetében tapasztaltuk: *miR-34*, *miR-25*, *miR-17*, *miR-26a*, *miR-29c*, *miR-31*, *miR-200a*, *miR-206*.

Specifikusan csak a temozolomid kezelés hatására tapasztaltunk indukciót a *miR-182*, illetve csökkent működést a *miR-183* és a *miR-16* esetében. A kezelések hatására aktiválódó válaszütvonalak különbözőségét támasztja alá az is, hogy amíg a zsírsavakkal történő kezelés hatására a *miR-143* és a *miR-20b* kifejeződése nagymértékben megváltozik, addig temozolomid kezelést követően expressziójuk változatlan.

A kezelésekre adott válaszok különbözősége mellett, olyan változásokat is tapasztaltunk, amelyek a különböző sejtvonalakban eltérően működő szignalizációs útvonalakról ad információt. Ilyen útvonalak szabályozásában játszhat szerepet a *miR-132*, *miR-140-3* és a *miR-323*. Mindhárom miRNS esetében nagymértékű overexpressziót tapasztaltunk minden alkalmazott kezelés hatására, azonban ez a változás csak az U373 sejtek esetében volt megfigyelhető. Ehhez hasonló sejtvonal specifikus választ tapasztaltunk a *miR-125b* és a *miR-206* esetében is.

A miRNS expressziós eredmények megerősítéséhez olyan gének vizsgálatát is elvégeztük, amelyek a kísérleteink során változást mutató miR-ek célszekvenciáiként ismertek. Kilenc olyan apoptotikus gént sikerült detektálni, melyek expresszió-változása ellentétes irányú a szabályozó miR esetében észlelt változással. Ezek a következők: *irs1*, *irs2*, *cox2*, *ccnd1*, *sirt1*, *tp53inp1*, *itgb3*, *kras* és a *bcl2*.

Az inzulin receptor szubsztrát 1 (*irs1*) és az inzulin receptor szubsztrát 2 (*irs2*) gének bár rendkívül hasonló funkciót töltenek be, mégis különböző miRNS-ek szabályozása alatt állnak. Míg előbbi kifejeződésének egyik legfőbb regulátora a *miR-145*, addig utóbbi szintjét elsősorban a *miR-30c* szintje szabályozza. Mindkét gén terméke kulcsszerepet tölt be az inzulin receptorokhoz érkező jelek továbbításában, ezáltal olyan intracelluláris szignalizációs folyamatokban vesznek részt, mint a P13K, a IGF-1R vagy a MAP-kináz útvonal (17.ábra).



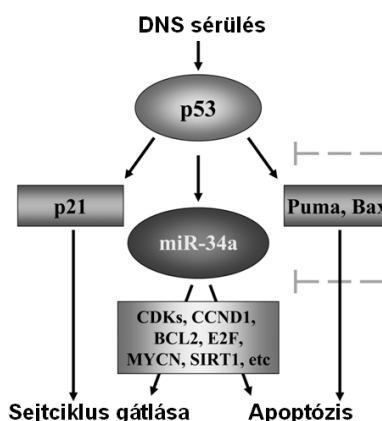
17.ábra.IGF-1R szignál transzdukciós útvonal főbb lépései

ASK1: apoptózis szignál-reguláló kináz 1; ERK: extracelluláris szignál-regulált kináz; IGF-1: inzulin-szerű növekedési faktor 1; PI3K: foszfoinozítid-3-kináz; SHC: SRC-homológ és collagen-like; AKT: protein kináz B.

Az IGF-1R szignáltranszdukciós rendszer jelentőségét olyan sejttípusokban sikerült már igazolni, mint az oszteoblasztok, melanoma sejtek, illetve szív és idegsejtek. A kaszkád folyamat, amelyet az IGF-1 receptor aktivációja indít el olyan alapvető mechanizmusok szabályozásáért felelős, mint a sejtprolifерáció, differenciáció, migráció és az apoptózis (63). Az IGF-1R, illetve a PI3K útvonalak működését korábban is vizsgálták már tumorsejtekben (64). Glioblasztóma sejtvonalakban azt tapasztalták, hogy számos olyan gén rendkívül kis hatékonysággal, vagy egyáltalán nem működik, amelyek nélkülözhetetlenek ezen kaszkádok

működéséhez. Ilyen gének például az *irs1*, *irs2*, *akt2*, *akt3* és a *pdgfra* is. Kísérleteink során mindkét insulin receptor szubsztrát gén esetében nagyfokú indukciót észleltünk, mind a temozolomiddal, mind a többszörösen telítetlen zsírsavakkal történő kezelések hatására. Ez feltehetően annak köszönhető, hogy a kezelés hatására az *irs1* és *irs2* kifejeződését gátló miRNS-ek expressziója lecsökken, ezáltal pedig olyan útvonalak léphetnek működésbe, amelyek a tumorsejtek apoptózisához vezetnek.

AA és DHA kezelést követően mindhárom sejtvonalban szignifikánsan csökkent a ciklin D1 (*ccnd1*) gén működése. A ciklin D1 protein a G1-fázison keresztül szabályozza a sejtciklust. A vad típusú protein félélet-ideje rendkívül rövid, egészséges sejtekben a növekedési faktorok által irányított expressziója mindössze a G1-fázisban figyelhető meg, tumorokban azonban szinte minden esetben fokozott expressziója figyelhető meg. A ciklin D1 miRNS szinten történő szabályozását vizsgálták Zenz és munkatársai leukémia sejtekben (65). Azt tapasztalták, hogy amennyiben a sejtek DNS állománya sérül, ez a *tp53* aktivációján keresztül apoptotikus folyamatok beindulását eredményezi. Ezen folyamatok egyik fő szabályozójaként azonosították a *miR-34c* molekulát, melynek expressziója jelentősen megnő, ez pedig a *ccnd1* és más sejtciklus szabályozó gének csökkent működéséhez vezet (18.ábra).

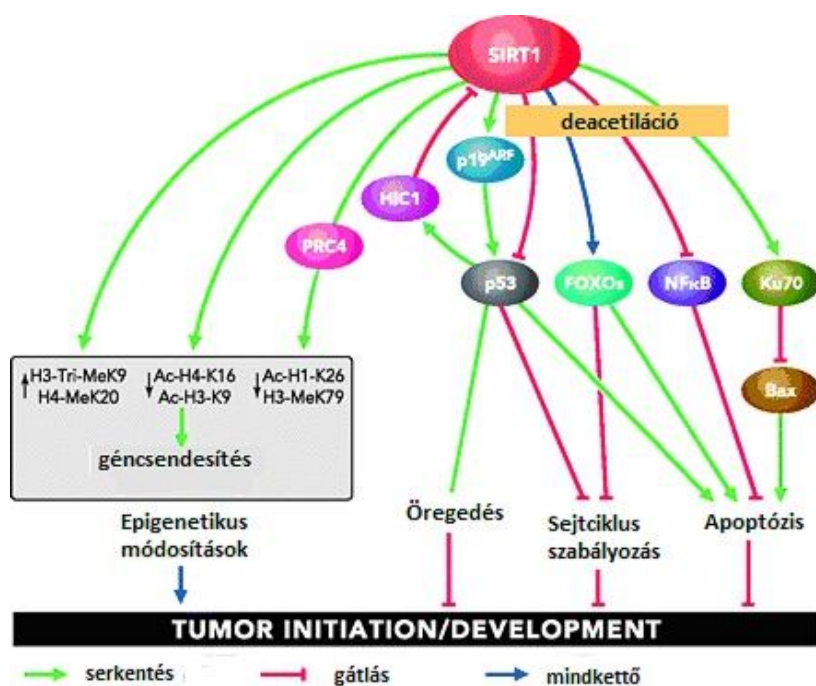


18.ábra. A p53/miR-34 hálózat működése tumorsejtekben

Egy nemrégiben megjelent tanulmányban glioblasztóma sejtek túlélését vizsgálták a *ccnd1* gén csendesítését követően (66). Ezekben a sejtekben a ciklin D1 termelésének megszüntetésével, így a sejtprolifерáció gátlásával párhuzamosan effektor kaspázok fokozott termelését tapasztalták, ami apoptózishoz vezetett. A *ccnd1* gén transzkripcióját a

miR-34a mellett a *miR-20b* is szabályozza. Vizsgálataink során mind AA, mind DHA kezelést követően azt tapasztaltuk, hogy mindkét miRNS szintje megnő, ezzel párhuzamosan a *ccnd1* expressziója pedig lecsökken, ami a sejtsztódás gátlását eredményezi. Mindez arra utal, hogy a *ccnd1* illetve a szabályozásáért felelős miRNS-ek egy új terápiás célpontot jelenthetnek az agytumорок kezelése során.

A sirtuin 1 (*sirt1*) gén egy olyan protein deacetilázt kódol, amely kulcsszerepet játszik számos apoptotikus, oxidatív stressz és differenciációs folyamatban (19. ábra). Többek közt olyan apoptotikus gének szabályozásában vesz részt, mint a *bax*, a *tp53* vagy az *nfkb* (67, 68). A kezelések során kivétel nélkül minden esetben csökkenő expressziót mutató *miR-22* szabályozása alatt álló *sirt1* is része annak a *tp53* indukción alapuló hálózatnak, amely szerepet játszik a glióma sejtek programozott sejthalálában.



19.ábra. A sirtuin 1 által szabályozott folyamatok tumorsejtekben

A sejthalált gátló és a membránpermeabilitást szabályozó proteincsaládba tartoznak a BCL2 típusú fehérjék. Ezen proteinek nem csak az apoptózis beindulását gátolják, de néhányuk a már elindult folyamatot is leállíthatja. Alapállapotban a BCL2 fehérjék a mitokondriumok külső falában gátolják a citokróm c kiáramlást egy ioncsatornára hatva.

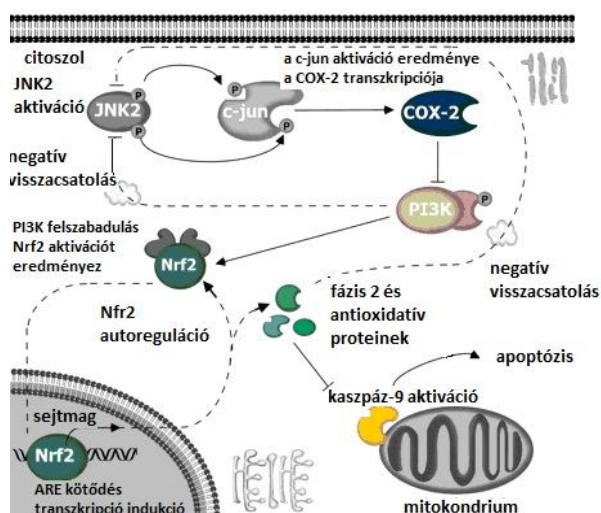
Sejtkárosodás hatására a pro-apoptotikus BAX protein gátolja a BCL2-t, így felszabadul a citokróm-c, az APOF1 proteinhez kapcsolódva apoptoszómákat képez, melyek kaszpázok aktiválásán keresztül elindítják az apoptózist (69). A kezelés hatására minden esetben az anti-apoptotikus hatású *bcl2* expressziójának növekedését tapasztaltuk, melynek funkciója így tisztázatlan ezekben a sejtekben. Valószínűsíthető, hogy olyan útvonalak aktiválódtak, amelyek a *bcl2*-független apoptózis indukcióját eredményezték.

A *tp53inp1* gén két olyan stressz hatására indukálódó proteint kódol, amelyek minden tumorsejtben megtalálhatóak. Elsősorban a sejtosztódás G1 fázisban történő leállításában, illetve a TP53-mediált apoptózis indukciójában játszik szerepet. Ennek ellenére irodalmi adatok mutatnak arra is, hogy a *tp53inp1* expresszió-változása prognosztizálhatja a betegség kimenetelét és a megnövekedett expresszió többnyire együttjár a tumor terjedésével, illetve a betegség különösen agresszív lefolyásával (70). Prostatatumor különböző kemoterápiás szerekekkel történő kezelése során kimutatták, hogy azok az anyagok, amelyek a *tp53inp1* represszióját eredményezték sokkal hatásosabbnak bizonyultak, illetve alkalmazásukat követően szignifikánsan alacsonyabb volt a daganat kiújulásának lehetősége. Eredményeink szerint a klinikai gyakorlatban is alkalmazott TMZ kezelés során nem, illetve csak kis mértékben csökkent a *tp53inp1* szintje. Ezzel szemben két többszörösen telítetlen zsírsav, a DHA és az AA esetében azt tapasztaltuk, hogy alkalmazásuk során nagymértékben csökken a *tp53inp* kifejeződése. Mind ezek az eredmények, mint a korábban végzett vizsgálatok felvetik annak lehetőségét, hogy a *tp53inp1* és szabályozó molekulái potenciális targetként szerepelhetnek egy új tumorellenes anyag fejlesztése során.

Az integrin béta 3 (*itgb3*) génje egy olyan sejt felszíni proteint kódol, amely az extracelluláris stimulusokra adott sejtválaszban játszik szerepet. Tumorokban betöltött szerepét számos daganattípus esetén vizsgálták már és expresszió-változását több esetben is sikerült összefüggésbe hozni a tumorsejtek kemoterápiás szerekekkel szembeni érzékenységeivel. Egy 2011-ben megjelent tanulmányban (71) koreai kutatók glioblasztóma sejtek BCNU (1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea) kezelést követő génexpressziós változásait vizsgálták. Azt tapasztalták, hogy míg a BCNU-rezisztens sejtekben az *itgb3* gén rendkívül alacsony szinten expresszálódik, addig a kezelésre érzékenyek esetében nagy mennyiségű *itgb3* mRNS-t sikerült kimutatni. Mindez igazolja az integrin-mediált apoptózist

útvonal működését és az *itgb3* pro-apoptotikus szerepét ezekben a sejtekben. Ezt az elméletet támasztják alá eredményeink is. A TMZ, a DHA és a GLA kezelés hatására is jelentősen megnövekedett a tumorsejtek *itgb3* szintje, míg az ezt szabályozó *miR-30c* esetében 6-8-szoros csökkenést tapasztaltunk a kontroll sejtekhez képest.

Mind a zsírsavak, mind a TMZ kezelés esetében nagymértékben megnőtt a ciklooxygenáz 2 (*cox-2*) expressziója is. A ciklooxygenázok olyan membránköthött hem tartalmú glikoproteinek, amelyek az arachidonsavak prosztaglandinná történő átalakítását katalizálják (72). A *cox-2* megnövekedett expressziója a JNK2/c-jun szignáltranszdukciós útvonalon keresztül a prosztaglandinok felhalmozódását eredményezi, ami a P13-K és az *nrf2* aktivitás csökkentésével oxidatív stresszhez, a kaszpáz-9 aktivációjához és apoptózishoz vezet (20. ábra). Eredményeink alapján többek közt ennek a *cox-2* mediált apoptózisnak köszönhető az alkalmazott kezelések tumorelles hatása.



20.ábra. A COX-2 szerepe az apoptózis szabályozásban

Az általunk vizsgált egyetlen nem apoptotikus gén a *k-ras* (kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog). Ez egy olyan GTPáz fehérjét (KRAS) kódol, ami molekuláris kapcsolóként működik és aktivált állapotban olyan receptorokhoz érkező szignálok továbbításáért felelős, mint a c-RAF, az EGFR vagy a PDGFRA. A *kras* gén daganatsejtekben betöltött szerepét elsőként vastagbél tumorok esetében vizsgálták. Kimutatták, hogy ezekben a daganatokban rendkívül gyakran a *kras* egy mutáns formája van jelen, ami a GTPáz aktivitás folyamatos működését eredményezi (73). Az ilyen KRAS

mutáns proteint termelő daganatok esetében a hagyományos EGFR-gátláson alapuló kemoterápia teljesen hatástalan, sőt ronthatja a túlélést, így a *kras* biomarkerként használható a megfelelő terápia kiválasztásához (74). Agytumorokban a Ras szignalizációs útvonal hasonló működését, illetve a *kras* overexpresszióját is megfigyelték már (75), arra vonatkozóan azonban még nincs adat, hogy a különböző glioblasztóma ellenes kezelések hatására hogyan változik meg a gén kifejeződése. Kísérleteink során mind a TMZ, mind a zsírsavak hatására rendkívül magas indukciót tapasztaltunk a *kras* gén, illetve nagymértékű repressziót az ezt szabályozó *miR-143* esetében.

Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a többszörösen telítetlen zsírsavakkal történő kezelés hatására számos olyan miRNS és mRNS expressziója megváltozik, amelyeket valamely apoptotikus útvonal szereplőjeként már korábban azonosítottak. Bebizonyítottuk azt is, hogy az általunk alkalmazott többszörösen telítetlen zsírsavak a temozolomidhoz hasonló hatást fejtenek ki, azaz olyan génexpressziós változásokat indukálnak glioblasztóma sejtekben, amelyek azok pusztulásához vezetnek.

5.3 Többszörösen telítetlen zsírsavak mRNS és miRNS expresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata patkányokon

A többszörösen telítetlen zsírsavak jótékony hatását klinikai vizsgálatok igazolták kardiovaszkuláris, gyulladásos, illetve daganatos megbetegedések esetén. Ennek ellenére még a mai napig nem teljesen ismertek azok a molekuláris folyamatok, illetve gének sem, amelyekre a többszörösen telítetlen zsírsavak egészséges szövetben is hatást gyakorolnak. Kísérleteink során többszörösen telítetlen zsírsavakkal (EPA, DHA, DPA) etetett patkányokban vizsgáltuk azon molekuláris változásokat, amelyek vélhetően összefüggésben állnak ezzel a speciális étrenddel. Az állatokat 4 csoportra osztottuk és minden csoportot két hétig egy adott zsírsavval, illetve a kontrollként használt étolajjal kiegészített táppal etettünk (100 mg PUFA/ nap). Két hét után az állatokat termináltuk és az eltávolított szív és májszövetből meghatároztuk az mRNS és miRNS szinten bekövetkezett változásokat. A négy vizsgálati csoportban csoportonként 5, összesen 20 állatot vizsgáltunk.

5.3.1 PUFA-tartalmú étrend hatása miRNS expresszióra

Első lépésben 112 miRNS molekula PUFA kezelés hatására bekövetkező expressziós változásait vizsgáltuk nagy áteresztőképességű nanokapilláris QRT-PCR technikával. A kezelések hatására a 112 vizsgált miRNS molekula közül 54 mutatott szignifikáns változást. Az értékelés során csak azokat az eredményeket vettük figyelembe, amelyeknél a Ct értékek 26 alatt maradtak, mivel efölött az OpenArray módszer megbízhatósága és reprodukálhatósága nagymértékben lecsökken, illetve az ismételt futások közti szórás magas. A kísérleti csoportok között szignifikáns expressziós eltérést mutató miRNS-ek azonosítására Student's t tesztet végeztünk. A teljes miRNS panel vizsgálatát tartalmazó eredményeket az 2. kiegészítő táblázat tartalmazza.

Az OpenArray adatok alapján 8 szignifikánsan magas vagy alacsony expressziós szintet mutató miRNS-t választottunk ki további validálásra. Ezek expresszió-változását TaqMan alapú QRT-PCR technikával vizsgáltuk, ugyanazokból az RNS mintákból kiindulva, amelyeket a nanokapilláris reakciók során is használtunk. Az OpenArray adatoknak megfelelően mind a 8 vizsgált miRNS esetében sikerült megerősíteni az expresszió-változást a kontroll mintákhoz képest.

5.3.2 PUFA-tartalmú étrend hatása mRNS expresszióra

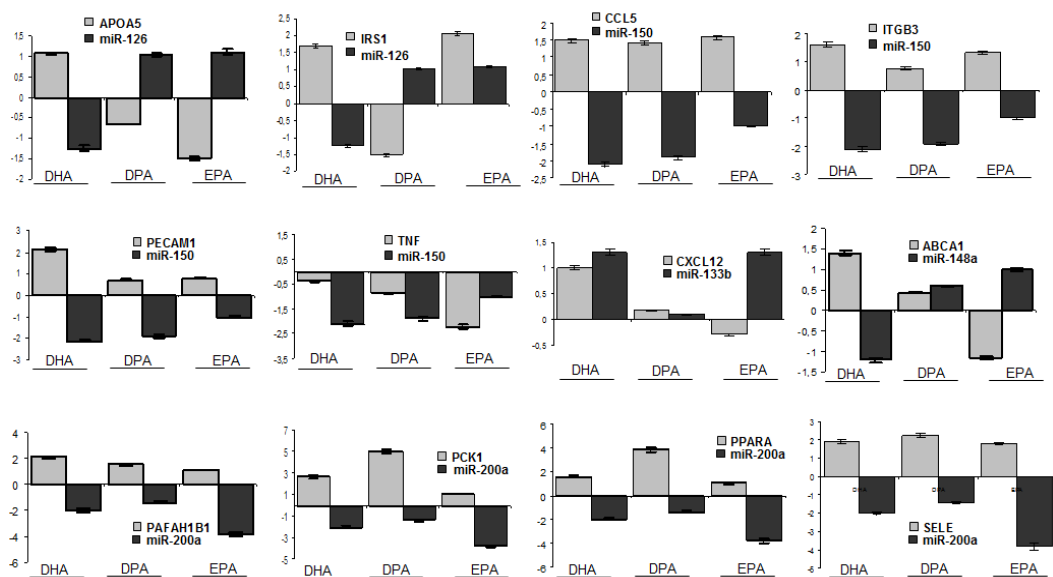
A változást mutató miRNS-ek funkciójának megértéséhez elengedhetetlen a potenciális cél mRNS-ek bioinformatikai módszerekkel történő azonosítása. A target gének kiválasztása során a legszélesebb körben alkalmazott miRNS adatbázisok eredményeit vettük figyelembe. Így a potenciális targetek azonosítására a miRBase Targets és a miRó adatbázisokat alkalmazzuk. Az adatbázisok segítségével a szignifikánsan változó miRNS-ek összes potenciális cél mRNS-ét azonosítottuk. A továbbiakban ezt a listát szövet-, illetve folyamatspecifikusan szűkítettük, elsősorban azokra a génekre koncentrálva, amelyek oxidatív stresszben, zsírsavak transzportjában, illetve gyógyszermolekulákra adott válasz kiváltásában játszanak szerepet (10.táblázat). Ezzel a megközelítéssel a cél mRNS-ek számát végül 30-ra csökkentettük. Expresszió-változásukat QRT-PCR technikával vizsgáltuk. Az eredmények normalizálásához a széles körben alkalmazott *gapdh* kontrollgént alkalmazzuk, amelynek expressziós értékei a különböző csoportok között rendkívül alacsony szórást mutattak.

		Szabályozó miRNS		Célgén
SZÍV	Betegségek	koronáriabetegségek	miR-126, miR-148a, miR-150	APOA5, ITGB3, PECAM1
		hipertenzió	miR-133b	LEPR
		miokardiális infarktus	miR-133b	INSR, SELP, CXCL12, LPL
		atherosclerosis	miR-148a, miR-200a, miR-205	ESR1, PPARA, PAFAH1B1, VEGFA
		magas triglicerid	miR-148a, miR-200a	ABCA1, SELE, PCK1
	Folyamatok	apoptózis	miR-200a	BAG5
		anti-apoptózis	miR-24	PIM2
		oxidatív stressz	miR-107	GPX3
		angiogenezis	miR-148a	EP300, ACVR1
		gyógyszerválasz	miR-150	CCL5
MÁJ	Betegségek	hepatitis B	miR-148a	ESR1
		hepatitis C	miR-21	FAS
		magas triglicerid	miR-126	APOA5
		cirrózis	miR-126, miR-107	IRS1, GPX1
		bilirubin cholelithiázis	miR-21	FAS
	Folyamatok	gyógyszerválasz	miR-107	ACOX1
		gyulladás	miR-133b	CXCL12
		lipoprotein transzport	miR-200a	APOL2
		lipid metabolizmus	miR-133b, miR-107	SGMS2, ACOX1, LYPLA3

10.táblázat. PUFA kezelés hatására változást mutató miRNS célgénjeinek listája

5.3.3 Értékelés és diszkusszió – szívszövet

A szívszövetben szignifikáns eltérést mutató miRNS-ek közül ötöt (*miR-126*, *miR-133b*, *miR-148a*, *miR-150*, *miR-200a*) választottunk ki további validálás céljából. A miRNS expressziós eredmények megerősítéséhez olyan gének vizsgálatát végeztük el, amelyek a kísérleteink során változást mutató miR-ek célpontjaiként ismertek. Ennek során tizenkét olyan gént sikerült detektálni, melyek expresszió változása ellentétes irányú az ezeket szabályozó miRNS esetében észlelt változással (21.ábra).



21. ábra. Génexpressziós változások a szívben PUFA-tartalmú étrend hatására.

Az ábra a 12 gén expressziós változásait („fold change”) mutatja, az ezeket szabályozó miRNS-ekkel korrelálva a különböző kezelések esetében.

Rendkívül hasonló expresszió-változást detektáltunk a *miR-126* és a *miR-148a* esetében. Míg DPA és EPA kezelés hatására mindkét miRNS esetében indukciót tapasztaltunk, addig a DHA-tartalmú étrenden tartott állatok esetében jelentősen lecsökkent ezek termelődése a szívszövetben. A *miR-126* egy kizárólag endotél sejtekben expresszálódó miRNS molekula, amely mind a kapillárisokban, mind a nagyobb erekben rendkívül nagy mennyiségben expresszálódik, ezáltal kulcsszerepet játszik az angiogenezist szabályozó molekuláris folyamatokban (76). Ismert célmolekulái közé tartoznak olyan szignáltranszdukciós és sejtciklus szabályozó gének, mint az *irs1*, *crk*, *apoa5*, *tom1* valamint a *vegfa* (77). Represszióját számos patológiás folyamatban megfigyelték már, úgy mint 2-es típusú diabétesz, miokardiális infarktus, illetve különböző daganatos betegségek: tüdő-, prosztata-, húgyhólyag- és vastagbélrák esetében is (78). Mivel két különböző zsírsav kezelés hatására is expressziójának jelentős növekedését tapasztaltunk, így megvizsgáltuk két – a *miR-126* szabályozása alá eső – gén működését is: ezek a már korábban tárgyalt inzulin receptor szubsztrát 1 (*irs1*) és az apolipoprotein A-V (*apoa5*). Az *apoa5* gén egy olyan apolipoproteint kódol, amely meghatározó szerepet játszik a plazma triglicerid szintjének szabályozásában, ezáltal rendellenes működése növeli a koronáriabetegségek kialakulásának kockázatát. Eredményeink alapján a többszörösen telítetlen zsírsavakban gazdag diéta

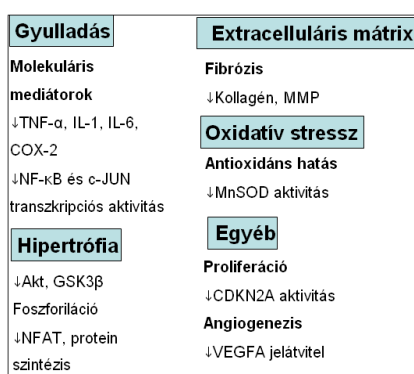
nagymértékben csökkenti termelődését. Míg az *apoa5* mRNS szintjének változása teljes mértékben korrelált a *miR-126* expressziójának változásaival, addig az *irs1* esetében ezt csak DHA és DPA kezelés esetén sikerült igazolni.

A *miR-148a* szabályozó szerepéről a mai napig rendkívül kevés információ áll rendelkezésre. Vizsgálataink során eltérő expressziót mutatott a különböző zsírsavak alkalmazása során. Míg EPA kezelés hatására kifejeződése közel négyszeresére nőtt, addig a DHA kezelés esetében expressziója hasonló arányban csökkent a kontroll mintákhoz viszonyítva. Mivel sem funkciója, sem mRNS célpontjai nem ismertek, így eredményeink validálására az *abca1* gént használtunk, amely az általunk alkalmazott predikciós algoritmusok mindegyike szerint a *miR-148a* lehetséges célmolekulája. Eredményeink is ezt az elméletet igazolták, mivel az *abca1* expresszió-változása mindkét kezelés esetében korrelált a *miR-148a* szintjének változásával.

A *miR-133b* eddigi vizsgálatok eredményei alapján csak izomszövetekben expresszálódik, ennek ellenére számos nem-izomeredetű gén regulációját végzi. Validált targetjei közé tartoznak a *hcn2*, valamint a *kcnq1* kálium csatorna gének, illetve a *cxcl12* is (79). Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy myokardiális infaktus következtében, a *miR-133b* szintje nagymértékben lecsökken, amely összefüggésben áll az ezáltal szabályozott feszültségfüggő kálium csatorna gének expressziójának növekedésével (80). Kísérleteink során a *miR-133b* volt az egyetlen olyan miRNS a szívben, amely mindhárom PUFA kezelés hatására overexpresszált állapotba került. Mindez alátámasztja azt az elméletet, miszerint a többszörösen telítetlen zsírsavak kardioprotektív hatásúak lehetnek. Eredményeink igazolására egy már validált target, a *cxcl12* gén működését vizsgáltuk, melynek expresszióváltozása azonban nem minden esetben korrelált a *miR-133b* esetén detektált csökkenéssel. Ennek magyarázata lehet, hogy a *cxcl12* számos más miRNS szabályozása alatt is áll, illetve, hogy ennek a génnek vélhetően nincs kardioprotektív szerepe, így a szívben detektált expresszióváltozása független a PUFA kezeléstől.

A *miR-200a* egyike volt a legnagyobb mértékű változást mutató miRNS-eknek, annak ellenére, hogy a szív működésben betöltött szerepéről nem áll rendelkezésre információ. Az 1. kromoszómán elhelyezkedő gén expresszió-változását eddig elsősorban különböző daganatos megbetegedések során észlelték, mint például melanóma, tüdő-, hasnyálmirigy-, gyomor-, illetve prosztatarák. Ezekben kivétel nélkül azt tapasztalták, hogy a

megnövekedett *miR-200a* expresszió metasztázisok képződését prediktálja (81). A *mir-200a* kísérleteink során mindhárom PUFA kezelés hatására represszált állapotba került, ezzel párhuzamosan pedig a szabályozása alá eső gének közül 4 működésében észleltünk szignifikáns indukciót. Ezek közül is kiemelkedő jelentőségű lehet a *sele* és a sejtmagi receptorok közé tartozó *ppara*. Az E-selectin (*sele*) egy olyan sejtadhéziós molekula, amely kizárólag endothél sejtekben expresszálódik és elsősorban gyulladásos folyamatokban játszik szerepet. Ezenkívül a szérumban mért koncentrációja alapján markerként használható atherosclerosis, magas vérnyomás, illetve koronáriabetegségek kimenetelének előrejelzésére is (82). A *ppara* egy olyan transzkripciós faktor receptort kódol, amely kulcsszerepet játszik a lipid metabolizmusban. Közreműködésével olyan gének aktiválódnak, amelyek a mitokondriális β -oxidáció folyamatán keresztül elősegítik a zsírsavak felvételét, hasznosítását és lebontását (83). Bár a *ppara* szerepe elsősorban a májban jelentős, az utóbbi években fény derült a szívben betöltött extrametabolikus funkcióira is, úgy mint a szívizomban zajló gyulladásos folyamatok, illetve az oxidatív stressz (22.ábra).



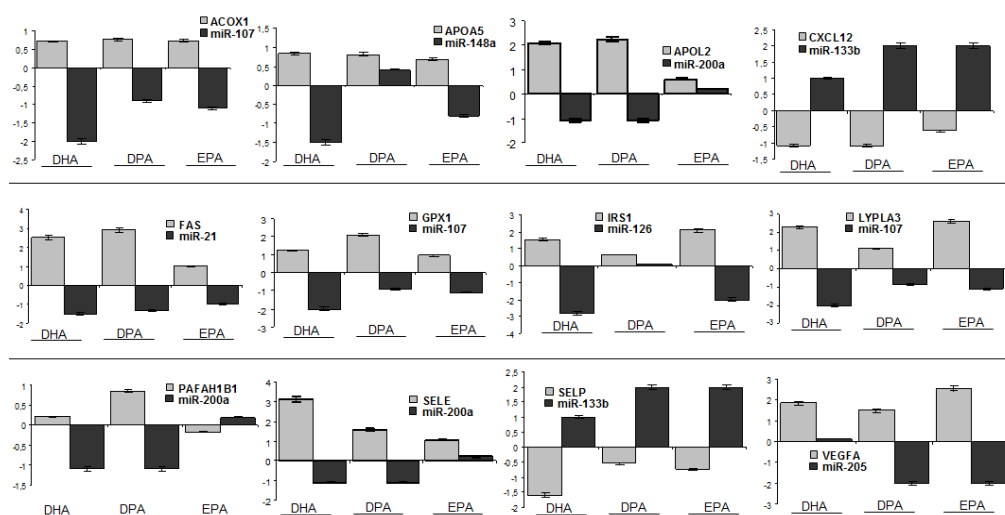
22.ábra. PPAR által szabályozott nem-metabolikus folyamatok összefoglalása

A *miR-200a*-hoz hasonlóan mindhárom zsírsav kezelés esetében repressziót figyeltünk meg a *miR-150* esetében is. A *miR-150* számos olyan gént regulációját végzi, amelyek szerepet játszanak az őssejtek differenciálódásában, illetve megakariociták keletkezésének szabályozásában. Expresszióváltozását megfigyelték már melanóma, limfóma és hepatocelluláris karcinóma sejtekben is, de a legnagyobb, több mint ötvenszeres indukciót osteosarcoma sejtek esetében detektálták (84). Szívben betöltött szerepét még nem vizsgálták, azonban myocardialis infarktuson átesett páciensek esetében azt tapasztalták,

hogyan expressziója jelentősen megnő (85). A zsírsavak hatására tapasztalt represszió igazolásához négy potenciális mRNS targetet teszteltünk le, melyek közül háromnál az eredmények minden kezelés esetében korreláltak. Az *itgb3* (*cd61*) és a *pecam1* (*cd31*) gének olyan fehérjéket kódolnak, amelyeknek különböző szignáltranszdukciós folyamatok mediálása révén, többek közt az angiogenezis szabályozásában játszanak szerepet. Mindkét gén esetében szignifikáns overexpressziót tapasztaltunk az olajsavval etetett állatokhoz képest. Megvizsgáltuk a hasonlóságkereső algoritmusok alapján szintén a *miR-150* szabályozása alá eső *tnf* expresszióját is. Kísérleteink során ez volt az egyetlen olyan vizsgált gén, ahol a mRNS szinten mért változások egyetlen kezelés esetében sem korreláltak a szabályozó miRNS esetében mért adatokkal.

5.3.4 Értékelés és diszkusszió – májszövet

A májszövetben szignifikáns változást mutató miRNS-ek közül hetet (*miR-21*, *miR-107*, *miR-126*, *miR-133b*, *miR-148a*, *miR-200a*, *miR-205*) választottunk ki további validálás céljából. A szívhez hasonlóan itt is minden esetben sikerült megerősíteni az expresszió-változást. A miR expressziós eredmények igazolására olyan gének vizsgálatát is elvégeztük, amelyek a kísérleteink során változást mutató miR-ek célpontjaiként ismertek. Ennek során tizenkét olyan gént sikerült detektálni, melyek expresszió-változása ellentétes irányú az ezeket szabályozó miRNS esetében észlelt változással (23.ábra).



23. ábra. Génexpressziós változások a májban PUFA-tartalmú étrend hatására.

Az ábra a 12 gén expressziós változásait („fold change”) mutatja, az ezeket szabályozó miRNS-ekkel korrelálva a különböző kezelések esetében.

A szívszövethez hasonlóan itt is jelentős változást tapasztaltunk a *miR-126*, a *miR-133b*, a *miR-148a* és a *miR-200a* esetében. Míg a szívszövetben a *miR-126* és a *miR-148a* expressziója szignifikánsan megnőtt, addig a májban minden esetben nagymértékű csökkenést tapasztaltunk. Az eredményekkel tökéletesen korrelál az ezen két miRNS közös szabályozása alatt álló *apoa5* esetében detektált indukció is. Míg a szívben detektált *apoa5* szint csökkenés egyértelmű bizonyítéka a többszörösen telítetlen zsírsavak kardioprotektív hatásának, addig irodalmi adatok alapján az itt mért apolipoprotein indukció szintén pozitívan befolyásolja a májműködést. Apolipoproteinek expressziós változását vizsgáló tanulmányok kimutatták, hogy a májsejtek rendkívül jó regenerációs képessége részben a májsérülést követő első néhány órában zajló apolipoprotein-A-V indukciónak köszönhető (86).

A legnagyobb mértékű indukciót, a szívhez hasonlóan itt is a *miR-133b* esetében észleltük. Overexpressziója drasztikus csökkenést eredményezett a máj P-szelektin (*sele*) szintjében, különösen a DHA-val etetett állatok esetében. A P-szelektin (CD62) egy olyan adhéziós membránprotein mely csak az aktivált trombociták és endotelsejtek felszínén jelenik meg. A trombocitákban a P-szelektint az alfa-granulumok tartalmazzák, melyek degranulációjának eredményeként expresszálódik a felszínen. A PUFA diéta hatására tapasztalt pozitív változások közé sorolható a *sele* repressziója is, hiszen a P-szelektin normális körülmények között csak igen kis mennyiségben mutatható ki a vérlemezkék felszínén. Megnövekedett expressziója általában valamilyen gyulladásos folyamatra, cirrózisra vagy daganatra utal (87).

Mind a szív, mind a májszövetben erősen represszált állapotba került a *miR-200a*, amely számos, a lipid metabolizmusban, illetve transzportban szerepet játszó gén szabályozását végzi. A gyulladásos folyamatok markereként is használt *sele* DHA és DPA kezelés esetén is overexpresszált állapotba került, korrelálva a miRNS szinten mért változásokkal. A zsírsavak transzportját végző apolipoprotein L2 (*apol2*) esetében közel 6-szoros különbséget detektáltunk a PUFA-tartalmú diétán és a kontroll (olajsavval etetett) állatok közt. Az *apol2* szerepéről a mai napig rendkívül kevés információ áll rendelkezésre. Globális génexpressziós vizsgálatok kimutatták, hogy legnagyobb mennyiségben a tüdőben, a pancreasban és az agyban van jelen (88). Eredményeink alapján az *apol2*, olyan lipid

transzport folyamatokban játszik kulcsszerepet, amelyek specifikusan a többszörösen telítetlen zsírsavak szállításában, illetve lebontásában alapvető fontosságúak.

A *miR-107* esetében tapasztaltuk a legnagyobb mértékű repressziót mindhárom kezelés során. Repressziója mellett megfigyelhető volt a szabályozása alatt álló lizofoszfolipáz A3 (*lypla3*) indukciója is. A *lypla3* egy olyan proteint kódol, amely a vérplazmában HDL-hez kötődve, a lizofoszfátidilkolin átalakítását végzi. Magas zsírsav tartalmú étrend esetén, koncentrációjának hirtelen emelkedését már korábban is megfigyelték, mind máj, mind zsírszövetben. Ez felveti annak lehetőségét, hogy funkciója nem csak a zsírsavak lebontása, hanem azok tárolásának regulációja is (89). Szintén a *miR-107* szabályozása alatt áll az *acox1* is, amely a zsírsavak β -oxidációjának első lépését katalizáló peroxisomális acil-KoA oxidáz 1 enzimet kódolja. Mint a zsírsavlebontás egyik kulcsenzime, expressziójának növekedése elengedhetetlen a magas zsírsav tartalmú étrend hatására, ami egyben igazolja a miRNS szinten detektált eredményeinket is.

Ugyancsak mindhárom zsírsav kezelés esetében represszált állapotba került a *miR-21* és a *miR-221*, illetve ezzel párhuzamosan indukciót detekáltunk az ezek által regulált *fas* esetében. A *miR-21* az egyik legtöbbet tanulmányozott miRNS, amelynek indukcióját összefüggésbe hozták már koronáriabetegségek, miokardiális infarktus, májcirrózis, illetve hepatocelluláris karcinóma kialakulásával is (90, 91). Mivel validált célpontjai között számos tumorszupresszor gén szerepel, így a miRNS alapú gyógyszerkutatásnak is egyik fő célpontja lett. Így a többszörösen telítetlen zsírsavak jótékony hatását támasztja alá az is, hogy az olajsavval etetett állatokhoz viszonyítva, a PUFA-tartalmú étrenden tartott állatok *miR-21* szintje szignifikánsan csökkent.

Alulműködést figyeltünk meg az elsősorban a *vegfa* gén szabályozójaként ismert *miR-205* esetében is. A *vegfa* egy olyan szignál proteint kódol, amely az angiogenezis stimulálását segíti elő. Sérülések, megnövekedett fizikai aktivitás, illetve érelzáródás esetén fokozott aktivitást mutat, amely az endothél sejtek mitózist és migrációját eredményezi. A *vegfa* kísérletesen validált szabályozója a *miR-126* is, amely szintén csökkent expressziós értékeket mutatott mindhárom kezelés esetében. A *miR-205* funkciója rendkívül hasonló a már korábban tárgyalt *miR-21*-hez, mivel számos tumorszupresszor gén csökkent működéséért felelős, ezáltal indukciója daganatok kialakulását, metasztázisok képződését eredményezheti (92).

5.4 Idegsejtek jellemzése miRNS és mRNS mintázat alapján

Az idegsejtek molekuláris jellemzésének legnagyobb problémája, hogy az expressziós vizsgálatok viszonylag nagy mennyiségű mintát igényelnek, ami ritka idegsejtek esetén általában nem hozzáférhető. Ezért célunk olyan technikák optimalizálása volt, amely lehetővé teszi már egyetlen sejt génexpressziós mintázatának vizsgálatát is.

5.4.1 Idegsejtek molekuláris jellemzése: módszerfejlesztés

A sejtek, elektrofiziológiai jellemzők (tüzelési mintázat) alapján történő csoportosítását Dr. Tamás Gábor és csoportja végezte patch clamp technikával (93). A karakterizálást követően a citoplazmát sejtenként elkülönítve gyűjtötték le. Az így kapott sejtextraktumok RNS tartalmának reverz transzkripciójához számos protokollt teszteltünk (11.táblázat). Mivel egyetlen sejt totál RNS tartalma 0,1 pg és 1 pg közötti tartományban van, így egy kivételtől eltekintve, még a kifejezetten kis mennyiségű nukleinsav izolálásra alkalmas kitek esetében sem kaptunk pozitív eredményt. A legjobb eredményeket minden reverz transzkripció módszer esetében a közvetlen átírás, tehát az RNS tisztítási lépés elhagyása mellett kaptuk. A reverz transzkripció során random primert, poliT primert, illetve génspecifikus primereket alkalmaztunk. A leghatékosabban működő módszer a közvetlen átírás volt SuperScript III (Invitrogen) vagy CycleScript enzim (Bioneer), génspecifikus primerek és módosított pufferkoncentráció alkalmazásával. Ebben a két esetben a kapott cDNS alkalmas volt mind miRNS, mind mRNS expresszió vizsgálatára egysejt-QRT-PCR (scPCR), illetve digitális PCR (dPCR) technikával is.

cDNS átírás RNS izolálás	ABI Archive Kit	Fermentas Maxima RT	BioRad RT Supermix	Bioneer Cycle Script	Bioneer CycleScript optimalizált	Invitrogen SSIII
Epicentre ArrayPure	-	-	-	-	-	-
Ambion RNAqueous Kit	-	-	-	-	*	*
Qiagen - Rneasy Micro Kit	-	-	-	-	-	-
nincs (direkt átírás)	-	*	**	**	***	***

11.táblázat Egysejt génexpresszió vizsgálata során alkalmazott protokollok

Az egyes módszereket a reverz transzkripciót követően, minden esetben háztartási gének (*gapdh*, *hprt*, *rps18*) QRT-PCR vizsgálata alapján rangsoroltuk: -: nincs mérhető jel, *: gyenge, **: közepes, ***: jó minőségű jel.

A két fenti módszer hátránya, hogy az átírást követően rendelkezésre álló cDNS mennyiség mindössze egyetlen QRT-PCR reakcióra elegendő. Mivel a ritkább interneuronok gyűjtése rendkívül időigényes, így a következő lépésben olyan preamplifikációs protokollokat teszteltünk, amelyek lehetővé teszik több, akár 20-100 gén vizsgálatát is egyetlen sejten. Ahogy a 24. ábrán látható, a preamplifikáció alkalmazásával a párhuzamosan vizsgálható gének száma mellett a fluoreszcens jel intenziása is megnőtt.



24.ábra Rps18 gén expressziójának vizsgálata piramissejtekben QRT-PCR technikával.

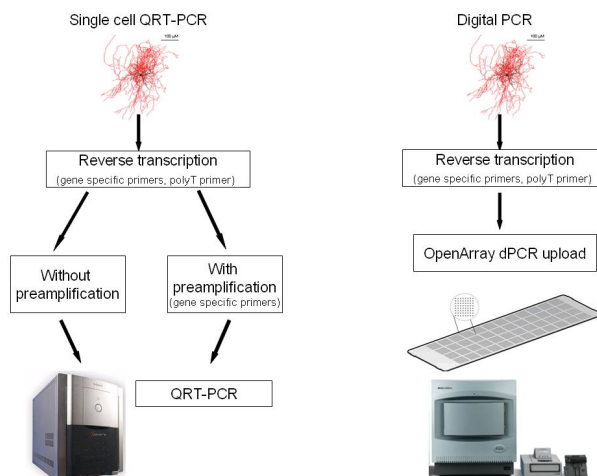
A. Piramissejt *rps18* expresszió.

B. Piramissejt *rps18* expresszió 14 ciklus preamplifikációt követően.

A legoptimálisabban működő preamplifikációs protokollt a ciklusszám és az alkalmazott primerek számának változtatása mellett választottuk ki. Azt tapasztaltuk, hogy egyetlen sejten párhuzamosan legfeljebb 20 gén, illetve miRNS vizsgálható, mivel előlött már jelentősen megnő a próbák közti kereszthibridizáció esélye, ezáltal az eredmények megbízhatósága csökken.

Az interneuronok expressziós mintázatainak tanulmányozására első lépésben minden esetben scPCR technikát alkalmaztunk, majd ezt követően a szignifikánsan változó gének vizsgálatát a QRT-PCR-nél jóval érzékenyebb digitális PCR-rel végeztük (25.ábra). Az scPCR és a dPCR vizsgálatok során minden esetben 5-12 biológiai párhuzamost futtattunk és ezek eredményeiből számítottuk ki az átlag Ct, átlag kópiaszám, valamint a szórás értékeket. Technikai párhuzamosok futtatására csak azokban az esetekben volt lehetőség

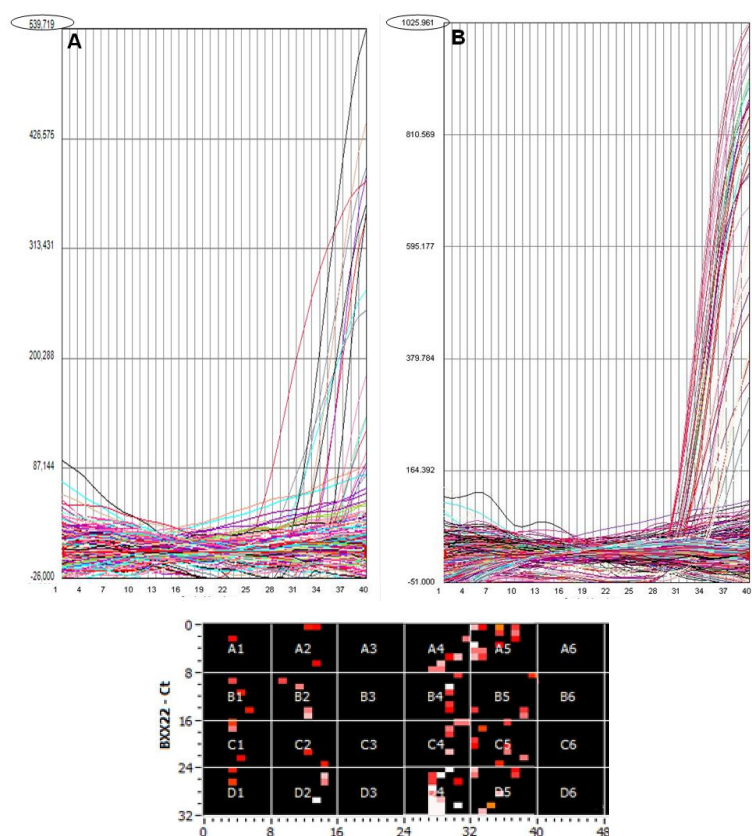
ahol előzetes preamplifikációt is alkalmaztunk (scPCR), amely lehetővé tette, hogy egyetlen sejten akár 20 PCR reakció futtatását is.



25.ábra Neuronok molekuláris karakterizálásának lépései

Mivel a digitális PCR egy alig néhány éves múltra visszatekintő, jelenleg is folyamatos fejlesztés alatt álló módszer, így alkalmazási területeinek listája is folyamatosan bővül (94, 95, 96). Egyetlen sejt expressziós mintázatának tanulmányozására digitális PCR-rel ezidáig alig néhány sikeres próbálkozás történt, és ezekben az esetekben a PCR reakciót mindig megelőzte a minta előzetes amplifikációja (97, 98). Ez nem csak rendkívül időigényes és költséges, hanem számos hibalehetőséget is rejt magában. Az általunk optimalizált és alkalmazott digitális PCR protokoll előnye, hogy a reverz transzkripciót követően nincs szükség preamplifikációra, illetve, hogy a reakciótérfogat mindössze 33 nanoliter, így a módszer anyag és időigénye lényegesen kisebb, mint a hagyományos QRT-PCR technikáé. A korábban egysejt génexpresszióra alkalmazott protokollok minden esetben a minta preamplifikációt követő hígításán alapultak. Mi az optimalizálás során azt tapasztaltuk, hogy egyetlen sejt RNS tartalma pontosan abba a tartományba esik, amely digitális PCR-rel detektálható. Így a génspecifikus primerekkel történő reverz transzkripciót követően a mintákat amplifikáció és hígítás nélkül vittük fel a chip felszínére. Egy sejt cDNS-ét mindig négy almátrix közt osztottuk szét, így elérve azt az optimális koncentrációt ($50 >$ molekula/almátrix), amelyben a legkönnyebb a detektálás. Mivel a hagyományosan alkalmazott digitális PCR protokoll esetében a vártnál kevesebb jelet kaptunk, így

megismételtük a kísérleteket a primer koncentráció változtatásával. Azt tapasztaltuk, hogy a protokoll által javasolt primer koncentráció kétszeresére növelésével, nem csak a detektált jelek száma nő meg nagymértékben, hanem a fluoreszcencia intenzitás is. Ahogy a 26. ábrán látható, míg a hagyományos protokoll használatával egy sejtben átlagosan 10-12 darab *rps18* mRNS-t detekáltunk, addig az optimalizált módszerrel ez a szám 35-40 körül van (n=5). Az ábra 3. és 6. oszlopában látható, hogy a módszerek esetén alkalmazott negatív kontroll mintákon egyik esetben sem kaptunk pozitív jelet, ami azt bizonyítja, hogy a megemelt primer koncentráció csak a módszer érzékenységét növeli meg, a fals pozitív találatok számát nem.

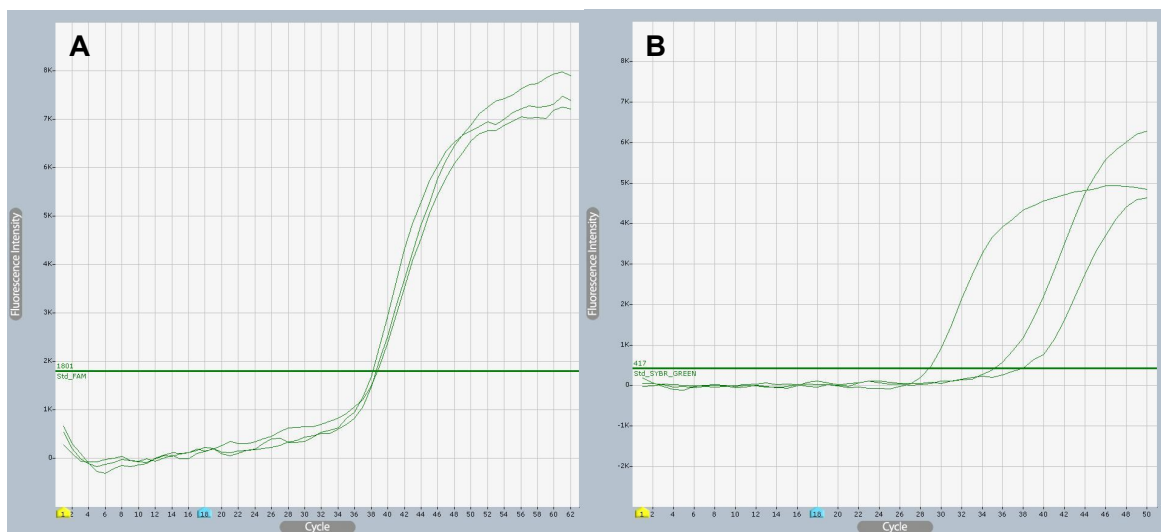


26.ábra Digitális PCR protokoll optimalizálása

Rps18 vizsgálata a hagyományos (A) és az optimalizált (B) protokoll alkalmazásával: piramis (1, 4) és neurogliaform (2, 5) sejtekben és templát nélküli kontroll mintákon (3, 6). Minden oszlop (4 almátrix) egy sejtnek felel meg. Mindkét módszer esetében jól mérhető volt a két sejtípus *rps18* szintje, azonban az általunk optimalizált protokoll (4 5, 6) esetében lényegesen megnőtt a módszer érzékenysége és szignifikánsan több jel volt detektálható, mint a hagyományos (1, 2, 3) módszerrel.

5.4.2 Idegsejtek molekuláris karakterizálása mRNS expresszió alapján

A neuronok génexpressziós mintázatának vizsgálatához alkalmazott PCR alapú módszereket elsőként az egyik legszélesebb körben alkalmazott kontrollgénnel, a *hprt*-vel próbáltuk optimalizálni. Ehhez templátként kétféle interneuront: neurogliaform (NGF) és fast spiker (FS) sejteket, valamint kontrollként piramissejteket (PC) használtunk. Mind a SC-QPCR, mind a dPCR mérések során rendkívül nagy expressziós különbségeket tapasztaltunk a 3 vizsgált sejtípus között (27.ábra). Eredményeinket irodalmi adatokkal összevetve (99, 100) megállapítható, hogy agyi iszkémia, asztrocitóma, illetve különböző neurodegeneratív kórképek során korábban is tapasztalták már a *hprt* szignifikáns expresszióváltozását. Ez felveti annak lehetőségét, hogy agyszöveten végzett vizsgálatokhoz a *hprt* nem megfelelő háztartási gén, így a továbbiakban a neuronok vizsgálata során az *rps18*-at alkalmaztuk.



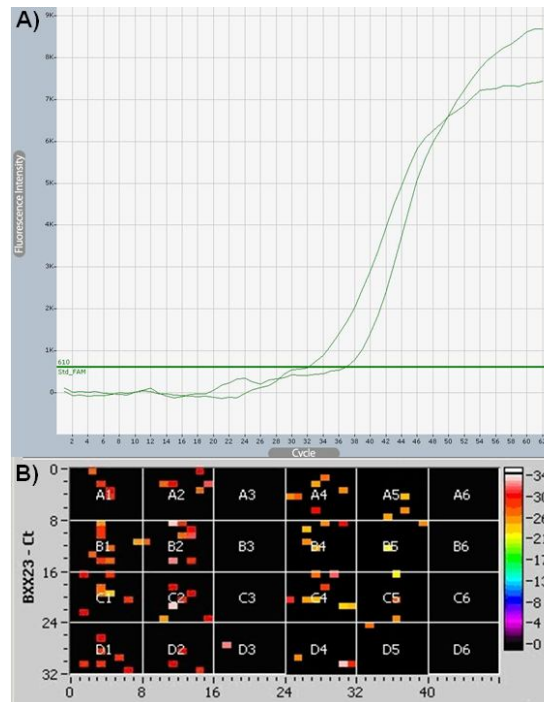
27. ábra Kontrollgének expressziójának összehasonlítása single-cell QRT-PCR technikával

A. *rps18* expresszió NGF, FS és piramissejteken.

B. *hprt* expresszió NGF, FS és piramissejteken.

A módszer működésének további igazolására elvégeztük az egyetlen olyan biomarker vizsgálatát is, amelynek piramissejtek és interneuronok közti expresszió eltérését már korábban bizonyították. Irodalmi adatok alapján az *npy* piramissejteken is kifejeződik, ám lényegesen kisebb mennyiségben, mint a neurogliaform sejtekben. Első lépésben SC-

QPCR technikával megvizsgáltuk az *npv* kifejeződését mindkét sejttípusban (n=5). Az eredményeket minden esetben az *rps18* értékekhez képest normalizálva, a két sejttípus között 3 ciklus különbséget tapasztaltunk, ami 8-szoros expressziós eltérésnek felel meg. Eredményeinket a dPCR mérések is alátámasztották, a neurogliaform sejtekben mért *npv* szint esetben legalább háromszorosa volt a piramissejtek esetében tapasztaltnak (28.ábra).



28.ábra Neuronok génexpressziós alapú osztályozása: npv expresszió mérése:

A) SC-QPCR: NGF és PC sejtekben. (Ct értékek: PC: 35,99; NGF: 32,12)

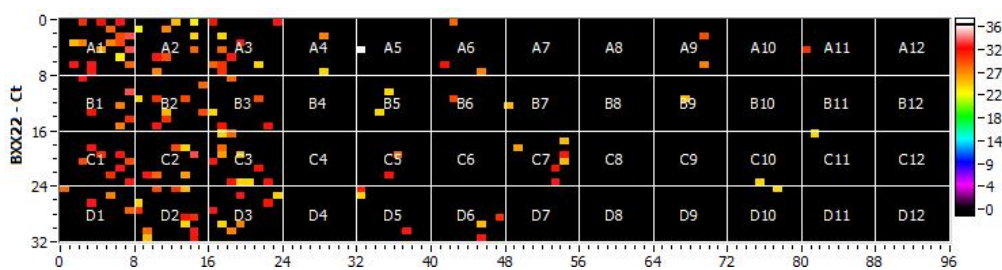
B) dPCR: 1-3: *rps18* expresszió NGF (1), PC (2) és negatív kontroll (3), ($p < 0,05$)

4-6: *npv* expresszió NGF (4), PC (5) és negatív kontroll (6) mintákban.

A 3 vizsgált sejttípus (NGF, FS, PC) közti legfőbb különbség az általuk használt neurotranszmitterek és ioncsatornák különbözőségéből adódik, így mRNS szinten az ezeket kódoló génekre helyeztük a hangsúlyt. Ilyenek például a *gabrd*, *nkcc1*, *kcc2*, *gad1* és a *kcnk6*. A fentiek közül a neuronok osztályozásának egyik legígéretesebb markere lehet a *gabrd* (gamma-aminovajsav, delta receptor). A gamma-aminovajsav az emlős agy legfőbb gátló neurotranszmittere, amely a GABA-A receptorokon keresztül fejt ki hatását. Ezek olyan ligand-függő klorid csatornák, amelyek 5 alegységből állnak, a *gabrd* gén a komplex

negyedik alegységét kódolja. A GABA-A receptorok jelenlétét a különböző idegsejt típusokban eddig csak funkcionálisan vizsgálták, és jelenlétét az általunk karakterizálni kívánt neuronok közül csak neurogliaform sejtekben sikerült kimutatni (101). Egy korábbi kísérletsorozat részeként már elvégeztük piramis sejtek és neurogliaform interneuronok génexpressziós mintázatának összehasonlítását DNS-chip technikával. Akkor azt tapasztaltuk, hogy bár a GABA-A receptorok jelenléte fehérjeszinten nem detektálható, ennek ellenére kis mennyiségben piramis sejtekben is kimutatható a *gabrd* kifejeződése.

A 29. ábra neurogliaform, fast spiker és piramis sejtek *gabrd* expresszióját ábrázolja. A neurogliaform sejtekben (1-3) átlagosan 34 *gabrd* mRNS molekulát számoltunk meg, míg ez a fast spiker (4-7) neuronokban 7, a piramis sejtekben (8-11) pedig 2 darab volt.



29.ábra Neuronok génexpresszió alapú klasszifikációja dPCR technikával

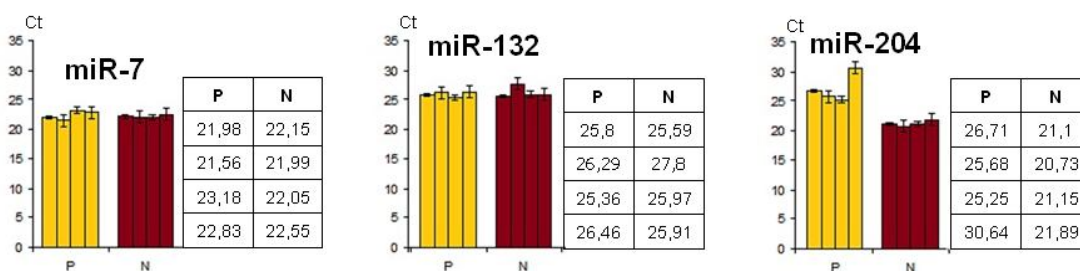
1-3: NGF-*gabrd*, 4-7: FS *gabrd*, 8-11: PC *gabrd*, 12: negatív kontroll *gabrd*.

A korábbiakhoz hasonlóan eredményeinket hagyomány SC-PCR technikával is igazoltuk, amely mindhárom sejt típusban a fentiekhez hasonló eredményt adott. Az értékeket ebben az esetben is az *rps18* kontrollgénhez normalizálva, a három sejt típus esetében mért Ct értékek átlaga a következő volt: NGF: 27,88; FS: 34,88; PC: 37,43. ($p=0,5$).

Eredményeink mind a korábbi microarray, mind a SC-PCR és dPCR esetében azt igazolják, hogy a GABA-A receptorok egyedül neurogliaform sejtekben fordulnak elő nagy mennyiségben, illetve expressziójuk csak ezek esetében konstitutív. A korábbi feltételezésekkel szemben azonban kísérleteink igazolták, hogy bizonyos esetekben, kis mennyiségben a másik két sejt típusban is detektálható a *gabrd* kifejeződése.

5.4.3 Idegsejtek molekuláris jellemzése miRNS expresszió alapján

Az mRNS markerek vizsgálata mellett, célunk volt az idegsejtek miRNS expressziójának meghatározása is. Olyan marker molekulákat kerestünk, amelyek hasonlóan fejeződnek ki az általunk vizsgált sejtekben, így kontrollgénként használhatók, illetve amelyek eltérő expressziójuk révén alkalmasak a neuronok osztályozására. Első lépésben olyan miRNS-ek szűrését végeztük el SC-PCR technikával, amelyek irodalmi adatok alapján ioncsatorna, illetve neurotranszmitter gének szabályozásában vesznek részt. Az mRNS expresszió mérésre használt protokollokkal ellentétben, a miRNS-ek esetében elengedhetetlennek bizonyult a minta preamplifikációja. Az előzetes szűrés alapján 3 miRNS molekulát választottunk ki a további vizsgálatokhoz (30. ábra).



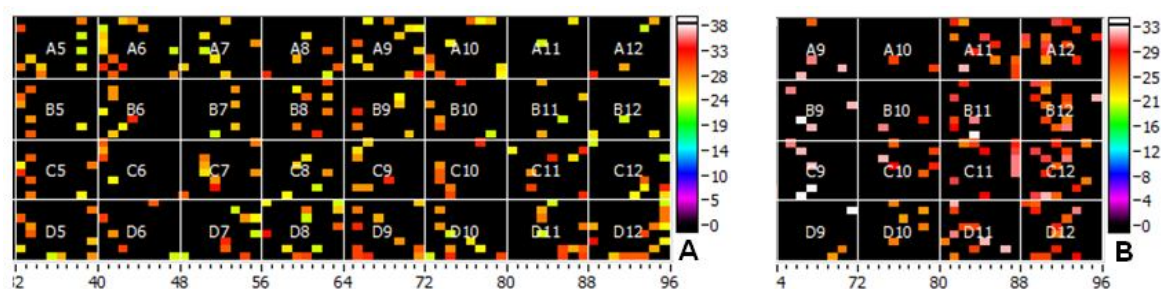
30.ábra Neuronok miRNS expresszió alapú klasszifikációja SC-PCR technikával

Piramis (P) és neurogliaform (N) sejtek expressziós különbségei (n=4) *miR-7*, *miR-132* és *miR-204* vizsgálata során.

A *miR-7* és a *miR-132* esetében nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget az interneuronok és a piramis sejtek közt, így felmerül annak lehetősége, hogy ez a két miRNS megfelelő kontrollgén lehet a neuronok osztályozása során. Ezzel szemben a *miR-204* átlagosan 5 ciklus különbséget mutatott a két sejtípus között ($p < 0,05$), így vélhetően olyan gének szabályozásában vesz részt, amelyek specifikusan a neurogliaform sejtek működésében játszanak szerepet. A *miR-204* szerepéről és működéséről rendkívül kevés információ áll rendelkezésre. Target predikciós algoritmusok alapján valószínűsített target génjei közül a mai napig egyet sem validáltak. Expresszióváltozását megfigyelték már hasnyálmirigy és gyomorrák sejtekben, illetve apoptotikus folyamatokban (102, 103). Emlős idegrendszerben betöltött szerepét ezidáig nem vizsgálták, azonban potenciális

targetjei közt olyan gének szerepelnek, mint a neurális differenciációban szerepet játszó *hoxc8*, *neurog1*, vagy a kloridion függő csatornák működésében résztvevő *gabbr3*.

A *miR-7*, *miR-132* és a *miR-204* esetében tapasztalt változásokat dPCR technikával is validáltuk. Ahogy a mRNS dPCR esetében itt sem volt szükség preamplifikációra, így az itt kapott értékek is minden esetben megfeleltethetők az adott sejt miRNS szintjének, mivel nem kell számolni az RNS felamplifikálásából származó hibalehetőségekkel. A SC-PCR méréseknek megfelelően sem a *miR-7*, sem a *miR-132* esetében nem tapasztaltunk szignifikáns változást a két sejtípus között (31. ábra). A neurogliaform sejteknél a *miR-7* esetében detektált kópiaszám átlagosan 25, míg a *miR-132* esetében 28 volt. Hasonló értékeket kaptunk a piramissejtek miRNS tartalmának mérése során is: *miR-7*-ből 30, míg a *miR-132*-ből 28 molekulát számoltunk meg sejtenként, ami alátámasztva a SC-PCR eredményeket, arra utal, hogy mindkét miRNS megfelelő kontrollgén lehet akár a sejtek HTS miRNS expresszió monitorozása során is.



31.ábra Neuronok miRNS expresszió vizsgálata dPCR-rel.

A) *miR-132* (5-8) és *miR-7* (9-12) expresszió PC (5, 6, 9, 10) és NGF (7, 8, 11, 12) sejtekben.

B) *miR-204* expresszió PC (9, 10) és NGF (11, 12) sejtekben.

A *miR-204* esetében is sikeres volt korábbi eredményeink digitális-alapú validálása. Míg piramissejtekben átlagosan 15, addig a neurogliaform neuronokban 40 kópiát detektáltunk sejtenként. Mindez azt jelenti, hogy a *miR-204* vélhetően szerepet játszik olyan gének regulációjában, amelyek expressziója eltérő a neurogliaform és a piramissejtek között. További terveink között szerepel olyan potenciális *miR-204* targetgének vizsgálata, amelyek magyarázatot adhatnak a neurogliaform sejtek központi szabályozó szerepére.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Munkánk során az elsők között vizsgáltuk a többszörösen telítetlen zsírsavak miRNS expresszióra gyakorolt hatását glioblasztóma sejteken, valamint szív és májszöveten. Ennek során olyan miRNS markereket azonosítottunk, amelyek magyarázattal szolgálhatnak a többszörösen telítetlen zsírsavak közismerten jótékony hatására. A miRNS-ek vizsgálatához első lépésben egy olyan izoláló technikát dolgoztunk ki, amely lehetővé teszi ezek detektálását fibrózus szövetekben is. A változást mutató miRNS-ek célmolekuláinak vizsgálatával olyan útvonalakat tártunk fel, amelyek a megváltozott poszttranszkripció szabályozás révén szerepet játszhatnak a PUFA-k hatásmechanizmusában, így a jövőben terápiás célpontot jelenthetnek.

Eredményeinket az alábbi pontokban foglalhatjuk össze:

- Az általunk optimalizált miRNS izoláló módszer megoldást jelent a kisméretű RNS molekulák fibrózus szövetekből történő izolálására. Az így nyert nagy tisztaságú minta lényegesen megnöveli a miRNS expressziót vizsgáló módszerek érzékenységét, amelyet DNS-chip, QRT-PCR és HTS nanokapilláris PCR technikával is igazoltunk.
- Glioblasztóma sejtekben nagy áteresztőképességű TaqMan PCR technikával összesen 19 miRNS esetében mutattunk ki szignifikáns eltérést a kísérleti csoportok között.
- A PUFA kezelés hatására a tumorsejtekben 6 miRNS-t validáltunk a potenciális targetgének vizsgálatával is. Ezek expressziós eltérései alapján a *miR-16*, *miR-20b*, *miR-22*, *miR-30c*, *miR-143* és a *miR-145* kiemelkedő szerepet játszhatnak a tumorsejtek PUFA-kezelés hatására észlelt apoptózis során.
- QRT-PCR módszerrel 9 mRNS szignifikáns eltérését detektáltuk. Minden esetben korrelációt tapasztaltunk az ezeket szabályozó miRNS-nél észlelt változásokkal is. Eredményeink alapján a PUFA-k tumorelleses hatásában kulcsszerepet játszó gének: *bcl2*, *kras*, *irs1*, *irs2*, *cox2*, *sirt1*, *tp53inp1*, *itgb3*, *ccnd1*.
- Mind mRNS, mind miRNS szinten kimutattuk, hogy a többszörösen telítetlen zsírsavak hatására bekövetkező génexpressziós változások rendkívül hasonlóak a glioblasztóma kezelése során évek óta sikerrel alkalmazott temozolomid által kiváltott hatásokhoz.
- A többszörösen telítetlen zsírsavakkal etetett állatok esetében a szívben 5, míg a májban 7 miRNS esetében detektáltunk szignifikáns változást, amelyeket cél mRNS-ek

vizsgálatával validáltunk. Ezek alapján a többszörösen telítetlen zsírsavak egészséges szívszövetben szignifikáns változást okoznak a *miR-126*, *miR-133b*, *miR-148a*, *miR-150*, *miR-200a*, valamint az *irs1*, *apoa5*, *ccl5*, *cxcl12*, *tnf*, *ppara*, *pecam1* és a *sele* expressziójában. A májban változást mutató miRNS-ek közül a legjelentősebbek a *miR-21*, *miR-107*, *miR-126*, *miR-133b*, *miR-148a*, *miR-200a*, és a *miR-205*, míg a szabályozásuk alá eső gének közül kiemelkedő jelentőségű lehet az *irs1*, *vegfa*, *sele*, *selp*, *fas*, *gpx1*, *acox1*, *apoa5*, *apol2* és a *lypla3*.

- Annak ellenére, hogy a két, többszörösen telítetlen zsírsavak hatását vizsgáló kísérletsorozatot rendkívül eltérő körülmények között és mintákon végeztük, az eredmények összehasonlítása során találtunk mind a miRNS, mind a target mRNA molekulák között olyanokat, amelyek expressziója PUFA kezelés hatására, minden esetben változást mutat. Az miRNS-ek közül ilyen a *miR-30c*, *miR-143*, *miR-125b* és a *miR-200a*, míg a mRNA targetek közül minden esetben indukciót észleltünk az *irs1* esetében.
- Idegsejteken végzett kísérleteink új távlatokat nyitnak meg az egysejt expressziós vizsgálatokban, hiszen az általunk optimalizált reverz transzkripció, amplifikáció, illetve PCR-alapú módszerek mind alkalmasak génexpresszió meghatározásra akár 0,1-1 pg RNS-ből kiindulva is. A dPCR technika minden eddig alkalmazott módszernél jobban reprodukálható adatokat biztosított. Ez nemcsak a módszer érzékenységének köszönhető, hanem az előamplifikáció elhagyásából adódó fals pozitív találatok kiszűrésének is.
- A dPCR protokoll optimalizálásával, alkalmassá tettük azt egyetlen idegsejt génexpressziójának meghatározására is. A protokoll által javasolt TaqMan primer koncentráció növelésével, nem csak a detektált jelek száma nő meg nagymértékben, hanem a fluoreszcencia intenzitás is.
- Az egysejt génexpressziós profil meghatározás első lépéseként olyan mRNA és miRNS markereket azonosítottunk, amelyek megbízható kontrollgénként működhetnek az agykéregben található neuronok vizsgálata során. Méréseinkkel mRNA szinten is igazoltuk az eddig csak funkcionálisan vizsgált GABA-A receptor jelenlétét neurogliaform sejtekben, illetve ennek potenciális biomarker szerepét.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Bevezetés

A mikro RNS-ek olyan 17-25 nukleotid hosszúságú molekulák, amelyek nem kódolnak fehérjét, de mRNS kölcsönhatásuk révén hatással vannak a sejtek működésére. A miRNS-ek több alapvető sejtélettani folyamatban meghatározó szerepet játszanak, mint például a sejtproliferáció, differenciáció, apoptózis szabályozás. Expressziójuk különböző kórfolyamatok során megváltozhat. Máig számos tumortípus esetében írtak le jellemző miRNS expressziós mintázatot, amely bizonytalan diagnózis esetén jelentősen megkönnyítheti a daganat osztályozását, illetve a betegség kimenetelének előrejelzését. Ezenkívül szakirodalmi adatok igazolják azt is, hogy a miRNS-ek szabályozó szerepet töltenek be a különböző citotoxikus anyagokkal szembeni szenzitivitás/rezisztencia kialakításában. Daganatokban az ép szövethez képest eltérően kifejeződő miRNS-ek a klasszikus onkogén-tumorszupresszor vonal alapján osztályozhatók. Azaz a tumorszövetben fokozott expressziót mutató miR-ek onkogén (onkomiR), míg a represszáltak tumorszupresszor tulajdonságúak. Mivel az *in silico* becslések alapján a miRNS-ek egyszerre akár több száz protoonkogén és tumorszupresszor tulajdonságú célmolekulát is szabályozhatnak, így daganatképzésben betöltött szerepük tisztázásához elengedhetetlen célpontjaik és azok biológiai funkciójának azonosítása is.

A többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA) több élettani funkciót töltenek be az emlős szervezetben. Jelentős hatást gyakorolnak a génexpresszióra, szabályozva a négy transzkripciós faktor családot, továbbá fontos szerepet játszanak gyulladáscsökkentő és antiproliferatív metabolitok generációjában, ezzel modulálva az immunválaszt. A többszörösen telítetlen zsírsavak közül a legjelentősebbek az EPA, a DHA és a GLA, melyek élettani hatása többirányú. Közvetlenül hatnak a zsírsavcserére, részt vesznek a sejtmembránok felépítésében, hormonszerű hatást fejtenek ki, valamint kardioprotektív hatásúak. Bár a többszörösen telítetlen zsírsavakat évek óta alkalmazzák kiegészítő terápiaként különböző gyulladáscsökkentő, valamint daganatos betegségek esetén, ennek ellenére még mindig nem teljesen ismertek azok a molekuláris mechanizmusok, melyek a pozitív hatás kiváltásában szerepet játszanak.

Célkitűzés

Munkánk célja olyan miRNS molekulák azonosítása volt, amelyek szerepet játszanak az apoptózis folyamatában, különböző citotoxikus anyagokkal szembeni szenzitivitás/rezisztencia kialakításában, valamint néhány speciális funkciót betöltő idegsejt működésében. Ehhez első lépésben olyan genomikai módszerek optimalizálását tűztük ki célul, amelyek segítségével fibrózus szövetekből is nagy mennyiségű és tiszta miRNS nyerhető ki. Ugyancsak új módszerek kidolgozására volt szükség az „egy sejt” génexpressziós profil meghatározásához is, különös tekintettel a sejtekben található mRNS és miRNS molekulák számának meghatározására.

A vizsgálatokat ezek alapján 4 csoportra osztottuk:

1) Fibrózus szövetekre is alkalmazható miRNS izoláló protokoll fejlesztése

Egyre több olyan kit kapható, amelyek a hagyományos szerves oldószerekkel történő extrahálást kombinálva a szilika-membrán alapú oszlopos technikával alkalmasak tiszta miRNS izolására. Bár ezek a kitek a legtöbb szövettípus esetében kitűnően működnek, egyik sem alkalmas olyan fibrózus szövetekből történő miRNS izolálásra, mint például a szív vagy a tüdőszövet. Célunk elsődlegesen egy olyan miRNS izoláló módszer kidolgozása volt, amely a lehető leggyorsabban, megbízható minőségű és viszonylag nagy mennyiségű mintát képes biztosítani az expressziós vizsgálatokhoz.

2) Többszörösen telítetlen zsírsavakkal kezelt glioblasztóma sejtek miRNS és mRNS expressziós vizsgálata

Annak ellenére, hogy mind *in vitro* kísérletekben, mind klinikai vizsgálatokban sikeresen alkalmaztak többszörösen telítetlen zsírsavakat glioblasztóma kezelésére, még mindig nagyon kevés információ áll rendelkezésre ezen anyagok miRNS és mRNS expresszióra gyakorolt hatásairól. Célunk azon miRNS és a ezek szabályozása alatt álló apoptotikus gének vizsgálata volt, amelyek PUFA kezelés hatására változást mutatnak és a későbbiekben potenciális támadáspontok lehetnek glioblasztóma sejtekben.

3) Többszörösen telítetlen zsírsavakkal etetett patkányokból izolált szív és májszövet miRNS és mRNS expressziós vizsgálata

Számos klinikai vizsgálat igazolta, hogy a PUFA-k jótékony hatást fejtenek kardiovaszkuláris, gyulladásos, illetve daganatos megbetegedések esetén is. Célunk azon génexpressziós változások és biokémiai útvonalak azonosítása volt, amelyek a PUFA

kezeléssel összefüggésbe hozhatók. Ehhez 2 héten át, többszörösen telítetlen zsírsavakkal kiegészített étrenden tartott patkányokat használtunk és HTS módszerekkel vizsgáltuk a diéta hatására a szívben és a májban bekövetkező génexpressziós változásokat.

4) Idegsejtek jellemzése miRNS és mRNS mintázat alapján

Az agykéregben elhelyezkedő gátló interneuronok molekuláris jellemzőiről a mai napig rendkívül kevés információ áll rendelkezésre. Ezek közül is kiemelkedő jelentőségű lehetne a központi szabályozó szerepet betöltő neurogliaform sejtek molekuláris jellemzése, mivel ez számos klinikailag is releváns folyamat (depresszió, alkoholizmus, epilepszia) megértését segítené. Célunk első lépésben olyan módszerek optimalizálása és validálása volt, amelyek alkalmasak egyetlen sejt molekuláris vizsgálatára. Ezt követően olyan molekuláris markerek azonosítását tűztük ki célul, amelyek segítik a neurogliaform sejtek többi interneurontól való elkülönítését, illetve amelyek kulcsfontosságúak lehetnek ezen speciális sejttypus működése során.

Eredmények

A miRNS expressziós profilt TaqMan alapú HTS-nanokapilláris QRT-PCR technikával határoztuk meg. A prediktált célpontok listáját a párhuzamosan elvégzett miRNS-mRNS expressziós vizsgálatok eredményeinek integratív elemzésével, szövet, illetve sejtvonalspecifikus target predikciós megközelítéssel szűkítettük. A legszembetűnőbb változásokat olyan miRNS-ek esetében tapasztaltuk, amelyek az apoptózis szabályozásában játszanak kulcsszerepet. Ilyen például a mindhárom sejtvonal esetében változást mutató *miR-34*, *miR-25*, *miR-17*, *miR-26a*, *miR-29c*, *miR-31*, *miR-200a* és a *miR-206*. A temozolomid kezelés hatására bekövetkező változások közül a *miR-182* overexpressziója és a *miR-16*, illetve a *miR-183* repressziója a legjelentősebb, míg a többszörösen telítetlen zsírsavakkal történő kezelés esetében elsősorban a *miR-143* szint csökkenését és a *miR-20b* indukcióját figyeltük meg. A kezelésekre adott válaszok különbözősége mellett, különbségeket tapasztaltunk az egyes sejtvonalak között is. Ezek az eltérések a különböző glioblasztóma sejtvonalakban eltérően működő szignalizációs útvonalaknak köszönhetőek. Ilyen sejtvonal specifikus választ mutatott a *miR-125b* a GBM5 sejtvonalakban, illetve a *miR-197* az U373 sejtek esetében. A *miR-145* expresszió-változása minden esetben jelentős volt, ám amíg a GBM sejtekben körülbelül ötszörös

csökkenést, addig az U373 sejteknél minden esetben növekvő expressziót tapasztaltunk. Ugyancsak szignifikáns expresszió-változást tapasztaltunk a *miR-140*, a *miR-323* és a *miR-133b* esetében is azonban ezt csak az U373 sejtek esetében észleltük. A mRNS expressziós mérések során 9 olyan apoptotikus gént sikerült detektálni, melyek expresszió-változása ellentétes irányú a szabályozó miR esetében észlelt változással. Ezek a következők: *irs1*, *irs2*, *cox2*, *ccnd1*, *sirt1*, *tp53inp1*, *itgb3*, *kras* és a *bcl2*. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a többszörösen telítetlen zsírsavakkal történő kezelés hatására számos olyan miRNS és mRNS expressziója megváltozik, amelyeket valamely apoptotikus útvonal szereplőjeként már korábban azonosítottak. Bebizonyítottuk azt is, hogy az általunk alkalmazott többszörösen telítetlen zsírsavak a temozolomidhoz hasonló hatást fejtenek ki, azaz olyan génexpressziós változásokat indukálnak glioblasztóma sejtekben, amelyek azok apoptózisához vezetnek.

A PUFA-tartalmú étrenden tartott állatok esetében a szívszövetben 5 (*miR-126*, *miR-133b*, *miR-148a*, *miR-150*, *miR-200a*), a májszövetben pedig 7 (*miR-21*, *miR-107*, *miR-126*, *miR-133b*, *miR-148a*, *miR-200a*, *miR-205*) miRNS szignifikáns expressziós eltéréseit találtuk. A miRNS expressziós eredmények megerősítéséhez olyan gének vizsgálatát is elvégeztük, amelyek a kísérleteink során változást mutató miR-ek targetjeiként ismertek. Ezek közül a legjelentősebb változást a következők esetében észleltük: *apoa5*, *irs1*, *tnf*, *fas*, *vegfa*, *itgb3*, *sele*, *selp*, *ppara*, *cxcl12*, *abca1*, *acox1*, *pafah1b1*, *lypla3*. A szívben detektált változások az egyik legjelentősebb az *apoa5*, amely meghatározó szerepet játszik a plazma triglicerid szintjének szabályozásában, ezáltal rendellenes működése növeli a koronáriabetegségek kialakulásának kockázatát. Eredményeink alapján a többszörösen telítetlen zsírsavakban gazdag diéta nagymértékben csökkenti termelődését. Szignifikáns változást tapasztaltunk az E-selectin esetében is, amely kizárólag endothél sejtekben expresszálódik és elsősorban gyulladásos folyamatokban játszik szerepet. Ezenkívül a szérumban mért koncentrációja alapján markerként használható atherosclerosis, magas vérnyomás, illetve koronáriabetegségek kimenetelének előrejelzésére. A PUFA diéta hatására tapasztalt pozitív változások közé sorolható a májban a *selp* repressziója, mivel ennek terméke normális körülmények között csak igen kis mennyiségben mutatható ki a vérlemezkék felszínén. Megnövekedett expressziója általában valamilyen gyulladásos folyamatra, cirrózisra vagy daganatra utal.

Az idegsejteken végzett vizsgálatok első lépéseként sikeresen optimalizáltunk olyan protokollokat, amelyek alkalmasak egyetlen sejtől történő mRNS és miRNS izolálására, egyetlen sejt RNS tartalmának direkt vagy indirekt reverz transzkripciójára, illetve az átírt cDNS preamplifikálására. Ezt követően olyan digitális és valós idejű PCR protokollokat optimalizáltunk, amelyek segítségével egyetlen sejten párhuzamosan akár 10 gén analízise is elvégezhető. Céljaink közt szerepelt a kiemelkedő jelentőségű neurogliaform interneuron molekuláris karakterizálása, illetve génexpressziós mintázatának összehasonlítása piramissejtekkel. Digitális PCR alkalmazásával mindkét sejtípusban meghatároztuk három miRNS és négy mRNS molekula kópiaszámát. A mRNS szinten végzett vizsgálatok eredményei alapján a *hprt* idegsejtek esetében nem alkalmazható kontrollgénként, mivel expressziója jelentősen eltér az egyes sejtípusok között, így eredményeink normalizálásához *rps18* gént használtunk. Az általunk vizsgált gének közül a *gabrd* és a *miR-204* esetében tapasztaltunk olyan mértékű expresszió különbséget, amely alapján ezek markerként használhatók a neurogliaform sejtek elkülönítése során.

8. SUMMARY

Introduction

MicroRNAs (miRNAs) are single-stranded short non-coding RNA molecules of about 20-22 nucleotides in length, which usually repress gene expression by binding at the 3'UTR region of target gene. However the function of most miRNAs is not well known, many miRNAs have been found to associate with apoptosis and cancer, suggesting they function as oncogene or tumor suppressor gene. The global role of miRNA function in the heart has also been analyzed, and it has been revealed that miRNAs play an essential role during the heart development. In addition miRNA expression profiling studies demonstrate that expression levels of specific miRNAs change in diseased human hearts, pointing to their involvement in cardiomyopathies. Recent miRNA research advances showed great potential for the development of novel biomarkers and therapeutic targets.

The nutritionally essential polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are fatty acids that contain more than one double bond in their backbone. PUFAs are involved in many biological functions including inflammatory response, cell membrane structure and function, cell signaling transduction pathways, regulation of transcription, fetal growth and development, retinal function, and brain development. Small amounts of very long chain PUFA with a chain length of 22 carbons or more are present in many animal tissues, especially in the testis, retina, brain, and liver. There are three major types of PUFAs that are ingested in foods and used by the body: alpha-lipoic acid (ALA), eicosapentaenoic acid (EPA), and docosahexaenoic acid (DHA). Evidence from cellular and molecular research studies indicates that the cardioprotective and antitumor effects of PUFAs result from a synergism between multiple, intricate mechanisms that involve antiinflammation, proresolving lipid mediators, modulation of cardiac ion channels, reduction of triglycerides, influence on membrane microdomains and downstream cell signaling pathways. However PUFAs are being used for years as a complementary therapy in case of cancer, the molecular mechanisms by which PUFAs protect or enhance tumor development, has still not been fully investigated. It has become necessary to determine the roles of fatty acids in the development of or protection against human cancer.

Aims of the study

Our aim was to identify miRNA molecules playing a key role in the mechanism of apoptosis and treatment response in cancer cells and in the action of some special neuron types. Our experiments can be divided to four groups:

1) Purification of high-quality miRNA from the heart tissue.

Traditionally, miRNA purification relies on organic extraction followed by alcohol precipitation, however, much of the small RNAs are lost during this procedure. Several companies developed special purification kits for miRNAs that employ organic extraction followed by binding and purification of small RNAs on a silica fiber matrix. However reproducible expression analysis of miRNAs is highly dependent on the quality of the RNA, none of the commercially available kits are specialized to fibrotic tissues, such as the myocardial tissue. Therefore our aim was to develop an optimized miRNA purification protocol for fibrosuos tissues.

2) MiRNA and mRNA profile of PUFA treated glioma cells

Previous studies showed that certain polyunsaturated fatty acids, especially γ -linolenic acids have tumoricidal action against glioma cells both in vitro and in vivo. Understanding how the signaling pathways involved in surviving and inducing cell death of different glioma cells are regulated during PUFA treatment is important for the development of more effective tumor therapies. To date, no data is available as to the effect of different PUFAs on miRNA expression in glioblastoma cells. Our aim was to analyze the miRNA expression changes of three different glioma cells treated with three different PUFAs (GLA, AA and DHA) and temozolomide as a chemotherapeutic agent currently used in glioma treatment.

3) Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on liver and heart miRNA expression.

However several clinical studies have confirmed that PUFAs are efficacious in case of cardiovascular, inflammatory and cancerous diseases, it's still unknown how are these influence the gene expression pattern of the cells. Our aim was to identify the gene expression changes and biochemical pathways, that are influenced by PUFA treatment.

4) Classifying interneurons by single cell gene expression profiling

Individual cells exhibit a large degree of variability in their gene expression profile. Whole-cell patch-clamp recording enables detecting electrophysiological signals from neurons and total RNA can be harvested into the patch pipette from the same cells. Subsequent nucleic acid amplification techniques can provide gene expression measurements on electrophysiologically characterized cells. Our aim was to optimize methods for determining mRNA or miRNA expression in single neurons after patch-clamp recording at a single molecule level by using high-density nanocapillary digital PCR. With the combination of dPCR and patch-clamp techniques, our aim was to assess mRNA and miRNA expression pattern of three neuron types.

Results and discussion

1) Purification of high-quality micro RNA from the heart tissue

We optimized a miRNA purification protocol based on an existing kit which was originally developed for paraffin embedded tissue preparations, but was not appropriate for fibrotic tissues. Using the same tissue as starting material we made total RNA purification with the traditional Trizol protocol, as well as Trizol protocol but inserting an extra step to proteolitically digest the muscle fibers with Proteinase K treatment. We also used silica-column based, commercially available miRNA purification kit from Roche as a control. The essence of our new method relies on efficient proteolytic digestion of fibrotic tissue and a two-step purification protocol, which at first separate the total RNA including miRNAs, then on a new column miRNA is further purified by an additional elution. MiRNA obtained by our novel protocol gave more reproducible results in quantitative real-time PCR (QRT-PCR) analysis and more significant calls in DNA microarray analysis. that resulted in a significantly higher miRNA yield as compared to other methods in the literature.

2) MiRNA and mRNA profile of PUFA treated glioma cells

We investigated the effects of GLA, DHA and AA that are PUFAs. In order to differentiate specific responses to different PUFAs we analyzed the effect of temozolomide, which is an oral alkylating agent that is used for the treatment of brain tumors. We have analyzed the expression of 112 microRNA by using high-throughput, nanocapillary QRT-

PCR. Most of the miRNA expression changes can be dedicated to the general apoptotic cell death (with all PUFAs as well as temozolomide), such as mir-34, mir-25, mir-17, mir-26a, mir-29c, mir-31, mir-200a, mir-206 in the three cell lines tested. The same general effect, up-regulation of mir-140, mir-323 and mir-133b could be seen but only in U373 cells, but not in GBM2 nor in GBM5 cells. Besides non-specific modification of miRNA expression, we could detect temozolomide and PUFA treatment-specific alterations in miRNA level. In case of temozolomide we found specific up-regulation of mir-182, and down-regulation of mir-16 and mir-183. Mir-143 was found to be repressed and mir-20b was induced by PUFA treatments. The expression of mir-125b was repressed in GBM5 cells only, while, mir-197 was up-regulated in U373 cells. The same cell-type specificity could be observed in the case of mir-206 that was down-regulated in GBM2 cells, but was up-regulated in U373 cells. These differences in the expression of certain types of miRNAs in response to various PUFAs by different glioma cells could be due to differences in the signalling pathways in different types of tumor cell lines, even though the three studied cell lines were glioblastoma cells.

To confirm the importance of miRNA expression regulation during apoptosis, we listed the target genes of most of the miRNAs that were changed upon PUFA or temozolomide treatment. Most of the targets of the differentially expressed miRNAs in response to PUFA treatment were apoptotic genes. It is likely that the exhibited changes in miRNAs are as a consequence of apoptosis. This is supported by the fact that most of the mRNAs that are altered in response to PUFAs and temozolomide as noted in the present study are regulated by 9 miRNAs that can be classified as apoptosis-specific genes. Furthermore, most of the genes are overlapping, suggesting the existence of parallel regulatory pathways. These genes are the following: *irs1*, *irs2*, *cox2*, *ccnd1*, *sirt1*, *tp53inp1*, *itgb3*, *kras* és a *bcl2*.

Understanding how the signaling pathways involved in surviving and inducing cell death of different glioma cells are regulated during PUFA treatment is important for the development of more effective tumor therapies including PUFAs alone or in combination with other drugs. In the present study, we focused on microRNA expression changes, as microRNAs are currently being recognized to have central role in the regulation of the expression of key gene families that are involved in cell physiology and the fate of cancer

cells. In conclusion, we could demonstrate that in response to different PUFAs the expression of miRNA and the expression of their target mRNA coding genes were differentially altered. Most of the regulated genes could be classified as apoptotic genes and were up-regulated by PUFAs and temozolomide, while the same treatment resulted in repression of corresponding miRNAs. From these results, we conclude that PUFAs trigger apoptosis in glioma cells by regulating miRNA and their corresponding gene expressions.

3) Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on liver and heart miRNA expression.

The PUFA experiments were carried out on rats to determine the miRNA expression changes in the heart and liver. We observed significant changes in the expression level of 8 miRNA species. In the heart we observed significant miRNA expression changes in the case of 5 miRNAs (*miR-126*, *miR-133b*, *miR-148a*, *miR-150*, *miR-200a*), while in the liver we observed significant changes in the case of the 8 following miRNAs: *miR-21*, *miR-107*, *miR-126*, *miR-133b*, *miR-148a*, *miR-200a* and *miR-205*. To confirm our results we determined the expression changes of the target genes of the differentially expressed miRNAs. These targets are vital genes, playing a key role in apoptosis, angiogenesis and lipid metabolism. These genes are the following: *apoa5*, *irs1*, *tnf*, *fas*, *vegfa*, *itgb3*, *sele*, *selp*, *ppara*, *cxcl12*, *abca1*, *acox1*, *pafah1b1*, *lypla3*.

According to our results *apoa5* and *sele* exhibited a significant repression due to PUFA treatment in the heart. The *apoa5* is an important determinant of plasma triglyceride levels, a major risk factor for coronary artery disease. It is a component of several lipoprotein fractions including VLDL, HDL, chylomicrons.

Selectin-E (*sele*) is expressed only on the surface of endothelial cells. During inflammation, *sele* plays an important part in recruiting leukocytes to the site of injury. In cases of elevated blood glucose levels, such as in sepsis, E-selectin expression is higher than normal, resulting in greater microvascular permeability. E-selectin is also an emerging biomarker for the metastatic potential of some cancers and for hypertonia or atherosclerosis.

In the liver we have shown that PUFA treatment inhibits the expression of selectin P (*selp*). P-selectin plays an essential role in the initial recruitment of leukocytes to the site of injury during inflammation. According to previous studies, induction of *selp* gene predicts inflammation, liver cirrhosis or cancer.

In conclusion, we could demonstrate that in response to different PUFAs the expression of miRNA and the expression of their target mRNA coding genes were differentially altered. Most of the regulated genes are involved in cell adhesion, angiogenesis and lipid metabolism and were up-regulated by PUFAs, while the same treatment resulted in repression of corresponding miRNAs.

4) Classifying interneurons by single cell gene expression profiling

Population-average expression survey of more than one cell provides an incomplete picture on individual variations of physiological state, biomarker distribution or gene expression profile. With single-cell gene expression profiling one can study heterogeneity among and within cell types. However, analyzing limited number of transcripts with the most often used technology, QRT-PCR reaches its limit, when less than 2-fold expression changes should be determined. Therefore, although one can reliably infer qualitative trends from these gene expression results, it is difficult if not impossible to generate quantitative transcriptional data of single cells. The introduction of systematic errors in determining the exact number of RNA molecules with traditional QRT-PCR can be circumvented by using digital PCR. To demonstrate the utility, reproducibility and sensitivity of our dPCR protocol, the expression of a house-keeping gene (*rps18*), two possible cell-type specific marker genes (*npv* and *gabrd*) and three miRNA genes (miR-7, miR-132, miR-204) were recorded by dPCR from individual cellular aspirates from three different neuron types: pyramid cells (Pc), fast-spiking interneurons (Fs) and neurogliaform cells (Ngf). To confirm dPCR data for mRNA and miRNA expression of single neurons after patch-clamp recording, classical single cell QRT-PCR was also run in case of all genes on all the three neuron types used in this study. According to our data we found no alterations in the expression of *rps18* gene. Expression of *gabrd* was specific to neurogliaform cells, significantly lower expression could be detected in fast spiking cells, and no amplification could be recorded in case of pyramidal cells.

To understand the role of miRNAs in different neuronal processes, including pathological alterations, there must be an understanding of how different miRNAs express in different cell types. The copy number of *miR-7* and *miR-132* molecules was determined in neurogliaform, pyramidal cells and in fast-spiking neurons and found to be equally

expressed in all cells. We found that the expression of *miR-204* was induced in neurogliaform cells, we measured significantly lower expression in pyramidal cells.

In summary, the combination of patch-clamp recording and high-density nanocapillary dPCR protocols is an effective and sensitive approach for determining mRNA or miRNA expression in single neurons at a single molecule resolution. With the presented method one can identify individual genes participating in the establishment and maintenance of particular neuronal phenotypes, deconvolve different neuronal cell types and discover the exact distribution or variability of gene expression profiles of the electrophysiologically phenotyped cells more precisely than classical single cell QRT-PCR could achieve.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec 3;75:843-54.
2. Singh SK, Pal Bhadra M, Girschick HJ, Bhadra U. MicroRNAs--micro in size but macro in function. *FEBS J*. 2008 Oct;275:4929-44. Review.
3. Kutanzi KR, Yurchenko OV, Beland FA, Checkhun VF, Pogribny IP. MicroRNA-mediated drug resistance in breast cancer. *Clin Epigenetics*. 2011 Aug;2:171-185.
4. Sevignani C, Calin GA, Siracusa LD, Croce CM. Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression. *Mamm Genome*. 2006 Mar;17:189-202.. Review.
5. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004 Jan;116:281-97. Review.
6. Chen CZ. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *N Engl J Med*. 2005 Oct;353:1768-71.
7. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*. 2008 Feb;9:102-14. Review.
8. Voorhoeve PM, Agami R. Classifying microRNAs in cancer: the good, the bad and the ugly. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Jun;1775:274-82. Review.
9. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005 Jun;435:834-8.
10. Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, Falconi M, Capelli P, Bersani S, Calin GA, Volinia S, Liu CG, Scarpa A, Croce CM. MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol*. 2006 Oct 10;24:4677-84.

11. He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S, Calin GA, Liu CG, Franssila K, Suster S, Kloos RT, Croce CM, de la Chapelle A. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Dec;102:19075-80.
12. Nana-Sinkam SP, Geraci MW. MicroRNA in lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2006 Nov;1:929-31. Review.
13. Budhu A, Jia HL, Forgues M, Liu CG, Goldstein D, Lam A, Zanetti KA, Ye QH, Qin LX, Croce CM, Tang ZY, Wang XW. Identification of metastasis related microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008 Mar;47:897-907.
14. Katada T, Ishiguro H, Kuwabara Y, Kimura M, Mitui A, Mori Y, Ogawa R, Harata K, Fujii Y. microRNA expression profile in undifferentiated gastric cancer. *Int J Oncol*. 2009 Feb;34:537-42.
15. Dahiya N, Morin PJ. MicroRNAs in ovarian carcinomas. *Endocr Relat Cancer*. 2010 Jan 29;17:F77-89. Review.
16. Barbarotto E, Schmittgen TD, Calin GA. MicroRNAs and cancer: profile, profile, profile. *Int J Cancer*. 2008 Mar 1;122:969-77. Review.
17. Weber F, Teresi RE, Broelsch CE, Frilling A, Eng C. A limited set of human MicroRNA is deregulated in follicular thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Sep;91:3584-91.
18. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2006 Aug 3;355:533.
19. Rosenbaum M, Scheinker IM. Glioblastoma multiforme of the right frontal lobe. *Dis Nerv Syst*. 1948 Mar;9:86-90.
20. McComb RD, Bigner DD. The biology of malignant gliomas—a comprehensive survey. *Clin Neuropathol*. 1984 May-Jun;3:93-106. Review.
21. Ang C, Guiot MC, Ramanakumar AV, Roberge D, Kavan P. Clinical significance of molecular biomarkers in glioblastoma. *Can J Neurol Sci*. 2010 Sep;37:625-30.

22. Galardi S, Mercatelli N, Farace MG, Ciafrè SA. NF- κ B and c-Jun induce the expression of the oncogenic miR-221 and miR-222 in prostate carcinoma and glioblastoma cells. *Nucleic Acids Res.* 2011 May;39:3892-902.
23. Visone R, Russo L, Pallante P, De Martino I, Ferraro A, Leone V, Borbone E, Petrocca F, Alder H, Croce CM, Fusco A. MicroRNAs (miR)-221 and miR-222, both overexpressed in human thyroid papillary carcinomas, regulate p27Kip1 protein levels and cell cycle. *Endocr Relat Cancer.* 2007 Sep;14:791-8.
24. Xu J, Liao X, Lu N, Liu W, Wong CW. Chromatin-modifying drugs induce miRNA-153 expression to suppress Irs-2 in glioblastoma cell lines. *Int J Cancer.* 2011 Jan; 15;129:2527-31.
25. Fowler A, Thomson D, Giles K, Maleki S, Mreich E, Wheeler H, Leedman P, Biggs M, Cook R, Little N, Robinson B, McDonald K. miR-124a is frequently down-regulated in glioblastoma and is involved in migration and invasion. *Eur J Cancer.* 2011 Apr;47:953-63.
26. Smits M, Nilsson J, Mir SE, van der Stoop PM, Hulleman E, Niers JM, de Witt Hamer PC, Marquez VE, Cloos J, Krichevsky AM, Noske DP, Tannous BA, Würdinger T. miR-101 is down-regulated in glioblastoma resulting in EZH2-induced proliferation, migration, and angiogenesis. *Oncotarget.* 2010 Dec;1:710-20.
27. Ang C, Guiot MC, Ramanakumar AV, Roberge D, Kavan P. Clinical significance of molecular biomarkers in glioblastoma. *Can J Neurol Sci.* 2010 Sep;37:625-30.
28. Idbaih A, Omuro A, Ducray F, Hoang-Xuan K. Molecular genetic markers as predictors of response to chemotherapy in gliomas. *Curr Opin Oncol.* 2007 Nov;19:606-11. Review.
29. Donson AM, Addo-Yobo SO, Handler MH, Gore L, Foreman NK. MGMT promoter methylation correlates with survival benefit and sensitivity to temozolomide in pediatric glioblastoma. *Pediatr Blood Cancer.* 2007 Apr;48:403-7.
30. Berger A, Mutch DM, German JB, Roberts MA. Unraveling lipid metabolism with microarrays: effects of arachidonate and docosahexaenoate acid on murine hepatic and hippocampal gene expression. *Genome Biol.* 2002 May 23;3.

31. Kitajka K, Sinclair AJ, Weisinger RS, Weisinger HS, Mathai M, Jayasooriya AP, Halver JE, Puskás LG. Effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on brain gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jul 27;101:10931-6.
32. Bigger JT Jr, El-Sherif T. Polyunsaturated fatty acids and cardiovascular events: a fish tale. *Circulation*. 2001 Feb;103:623-5.
33. Milberg P, Frommeyer G, Kleideiter A, Fischer A, Osada N, Breithardt G, Fehr M, Eckardt L. Antiarrhythmic effects of free polyunsaturated fatty acids in an experimental model of LQT2 and LQT3 due to suppression of early afterdepolarizations and reduction of spatial and temporal dispersion of repolarization. *Heart Rhythm*. 2011 Sep;8:1492-500.
34. Das UN. Gamma-linolenic acid therapy of human glioma-a review of in vitro, in vivo, and clinical studies. *Med Sci Monit*. 2007 Jul;13:RA119-31. Review.
35. Begin ME, Das UN, Ells G, Horrobin DL: Selective killing of human cancer cells by polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot Med*. 1985;19:177–86.
36. Das UN: Tumoricidal action of cis-unsaturated fatty acids and their relationship to free radicals and lipid peroxidation. *Cancer Lett*, 1991;56:235–43
37. Vartak S, McCaw R, Davis CS, Robbins ME, Spector AA. Gamma-linolenic acid (GLA) is cytotoxic to 36B10 malignant rat astrocytoma cells but not to 'normal' rat astrocytes. *Br J Cancer*. 1998 May;77:1612-20.
38. Corsetto PA, Montorfano G, Zava S, Jovenitti IE, Cremona A, Berra B, Rizzo AM. Effects of n-3 PUFAs on breast cancer cells through their incorporation in plasma membrane. *Lipids Health Dis*. 2011 May 12;10:73.
39. Habermann N, Lund EK, Pool-Zobel BL, Glei M. Modulation of gene expression in eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid treated human colon adenoma cells. *Genes Nutr*. 2009 Mar;4:73-6.
40. Khan Z, Khan N, Tiwari RP, Sah NK, Prasad GB, Bisen PS. Biology of Cox-2: an application in cancer therapeutics. *Curr Drug Targets*. 2011 Jun;12:1082-93. Review.

41. Vecchini A, Ceccarelli V, Susta F, Caligiana P, Orvietani P, Binaglia L, Nocentini G, Riccardi C, Calviello G, Palozza P, Maggiano N, Di Nardo P. Dietary α -linolenic acid reduces COX-2 expression and induces apoptosis of hepatoma cells. *J Lipid Res.* 2004 Feb;45:308-16.
42. Narayanan BA, Narayanan NK, Reddy BS. Docosahexaenoic acid regulated genes and transcription factors inducing apoptosis in human colon cancer cells. *Int J Oncol.* 2001 Dec;19:1255-62.
43. Trombetta A, Maggiora M, Martinasso G, Cotogni P, Canuto RA, Muzio G. Arachidonic and docosahexaenoic acids reduce the growth of A549 human lung-tumor cells increasing lipid peroxidation and PPARs. *Chem Biol Interact.* 2007 Feb;165:239-50.
44. Jones EG. Neurotransmitters in the cerebral cortex. *J Neurosurg.* 1986 Aug;65:135-53. Review.
45. Nelson SB, Sugino K, Hempel CM. The problem of neuronal cell types: a physiological genomics approach. *Trends Neurosci.* 2006 Jun;29:339-45. Review.
46. Ascoli GA et al. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci.* 2008 Jul;9(7):557-68. Review.
47. Sugino K, Hempel CM, Miller MN, Hattox AM, Shapiro P, Wu C, Huang ZJ, Nelson SB. Molecular taxonomy of major neuronal classes in the adult mouse forebrain. *Nat Neurosci.* 2006 Jan;9:99-107.
48. Subkhankulova T, Yano K, Robinson HP, Livesey FJ. Grouping and classifying electrophysiologically-defined classes of neocortical neurons by single cell, whole-genome expression profiling. *Front Mol Neurosci.* 2010 Apr 13;3:10.
49. Allen YS, Adrian TE, Allen JM, Tatemoto K, Crow TJ, Bloom SR, Polak JM. Neuropeptide Y distribution in the rat brain. *Science.* 1983 Aug;221:877-9.
50. Karagiannis A, Gallopin T, Dávid C, Battaglia D, Geoffroy H, Rossier J, Hillman EM, Staiger JF, Cauli B. Classification of NPY expressing neocortical interneurons. *J Neurosci.* 2009 Mar 18;29:3642-59.
51. Alger BE. Gating of GABAergic inhibition in hippocampal pyramidal cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1991;627:249-63. Review.

52. Tamás G, Lorincz A, Simon A, Szabadics J. Identified sources and targets of slow inhibition in the neocortex. *Science*. 2003 Mar 21;299:1902-5.
53. Price CJ, Cauli B, Kovacs ER, Kulik A, Lambolez B, Shigemoto R, Capogna M. Neurogliaform neurons form a novel inhibitory network in the hippocampal CA1 area. *J Neurosci*. 2005 Jul 20;25:6775-86.
54. A. Mölder, M. Sebesta, L. Gisselsson, K. Alm, A. Gjörlöf Wingren. Digital holographic microscopy – innovative and non-destructive analysis of living cells In *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*. 2010.
55. Faragó N, Zvara A, Varga Z, Ferdinandy P, Puskás LG. Purification of high-quality micro RNA from the heart tissue. *Acta Biol Hung*. 2011 Dec;62:413-25.
56. Wylie D, Shelton J, Choudhary A, Adai AT. A novel mean-centering method for normalizing microRNA expression from high-throughput RT-qPCR data. *BMC Res Notes*. 2011 Dec 21;4:555
57. Pohl G, Shih IeM. Principle and applications of digital PCR. *Expert Rev Mol Diagn*. 2004 Jan;4:41-7. Review.
58. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Aug;96:9236-41.
59. McCaughan F, Dear PH. Single-molecule genomics. *J Pathol*. 2010 Jan;220:297-306.
60. Chu T, Bunce K, Hogge WA, Peters DG. Statistical considerations for digital approaches to non-invasive fetal genotyping. *Bioinformatics*. 2010 Nov;26:2863-6.
61. van Rooij E, Olson EN. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *J Clin Invest*. 2007 Sep;117:2369-76. Review.
62. Grigorenko EV, Ortenberg E, Hurley J, Bond A, Munnely K: miRNA profiling on high throughput OpenArray™ system. *Methods Mol Biol*. 2011, 676:101-110.
63. Lewis DA, Travers JB, Spandau DF. A new paradigm for the role of aging in the development of skin cancer. *J Invest Dermatol*. 2009 Mar;129:787-91.

64. Knobbe CB, Reifenberger G. Genetic alterations and aberrant expression of genes related to the phosphatidylinositol-3'-kinase/protein kinase B (Akt) signal transduction pathway in glioblastomas. *Brain Pathol.* 2003 Oct;13:507-18.
65. Zenz T, Mohr J, Eldering E, Kater AP, Bühler A, Kienle D, Winkler D, Dürig J, van Oers MH, Mertens D, Döhner H, Stilgenbauer S. miR-34a as part of the resistance network in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2009 Apr;113:3801-8.
66. Wang J, Wang Q, Cui Y, Liu ZY, Zhao W, Wang CL, Dong Y, Hou L, Hu G, Luo C, Chen J, Lu Y. Knockdown of cyclin D1 inhibits proliferation, induces apoptosis, and attenuates the invasive capacity of human glioblastoma cells. *J Neurooncol.* 2011.
67. Anastasiou D, Krek W. SIRT1: linking adaptive cellular responses to aging-associated changes in organismal physiology. *Physiology (Bethesda).* 2006 Dec;21:404-10. Review.
68. Ford J, Jiang M, Milner J. Cancer-specific functions of SIRT1 enable human epithelial cancer cell growth and survival. *Cancer Res.* 2005 Nov 15;65:10457-63.
69. Basu A, Halder S. The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Mol Hum Reprod.* 1998 Dec;4:1099-109. Review.
70. Giusiano S, Garcia S, Andrieu C, Duseti NJ, Bastide C, Gleave M, Taranger-Charpin C, Iovanna JL, Rocchi P. TP53INP1 overexpression in prostate cancer correlates with poor prognostic factors and is predictive of biological cancer relapse. *Prostate.* 2011.
71. Kim JH, Zheng LT, Lee WH, Suk K. Pro-apoptotic role of integrin $\beta 3$ in glioma cells. *J Neurochem.* 2011 May;117:494-503.
72. Healy ZR, Lee NH, Gao X, Goldring MB, Talalay P, Kensler TW, Konstantopoulos K. Divergent responses of chondrocytes and endothelial cells to shear stress: cross-talk among COX-2, the phase 2 response, and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005 Sep 27;102:14010-5.
73. Vaughn CP, Zobel SD, Furtado LV, Baker CL, Samowitz WS. Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2011 May;50:307-12.

74. Bohanes P, LaBonte MJ, Winder T, Lenz HJ. Predictive molecular classifiers in colorectal cancer. *Semin Oncol.* 2011 Aug;38:576-87. Review.
75. Holmen SL, Williams BO. Essential role for Ras signaling in glioblastoma maintenance. *Cancer Res.* 2005 Sep;65:8250-5.
76. Bonauer A, Boon RA, Dimmeler S. Vascular microRNAs. *Curr Drug Targets.* 2010 Aug;11:943-9. Review.
77. Liu B, Peng XC, Zheng XL, Wang J, Qin YW. MiR-126 restoration down regulate VEGF and inhibit the growth of lung cancer cell lines in vitro and in vivo. *Lung Cancer.* 2009 Nov;66:169-75.
78. Meister J, Schmidt MH. miR-126 and miR-126*: new players in cancer. *Scientific World Journal.* 2010 Oct;10:2090-100. Review.
79. Luo X, Lin H, Pan Z. "Downregulation of MIRNA-1/MIRNA-133 contributes to re-expression of pacemaker channel genes HCN2 and HCN4 in hypertrophic heart". *J. Biol. Chem.* 2008;283:20045–52.
80. Bostjancic E, Zidar N, Stajer D, Glavac D. MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-208 are dysregulated in human myocardial infarction. *Cardiology.* 2010;115:163-9.
81. Dykxhoorn DM, Wu Y, Xie H, Yu F, Lal A, Petrocca F, Martinvalet D, Song E, Lim B, Lieberman J. miR-200 enhances mouse breast cancer cell colonization to form distant metastases. *PLoS One.* 2009.
82. Czúcz J, Cervenak L, Föhrécz Z, Gombos T, Pozsonyi Z, Kunde J, Karádi I, Jánoskúti L, Prohászka Z. Serum soluble E-selectin and NT-proBNP levels additively predict mortality in diabetic patients with chronic heart failure. *Clin Res Cardiol.* 2011 Jul;100:587-94.
83. Lockyer P, Schisler JC, Patterson C, Willis MS. Minireview: Won't get fooled again: the nonmetabolic roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in the heart. *Mol Endocrinol.* 2010 Jun;24:1111-9. Review.
84. Lulla RR, Costa FF, Bischof JM, Chou PM, de F Bonaldo M, Vanin EF, Soares MB. Identification of Differentially Expressed MicroRNAs in Osteosarcoma. *Sarcoma.* 2011;2011:732690.

85. Bostjancic E, Zidar N, Glavac D. MicroRNA microarray expression profiling in human myocardial infarction. *Dis Markers*. 2009;27:255-68.
86. van der Vliet HN, Sammels MG, Leegwater AC, Levels JH, Reitsma PH, Boers W, Chamuleau RA. Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration. *J Biol Chem*. 2001 Nov;276:44512-20.
87. Xiping Z, Jie Z, Qin X, Guanghua F, Yang C, Tongfa J, Qi X. Influence of baicalin and octreotide on NF-kappaB and p-selectin expression in liver and kidney of rats with severe acute pancreatitis. *Inflammation*. 2009 Feb;32:1-11.
88. Duchateau PN, Pullinger CR, Cho MH, Eng C, Kane JP. Apolipoprotein L gene family: tissue-specific expression, splicing, promoter regions; discovery of a new gene. *J Lipid Res*. 2001 Apr;42:620-30.
89. Ii H, Hatakeyama S, Tsutsumi K, Sato T, Akiba S. Group IVA phospholipase A2 is associated with the storage of lipids in adipose tissue and liver. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2008 Jun;86:12-7.
90. Bonci D. MicroRNA-21 as therapeutic target in cancer and cardiovascular disease. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*. 2010 Nov;5:156-61. Review.
91. Jiang J, Gusev Y, Aderca I, Mettler TA, Nagorney DM, Brackett DJ, Roberts LR, Schmittgen TD. Association of MicroRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival. *Clin Cancer Res*. 2008 Jan;14:419-27.
92. Majid S, Dar AA, Saini S, Yamamura S, Hirata H, Tanaka Y, Deng G, Dahiya R. MicroRNA-205-directed transcriptional activation of tumor suppressor genes in prostate cancer. *Cancer*. 2010 Dec 15;116:5637-49.
93. Tamás G, Szabadics J, Somogyi P. Cell type- and subcellular position-dependent summation of unitary postsynaptic potentials in neocortical neurons. *J Neurosci*. 2002 Feb 1;22:740-7.
94. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, Bright IJ, Lucero MY, Hiddessen AL, Legler TC, Kitano TK, Hodel MR, Petersen JF, Wyatt PW, Steenblock ER, Shah PH, Bousse LJ, Troup CB, Mellen JC, Wittmann DK, Erndt NG, Cauley TH, Koehler RT, So AP, Dube S, Rose KA, Montesclaros L, Wang S, Stumbo DP, Hodges SP, Romine S, Milanovich FP, White HE,

Regan JF, Karlin-Neumann GA, Hindson CM, Saxonov S, Colston BW. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem*. 2011 Nov 15;83:8604-10.

95. Petrik J, Coste J, Fournier-Wirth C. Advances in transfusion medicine in the first decade of the 21st century: Advances in miniaturized technologies. *Transfus Apher Sci*. 2011 Aug;45:45-51.

96. Tsui NB, Kadir RA, Chan KC, Chi C, Mellars G, Tuddenham EG, Leung TY, Lau TK, Chiu RW, Lo YM. Noninvasive prenatal diagnosis of hemophilia by microfluidics digital PCR analysis of maternal plasma DNA. *Blood*. 2011 Mar 31;117:3684-91.

97. Woyke T, Tighe D, Mavromatis K, Clum A, Copeland A, Schackwitz W, Lapidus A, Wu D, McCutcheon JP, McDonald BR, Moran NA, Bristow J, Cheng JF. One bacterial cell, one complete genome. *PLoS One*. 2010 Apr 23;5:e10314.

98. Shen F, Du W, Kreutz JE, Fok A, Ismagilov RF. Digital PCR on a SlipChip. *Lab Chip*. 2010 Oct 21;10:2666-72.

99. Gubern C, Hurtado O, Rodríguez R, Morales JR, Romera VG, Moro MA, Lizasoain I, Serena J, Mallolas J. Validation of housekeeping genes for quantitative real-time PCR in in-vivo and in-vitro models of cerebral ischaemia. *BMC Mol Biol*. 2009 Jun 16;10:57.

100. Nelissen K, Smeets K, Mulder M, Hendriks JJ, Ameloot M. Selection of reference genes for gene expression studies in rat oligodendrocytes using quantitative real time PCR. *J Neurosci Methods*. 2010 Mar 15;187:78-83.

101. Karayannis T, Elfant D, Huerta-Ocampo I, Teki S, Scott RS, Rusakov DA, Jones MV, Capogna M. Slow GABA transient and receptor desensitization shape synaptic responses evoked by hippocampal neurogliaform cells. *J Neurosci*. 2010 Jul 21;30:9898-909.

102. Li G, Luna C, Qiu J, Epstein DL, Gonzalez P. Role of miR-204 in the regulation of apoptosis, endoplasmic reticulum stress response, and inflammation in human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 May 6;52:2999-3007.

103. Ohuchida K, Mizumoto K, Kayashima T, Fujita H, Moriyama T, Ohtsuka T, Ueda J, Nagai E, Hashizume M, Tanaka M. MicroRNA expression as a predictive marker for gemcitabine response after surgical resection of pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol*. 2011 Aug;18:2381-7.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni a doktori munkám elkészítésével kapcsolatban:

- Témavezetőmnek, **Dr. Puskás Lászlónak**, aki TDK hallgató koromtól fogva mindvégig messzemenően támogatott és mind a kutatás, mind az eredmények publikálása során folyamatos segítséget nyújtott.
- **Dr. Fehér Liliána** tudományos munkatársnak, aki rengeteg szakmai segítséget nyújtott a kísérletek kivitelezése és kiértékelése során.
- **Dr. Zvara Ágnesnek**, aki mindvégig hasznos szakmai tanácsokkal látott el és megismertetett az alapvető molekuláris technikákkal.
- **Dr. Ózsvári Bélának** és **Nagy Lajosnak** a sejtes és mikroszkópos munkákban nyújtott segítségét, valamint, hogy munkám során nemcsak szakmailag, de barátilag is mindvégig támogattak.
- **Dr. Tamás Gábornak és kutatócsoportjának**, akik az idegsejteken végzett mérésekhez a mintákat biztosították.
- **Dr. Kocsis Ágnes Katalinnak** az idegsejtek molekuláris vizsgálata során nyújtott technikai segítségét és töretlen lelkesedését.
- **Csapóné Török Rozália** és **Lehőcz Istvánné** asszisztenseknek a sejtenyészési és a nukleinsav izolálási munkákban nyújtott segítségét.
- Az **MTA SZBK Funkcionális Genomika Labor** és az **Avidin Kft** valamennyi munkatársának közreműködését, támogatását.
- Végül, de nem utolsó sorban köszöneti illeti **családomat** az évek során nyújtott támogatásukért, türelmükért és biztatásukért.

11. PUBLIKÁCIÓS LISTA

(*az értekezéshez közvetlenül kapcsolódó közlemények)

- *1. **Faragó N**, Fehér LZ, Kitajka K, Das UN, Puskás LG. MicroRNA profile of polyunsaturated fatty acid treated glioma cells reveal apoptosis-specific expression changes. *Lipids Health Dis.* 2011 Sep 30;10:173.
2. Fabian G, **Farago N**, Feher LZ, Nagy LI, Kulin S, Kitajka K, Bito T, Tubak V, Katona RL, Tiszlavicz L, Puskas LG. High-Density Real-Time PCR-Based in Vivo Toxicogenomic Screen to Predict Organ-Specific Toxicity. *Int J Mol Sci.* 2011;12:6116-34.
3. **Faragó N**, Kocsis GF, Fehér LZ, Csont T, Hackler L Jr, Varga-Orvos Z, Csonka C, Kelemen JZ, Ferdinandy P, Puskás LG. Gene and protein expression changes in response to normoxic perfusion in mouse hearts. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2008 Mar-Apr;57:145-54.
- *4. **Faragó N**, Zvara Á, Varga Z, Ferdinandy P, Puskás LG. Purification of high-quality micro RNA from the heart tissue. *Acta Biol Hung.* 2011 Dec;62:413-25.
- *5. **Nóra Faragó**, Ágnes K. Kocsis, Sándor Lovas, Gábor Molnár, Eszter Boldog, Lajos I. Nagy, Gábor Tamás, László G. Puskás. Digital PCR to determine the number of transcripts from single neurons after patch-clamp recording. Submitted in 2012.
- *6. Gábor Molnár, **Nóra Faragó**, Ágnes K. Kocsis, Márton Rózsa, Sándor Lovas, Eszter Boldog, Éva Csajbók, János Gardi, László G. Puskás and Gábor Tamás. An identified local source of insulin in the cerebral cortex. Submitted in 2011 (co-first-author).

POSZTEREK

Effects of AC907, a new thalidomide analog on glioblastoma cells. /Debrecen, 2008

Nóra Faragó, Liliána Z. Fehér, Iván Kanizsai, Ferhan Ayaydin, Balázs Hegedűs, and László G. Puskás

Optimization of global gene expression method for profiling of 10-30 cells. /Szeged, 2009

Nóra Faragó, Eszter Boldog, Gábor Tamás, László G. Puskás

Global gene expression profile of identified neurogliaform interneurons in the neocortex.

/Budapest, 2010

Eszter Boldog, **Nóra Faragó**, Márton Rózsa, Enikő Vámos, Szabolcs Oláh, Viktor Szemenyei, Sándor Lovas, László Puskás, Gábor Tamás

miRNS expresszióváltozás kimutatása DNS-chip és nanokapilláris QRT-PCR technikával glioblasztóma sejteken. /Budapest, 2010

Faragó Nóra, Ózsvári Béla, Hegedűs Balázs, Puskás László

Alacsony intenzitású, hosszan tartó testmozgás hatása a metabolikus betegség kialakulására ható gének aktivitására. /Pécs, 2010

Faragó Nóra, Puskás László, Ménesi Dalma, Zvara Ágnes, Vári Beáta, Szász András, László Ferenc

Digital PCR to determine the number of transcripts from single neurons after patch-clamp recording. /Szeged, 2012

Nóra Faragó, Ágnes K. Kocsis, Sándor Lovas, Gábor Molnár, Eszter Boldog, Lajos I. Nagy, Gábor Tamás, László G. Puskás

12. FÜGGELÉK

		GBM2							GBM5							U373						
	ASSAY	AA100	AA50	DHA100	DHA50	GLA100	GLA50	TMZ100	AA100	AA50	DHA100	DHA50	GLA100	GLA50	TMZ100	AA100	AA50	DHA100	DHA50	GLA100	GLA50	TMZ100
1	hsa-let-7a	-0,27	0,06	-0,05	n.d.	0,15	0,80	-0,62	0,55	-0,30	-0,70	-0,45	-0,01	-0,18	-0,83	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	hsa-let-7b	0,90	0,91	-0,74	-0,06	n.d.	n.d.	-8,60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-1,93	-0,84	-8,47	n.d.	-0,34	-1,57	-0,72	-2,54	-0,58	-1,21
3	hsa-let-7c	-0,36	-0,63	-0,58	-0,27	-1,02	-0,40	-0,93	-0,79	-0,74	-0,79	-0,49	-3,41	-2,37	-1,91	0,62	0,56	-0,49	-0,32	-1,86	-1,13	-0,99
4	hsa-let-7d	-0,39	-0,16	-0,57	-0,91	-0,25	-0,24	-0,37	1,89	1,83	1,73	2,00	-0,11	-0,57	0,52	2,08	1,91	-0,28	-0,17	0,06	-0,65	0,51
5	hsa-let-7e	1,04	0,98	-0,14	-0,34	1,33	1,55	0,97	1,33	2,10	1,30	1,25	-2,50	-2,75	-2,67	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6	hsa-let-7f	-0,79	0,11	0,32	-0,27	-0,25	0,53	-0,25	-2,57	-0,36	-1,34	-1,05	n.d.	n.d.	0,23	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
7	hsa-let-7g	0,88	0,53	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,42	0,49	-1,41	-1,62	0,08	-0,89	2,40	-4,72	-2,82	3,13	2,86	n.d.	n.d.	-6,09
8	hsa-miR-1	-1,25	-1,17	-0,33	-0,84	-0,39	0,15	-0,46	-0,44	0,70	-0,48	-0,50	0,66	0,44	6,16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
9	hsa-miR-100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-2,56	-2,62	-1,65	n.d.	-0,72	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-1,17	-2,04	n.d.
10	hsa-miR-101	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,34	n.d.	-2,75	-2,11
11	hsa-miR-103	-0,68	-0,29	-1,29	-0,55	-0,78	-0,70	-1,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,63	0,64	n.d.	1,57	-1,35	n.d.	-1,85
12	hsa-miR-105	-0,68	-0,34	-0,08	-0,69	-0,23	0,00	-0,09	2,54	0,94	1,16	0,81	0,41	0,80	0,96	0,70	0,25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
13	hsa-miR-106a	0,17	-0,79	-1,93	-3,45	-0,90	-0,91	-0,59	-0,57	-0,48	0,05	0,11	n.d.	n.d.	-1,98	0,41	0,81	n.d.	-2,73	-3,22	n.d.	-3,97
14	hsa-miR-106b	-0,66	-0,99	-2,16	-2,00	-0,42	-0,44	-1,28	2,12	0,93	4,01	4,59	2,98	0,91	0,56	-0,38	-0,30	n.d.	n.d.	-4,91	n.d.	n.d.
15	hsa-miR-107	-0,30	-0,06	-0,73	-0,39	-0,14	-0,05	-0,56	0,16	0,91	2,30	2,95	n.d.	n.d.	n.d.	0,27	0,49	n.d.	n.d.	-1,92	n.d.	-2,43
16	hsa-miR-10a	-0,16	0,17	-0,59	-0,92	0,06	-0,06	-0,23	0,44	0,43	0,27	0,54	0,10	0,44	-0,40	0,81	0,37	-3,76	-0,39	-0,88	0,24	-1,94
17	hsa-miR-10b	-0,44	-0,15	-0,40	-0,75	-0,11	-0,07	-0,35	0,01	-0,62	-0,51	0,01	-1,93	-2,09	-0,36	n.d.	n.d.	0,21	0,25	3,05	0,50	-0,74
18	hsa-miR-122	-0,70	1,00	0,80	-1,00	-0,09	-0,05	0,44	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
19	hsa-miR-125b	0,73	-0,01	0,31	0,67	n.d.	n.d.	n.d.	-4,51	-3,90	-4,48	-1,90	4,07	n.d.	-2,40	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
20	hsa-miR-126	-0,80	-0,21	-8,37	-4,99	-0,53	-0,13	-0,16	0,78	0,52	0,52	0,66	-0,66	0,52	-3,66	0,82	0,11	n.d.	n.d.	-1,86	n.d.	-1,16
21	hsa-miR-127	-0,56	-0,76	n.d.	n.d.	-0,87	-0,66	-0,50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
22	hsa-miR-128a	-1,22	0,35	-0,52	0,04	-0,18	-0,21	-0,30	0,96	0,57	0,76	0,55	-1,24	n.d.	-3,29	-0,40	-0,08	n.d.	-2,49	-3,99	n.d.	-1,87
23	hsa-miR-129	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,53	-0,06	n.d.	n.d.	-8,75	n.d.	n.d.
24	hsa-miR-130a	-0,76	0,05	n.d.	n.d.	-0,31	-0,09	-0,56	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
25	hsa-miR-130b	-0,72	0,06	-2,47	n.d.	-0,66	-0,12	0,59	-5,21	-6,93	-5,31	-3,86	-0,97	-0,10	0,06	0,66	0,37	0,26	0,30	0,67	0,91	0,63
26	hsa-miR-132	0,88	-0,06	n.d.	n.d.	-0,48	0,85	0,94	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,73	-0,40	0,40	3,88	2,92	2,84	2,98	2,36	2,31	1,67
27	hsa-miR-133a	0,19	0,64	0,87	-0,37	-0,07	0,61	0,78	-0,23	-0,12	-0,32	0,36	0,15	-0,44	0,93	0,21	0,11	0,60	-0,03	-0,08	1,06	0,15
28	hsa-miR-133b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,32	0,81	0,67	0,07	-0,70	0,04	-0,62	2,02
29	hsa-miR-135a	n.d.	n.d.	1,40	n.d.	n.d.	n.d.	-1,65	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,68	0,52	-0,01	-0,43	n.d.	n.d.	0,51
30	hsa-miR-136	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
31	hsa-miR-137	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,06	-0,39	-0,38	-0,51	0,10	-0,69	-0,78
32	hsa-miR-138	2,23	-0,37	0,95	n.d.	-0,80	-0,31	0,72	n.d.	-2,06	n.d.	-4,24	-0,87	-0,85	-0,08	3,88	3,41	3,49	3,78	1,08	0,74	0,46
33	hsa-miR-140-3p	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,20	1,73	1,75	1,76	2,01	2,38	1,90
34	hsa-miR-141	-0,57	-0,04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,24	-0,24	n.d.	n.d.	-0,65	-0,61	-1,13	0,42	0,12	3,68	3,00	1,98	2,72	1,25
35	hsa-miR-143	-1,28	0,33	-1,52	-0,90	0,25	n.d.	-0,37	-1,76	-1,50	-1,19	-1,33	-1,78	-1,87	-0,14	0,68	0,73	1,63	2,71	-0,05	0,09	-0,50
36	hsa-miR-145	-5,70	-4,30	-7,35	-2,37	-2,72	0,26	-0,77	-2,19	-2,82	-2,35	-1,35	0,01	-0,92	n.d.	0,61	0,14	2,57	2,43	0,59	1,60	0,53
37	hsa-miR-146a	n.d.	n.d.	-1,54	-0,86	-1,63	-0,01	-2,62	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
38	hsa-miR-146b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,80	-0,95	-0,99	-0,98	0,40	-0,28	-0,98	0,24	0,45	0,69	0,49	-0,15	0,15	0,34
39	hsa-miR-148a	-0,40	-0,24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,52	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
40	hsa-miR-149	0,47	-0,40	-0,06	-0,01	-0,87	-0,60	1,20	-3,84	-3,82	-2,15	-1,19	1,51	0,06	1,61	0,89	0,73	0,65	0,37	0,95	0,97	1,36
41	hsa-miR-150	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,66	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
42	hsa-miR-152	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8,88	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
43	hsa-miR-153	0,47	-0,93	n.d.	n.d.	0,27	-0,40	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
44	hsa-miR-155	-0,53	-0,53	-0,72	-0,38	0,06	0,48	0,48	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
45	hsa-miR-15a	-0,17	-0,06	-1,13	-1,16	-0,73	-0,33	-0,56	0,09	0,97	0,25	0,27	-0,77	-5,55	-1,62	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
46	hsa-miR-15b	-0,58	-0,17	-0,78	-0,64	-0,66	-0,19	-0,60	-0,40	0,01	-0,07	-0,06	-2,70	-3,90	-2,58	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
47	hsa-miR-16	-0,29	0,51	-0,78	0,22	n.d.	n.d.	-3,78	n.d.	n.d.	3,50	3,43	-0,75	n.d.	-1,13	n.d.	n.d.	-0,01	0,13	-0,15	0,22	-1,87
48	hsa-miR-17	-1,29	-1,08	-0,87	-0,78	-1,34	-0,29	-1,28	0,01	0,72	0,80	0,58	-4,07	-4,96	-1,30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
49	hsa-miR-181a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,83	0,75	-0,55	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,10	0,08	-0,93	1,50	-0,33	-0,38	0,55	3,59	3,00	-0,09
50	hsa-miR-182	0,58	-0,80	-0,43	0,40	-0,31	0,01	2,42	-0,22	-0,09	-1,46	-1,62	-0,01	-0,60	1,06	0,70	0,47	0,81	0,65	0,40	0,21	0,23
51	hsa-miR-183	0,32	-0,84	0,60	0,80	n.d.	4,02	-1,09	3,66	2,13	n.d.	n.d.	0,15	-0,22	-3,89	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
52	hsa-miR-184	-0,56	0,14	0,25	0,29	n.d.	4,04	-0,40	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-1,98	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
53	hsa-miR-185	0,52	0,59	-0,50	0,18	-0,73	-0,73	0,04	-1,98	-0,89	-1,36	-0,31	0,92	0,57	0,03	0,92	0,78	0,39	0,58	0,45	0,65	0,33
54	hsa-miR-18a	-0,36	0,59	-0,23	-0,46	0,03	-0,27	-0,48	0,02	0,79	0,59	0,74	-1,03	-1,18	-1,28	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
55	hsa-miR-191	-0,27	0,83	1,31	-0,58	0,24	-0,43	1,28	-1,43	-1,36	-0,31	-0,15	1,00	-0,23	-2,38	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
56	hsa-miR-192	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,72	0,11	0,29	0,68	0,65	0,21	0,26
57	hsa-miR-194	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
58	hsa-miR-196b	0,15	-0,07	-0,78	-0,69	-0,42	0,13	-1,81	-0,14	0,77	-0,66	0,11	0,51	-0,46	-0,17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
59	hsa-miR-197	-0,65	-0,83	-0,16	0,68	-0,88	0,43	-2,53	-0,10	-0,86	n.d.	n.d.	0,58	-0,88	0,85	0,01	0,78	2,07	1,42	2,57	2,67	-0,37
60	hsa-miR-198	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,03	-0,37	-1,69	-2,11	-1,80	-1,50	-1,61	-1,83	0,34	-5,82
61	hsa-miR-199a	0,14	-0,87	-0,92	-0,87	n.d.	5,22	1,62	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,60	-0,26	5,63	0,77	-0,69	0,25	0,91	1,48	0,02	-0,65
62	hsa-miR-19a	0,44	-0,17	-0,72	-0,65	0,37	0,72	0,82	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-2,39	-0,73	-0,50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

63	hsa-miR-19b	n.d.	n.d.	n.d.	7,79	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,47	0,68	-3,27	n.d.	n.d.	n.d.	7,38	-3,95	3,16	n.d.
64	hsa-miR-200a	3,40	3,62	n.d.	n.d.	9,66	8,88	0,78	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,53	0,98	4,64	-8,92	-3,53	-5,11	-7,75	-2,98	-5,51	-4,76
65	hsa-miR-200c	-3,74	-1,06	0,05	-0,12	1,28	-0,01	0,03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
66	hsa-miR-203	0,71	1,00	2,78	2,44	-18,98	-13,08	-4,79	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
67	hsa-miR-204	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,34	-0,01	0,10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
68	hsa-miR-205	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
69	hsa-miR-206	0,39	-0,49	-2,29	-0,29	-3,46	-2,37	-1,22	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,25	1,41	2,20	n.d.	2,42	-2,86	0,73	0,75	-0,08	4,01
70	hsa-miR-208	-1,97	-0,79	0,21	-0,55	-1,29	-2,44	-0,46	0,93	0,08	3,19	0,74	3,80	2,63	4,82	n.d.	1,08	n.d.	n.d.	n.d.	2,15	-0,06
71	hsa-miR-20a	0,76	0,59	-0,62	-0,33	-1,90	-1,60	-0,32	-0,56	0,26	-0,04	0,49	-3,25	-1,06	-3,06	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
72	hsa-miR-20b	3,58	3,25	-0,41	0,40	n.d.	n.d.	-2,47	4,11	3,85	1,18	1,28	-0,64	0,53	0,86	0,73	-0,01	2,62	4,19	-0,94	0,20	0,06
73	hsa-miR-21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,63	0,91	0,92	0,90	-2,02	-1,19	-0,27	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
74	hsa-miR-210	0,69	-0,29	-0,74	-0,43	-1,19	7,09	2,22	n.d.	-4,42	n.d.	n.d.	0,33	-0,33	0,85	0,67	-0,15	0,31	-0,20	0,83	0,78	0,17
75	hsa-miR-214	n.d.	n.d.	-2,19	n.d.	-0,47	0,65	0,18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,91	0,93	0,56	0,98	0,07	0,02	0,81
76	hsa-miR-219	0,08	0,42	n.d.	n.d.	1,74	0,78	-0,24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
77	hsa-miR-22	0,01	-0,16	0,57	-0,95	-3,54	-2,27	-3,39	-1,09	-1,17	-1,86	-0,66	-2,07	-1,01	-0,08	-2,52	-2,23	-1,22	-0,71	0,46	0,36	0,08
78	hsa-miR-221	-0,39	-0,23	-0,07	-0,76	0,32	-0,30	0,08	3,79	1,34	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
79	hsa-miR-222	-0,32	0,41	-0,71	-0,95	2,23	2,16	0,90	-0,93	0,15	-0,77	0,35	n.d.	-2,30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-4,78	n.d.	-7,92	n.d.
80	hsa-miR-223	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
81	hsa-miR-224	0,27	0,24	-0,92	-0,32	-1,47	-2,41	-0,97	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,37	0,55	1,80	0,90	2,18	1,47	0,40
82	hsa-miR-23a	0,26	0,87	n.d.	n.d.	-0,59	-0,99	-2,23	-0,66	-0,21	0,06	-0,24	n.d.	n.d.	5,57	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
83	hsa-miR-23b	-0,77	-0,59	-2,13	n.d.	-0,97	-0,40	-0,98	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
84	hsa-miR-24	3,26	3,18	n.d.	7,37	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,65	-0,64	0,75	0,16	0,72	n.d.	n.d.	n.d.	1,97	n.d.	-6,55	n.d.
85	hsa-miR-25	-2,62	-1,15	-4,06	-1,40	-2,00	-1,22	-1,27	-1,33	0,09	-0,93	0,15	n.d.	n.d.	-3,33	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
86	hsa-miR-26a	-0,87	-0,09	-0,77	-0,27	-0,36	0,32	-0,57	3,51	3,96	3,59	4,30	-0,84	0,28	-0,01	5,66	5,63	1,69	-0,42	3,17	n.d.	2,85
87	hsa-miR-27a	0,06	-0,07	0,42	0,58	-0,51	-0,50	-0,49	3,77	4,57	3,84	4,43	-1,00	-0,97	0,18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
88	hsa-miR-27b	-0,07	0,65	-0,47	-0,02	-0,11	0,05	-0,47	-0,18	0,39	0,82	1,22	n.d.	n.d.	0,24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
89	hsa-miR-29a	3,20	4,86	5,43	4,61	n.d.	n.d.	-5,47	n.d.	n.d.	1,38	0,47	0,24	0,69	-0,79	-2,64	0,43	n.d.	5,99	0,36	-0,79	-0,07
90	hsa-miR-29b	0,16	0,85	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-5,19	-6,51	n.d.	n.d.	0,12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
91	hsa-miR-29c	0,85	0,89	-4,50	-2,03	-1,75	-2,06	-2,41	n.d.	-0,14	-2,36	-1,82	-3,83	-1,45	-0,37	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
92	hsa-miR-30b	0,10	-0,78	-1,89	-1,47	-0,53	-0,20	-0,56	0,00	0,36	0,11	0,74	n.d.	n.d.	-1,25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
93	hsa-miR-30c	-2,79	-2,92	-4,09	-4,93	-2,48	-2,07	-2,11	-3,88	-3,86	-4,82	-3,19	n.d.	n.d.	-4,27	-2,50	-4,70	n.d.	2,58	-6,85	n.d.	-10,13
94	hsa-miR-31	n.d.	n.d.	-0,15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,16	0,00	0,46	-0,33	0,23	-4,69	n.d.	-4,13	-4,39	-4,23
95	hsa-miR-32	n.d.	n.d.	n.d.	1,20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,64	-0,49	2,55	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
96	hsa-miR-320	-0,65	0,02	-0,06	-0,65	0,39	0,03	-0,33	n.d.	-4,40	n.d.	n.d.	0,84	0,07	0,79	1,41	1,75	1,82	1,88	n.d.	n.d.	n.d.
97	hsa-miR-323-3p	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,92	-0,38	-0,03	1,91	1,40	1,62	1,53	1,81	2,25	1,92
98	hsa-miR-328	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-2,13	-0,09	-0,96	-3,04	-0,45	-2,88	0,04	-0,82	0,68	-1,52
99	hsa-miR-328	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,05	-0,15	0,29	0,98	0,24	0,95	0,42	1,95	2,37	-1,51
100	hsa-miR-331	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-1,36	n.d.	-0,41	-0,08	-0,64	-0,42	-0,20	-0,64	0,98	0,19
101	hsa-miR-335	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,55	0,83	0,10	-0,09	-0,45	1,12	0,62	-0,27
102	hsa-miR-34a	6,43	5,88	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,60	0,00	0,03	0,45	-4,71	-3,80	-0,21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,84	n.d.	n.d.
103	hsa-miR-372	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,34	-0,24	0,67	0,39	0,31
104	hsa-miR-375	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,63	-0,17	-0,53	-0,55	n.d.
105	hsa-miR-382	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,95	-0,61	-0,45	n.d.
106	hsa-miR-451	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-0,07	n.d.	n.d.	n.d.	-1,70	0,50	0,13	2,58	-0,29	-0,80	0,45	-0,68	-0,30	-0,32	-0,70
107	hsa-miR-9	0,32	-0,84	-2,11	-1,04	-1,48	-0,44	-0,64	0,13	0,60	0,34	0,64	-2,70	-0,99	0,39	1,75	1,80	0,39	0,63	1,25	0,72	0,41
108	hsa-miR-92a	-0,45	-0,17	-0,71	-0,47	-0,27	-0,63	-0,64	2,47	2,00	2,33	2,49	-0,07	-0,99	0,31	1,34	1,07	n.d.	4,15	0,08	-0,86	-0,32
109	hsa-miR-98	0,06	0,16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
110	mmu-miR-124a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
111	mmu-miR-93	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-1,84	-1,38	-3,75	-1,84	-2,96	-0,82	-2,06
112	mmu-miR-96	0,38	-0,89	0,62	-0,72	0,69	0,05	-2,89	n.d.	-8,25	-0,25	0,08	-3,24	-3,21	-2,24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

**1. kiegészítő táblázat. miRNS expressziós változások detektálása glioblasztóma sejteken
HTS-QRT-PCR technikával**

HEART					LIVER				HEART					LIVER			
ASSAY	Oleic (H)	EPA (H)	DPA (H)	DHA (H)	Oleic (L)	EPA (L)	DPA (L)	DHA (L)		Oleic (H)	EPA (H)	DPA (H)	DHA (H)	Oleic (L)	EPA (L)	DPA (L)	DHA (L)
hs.ole.H7a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	13.09	13.04	12.62	13.73	hs.mil.R-194	21.70	21.32	21.70	21.50	13.64	14.11	13.55	14.03
hs.ole.H7b	10.29	10.58	10.14	10.03	10.89	11.50	11.40	11.21	hs.mil.R-195a	16.82	17.54	n.d.	15.67	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
hs.ole.H7c	18.22	18.65	18.01	17.96	13.77	13.46	13.77	13.92	hs.mil.R-197	18.38	17.77	19.14	17.43	18.55	19.15	18.43	18.90
hs.ole.H7d	12.71	11.99	12.47	12.14	10.56	10.56	10.67	10.75	hs.mil.R-198	19.47	20.48	20.99	21.24	17.19	17.27	16.64	18.02
hs.ole.H7e	16.45	16.51	16.36	15.88	9.85	10.95	10.62	11.07	hs.mil.R-199a	23.35	22.42	22.91	23.53	16.16	15.75	15.37	15.43
hs.ole.H7f	20.01	19.15	19.73	19.42	18.95	19.44	19.82	19.09	hs.mil.R-19a	20.59	n.d.	20.66	20.81	11.41	10.87	10.71	11.01
hs.ole.H7g	18.16	18.15	18.43	18.82	11.81	11.49	12.72	11.84	hs.mil.R-19b	14.61	15.01	15.51	15.07	n.d.	n.d.	11.04	10.27
hs.mil.R-1	n.d.	20.60	20.79	n.d.	15.51	15.26	15.49	15.34	hs.mil.R-200a	17.88	22.13	19.14	19.46	16.13	16.17	17.14	17.24
hs.mil.R-100	18.29	17.95	17.39	17.72	16.12	17.11	16.28	15.34	hs.mil.R-200c	12.52	13.15	13.98	11.88	15.93	15.81	14.92	15.77
hs.mil.R-101	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	hs.mil.R-203	21.09	21.09	17.73	n.d.	15.91	15.32	15.73	15.77
hs.mil.R-103	19.80	19.98	18.88	20.32	15.99	16.49	16.56	15.65	hs.mil.R-204	14.82	15.72	15.26	15.05	20.16	20.97	20.90	20.31
hs.mil.R-105	20.57	20.85	20.71	19.96	14.61	14.10	15.25	14.21	hs.mil.R-205	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10.69	12.43	12.67	n.d.
hs.mil.R-105a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	16.20	15.31	15.45	15.66	hs.mil.R-206	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	15.95	16.68	15.65	16.06
hs.mil.R-105b	20.93	n.d.	21.51	19.94	20.55	20.51	20.55	20.88	hs.mil.R-208	n.d.	17.08	16.53	17.13	13.20	12.41	13.70	13.89
hs.mil.R-107	23.59	23.52	22.96	23.98	17.43	18.43	18.16	19.36	hs.mil.R-20a	17.62	17.57	17.97	17.47	10.70	11.09	10.51	11.39
hs.mil.R-10a	23.13	23.99	22.43	23.44	12.73	13.01	12.78	13.01	hs.mil.R-20b	11.43	11.54	11.61	11.72	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
hs.mil.R-10b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	21.93	22.08	22.28	21.80	hs.mil.R-21	18.79	18.28	19.13	18.28	9.62	10.47	10.93	11.10
hs.mil.R-122	21.53	20.82	21.22	21.21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	hs.mil.R-210	19.48	19.80	20.38	20.43	16.30	15.96	16.35	16.63
hs.mil.R-125b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	13.51	13.60	14.33	12.36	hs.mil.R-214	17.50	17.68	17.18	17.37	15.20	15.36	15.77	15.43
hs.mil.R-125	10.21	9.59	9.63	11.21	9.04	11.08	9.22	11.91	hs.mil.R-219	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	19.75	n.d.	20.12	19.67
hs.mil.R-127	12.04	12.53	12.13	11.05	19.15	18.60	19.58	19.69	hs.mil.R-22	17.97	17.10	17.67	17.47	13.32	12.86	13.94	13.41
hs.mil.R-128a	12.46	13.53	12.87	12.32	21.78	22.32	22.65	21.59	hs.mil.R-221	11.65	11.37	11.29	11.89	14.43	14.26	14.56	14.01
hs.mil.R-129	21.66	22.16	21.01	22.46	n.d.	11.48	n.d.	11.40	hs.mil.R-222	13.52	13.49	14.13	13.21	20.80	21.15	20.85	21.63
hs.mil.R-130a	21.25	21.28	21.67	21.94	10.97	11.71	10.99	11.53	hs.mil.R-223	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	14.37	13.84	13.81	14.70
hs.mil.R-130b	19.20	n.d.	20.46	20.79	15.57	15.32	16.04	15.64	hs.mil.R-224	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	23.54	23.44	n.d.	23.47
hs.mil.R-132	12.97	12.98	13.33	13.70	17.00	17.69	16.91	16.34	hs.mil.R-23a	19.22	18.90	19.97	19.73	11.13	11.91	11.93	11.96
hs.mil.R-133a	14.11	13.50	14.46	14.56	17.09	17.46	16.70	16.68	hs.mil.R-23b	n.d.	22.34	n.d.	22.07	16.80	16.62	16.61	16.51
hs.mil.R-133b	18.59	17.28	19.18	17.30	12.58	10.93	10.58	10.97	hs.mil.R-24	18.94	17.55	19.42	18.98	11.45	11.75	11.49	11.96
hs.mil.R-135a	17.94	17.30	n.d.	17.29	18.96	20.58	19.08	n.d.	hs.mil.R-25	20.25	20.71	20.88	20.22	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
hs.mil.R-136	20.37	20.99	19.77	20.71	13.44	13.53	13.78	13.45	hs.mil.R-25a	21.22	21.35	21.47	21.59	16.44	15.57	15.88	15.70
hs.mil.R-137	20.48	20.60	20.68	19.73	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	hs.mil.R-27a	20.42	19.58	19.99	n.d.	14.54	14.97	15.05	14.69
hs.mil.R-138	10.88	10.54	10.68	11.37	22.12	22.50	22.47	22.12	hs.mil.R-27b	22.48	23.25	22.18	21.13	14.18	14.68	15.12	14.62
hs.mil.R-140-3p	21.89	21.72	21.61	21.22	17.60	18.47	17.01	n.d.	hs.mil.R-28a	16.04	16.04	15.62	16.49	17.76	n.d.	17.08	17.38
hs.mil.R-141	17.21	17.64	17.79	18.21	14.04	14.04	15.03	13.41	hs.mil.R-28b	19.82	n.d.	20.73	19.96	22.04	22.51	22.04	22.04
hs.mil.R-143	15.67	15.98	15.83	15.21	12.22	12.30	13.00	12.23	hs.mil.R-29c	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	19.26	19.72	19.31	18.91
hs.mil.R-145	10.86	11.38	11.36	11.16	11.48	12.07	11.68	11.33	hs.mil.R-30b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
hs.mil.R-146a	14.95	15.80	16.13	16.15	12.81	13.24	12.82	12.29	hs.mil.R-30c	18.95	19.03	18.09	18.74	11.32	12.34	12.07	12.71
hs.mil.R-146b	5.88	5.70	6.38	5.43	11.32	11.30	11.74	11.30	hs.mil.R-31	15.86	15.49	16.49	14.83	10.70	10.70	10.69	11.09
hs.mil.R-148a	14.82	13.69	n.d.	15.94	11.26	11.89	11.06	12.74	hs.mil.R-32	20.00	20.45	20.46	20.38	n.d.	n.d.	12.70	12.25
hs.mil.R-149	11.41	12.39	11.10	11.66	12.63	n.d.	n.d.	n.d.	hs.mil.R-32a	18.15	18.39	18.28	18.41	16.28	16.68	15.82	15.64
hs.mil.R-150	19.67	20.13	21.42	21.74	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	hs.mil.R-323-3p	8.57	8.75	8.69	10.11	21.09	21.39	21.59	21.88
hs.mil.R-152	20.59	19.62	18.55	19.57	18.95	19.55	19.23	18.54	hs.mil.R-325	21.55	21.67	21.67	21.65	13.01	13.46	13.97	13.21
hs.mil.R-153	21.49	22.41	21.63	22.36	11.80	12.27	12.51	12.04	hs.mil.R-328	n.d.	18.78	19.40	19.93	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
hs.mil.R-155	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11.24	11.30	11.49	11.24	hs.mil.R-331	19.26	19.62	19.09	19.48	17.38	17.25	17.28	17.08
hs.mil.R-15a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	16.52	16.37	16.71	16.53	hs.mil.R-335	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	14.89	16.06	17.06	16.65
hs.mil.R-19b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	18.34	19.23	18.03	17.54	hs.mil.R-34a	20.24	19.48	20.69	20.34	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
hs.mil.R-16	14.80	15.03	15.21	14.66	12.64	13.52	12.51	13.27	hs.mil.R-372	21.61	22.81	22.28	22.11	20.84	20.38	20.03	20.23
hs.mil.R-17	19.92	19.24	20.62	20.05	9.64	10.50	9.57	10.47	hs.mil.R-375	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	20.04	19.27	20.16	19.50
hs.mil.R-181a	20.15	19.47	n.d.	19.70	18.98	18.38	19.47	19.23	hs.mil.R-382	19.57	19.72	19.52	19.14	14.45	13.66	14.91	14.10
hs.mil.R-182	19.68	n.d.	19.49	20.15	12.95	13.62	13.26	12.49	hs.mil.R-451	19.80	20.69	20.51	19.40	14.88	15.10	15.09	14.24
hs.mil.R-183	19.08	18.70	19.14	18.37	15.75	16.55	15.94	15.91	hs.mil.R-9	13.09	12.68	13.23	13.26	11.10	12.05	11.70	10.31
hs.mil.R-184	23.71	23.71	23.03	23.96	19.76	19.63	20.82	20.71	hs.mil.R-92a	16.43	16.87	16.65	16.55	12.00	11.81	11.63	11.91
hs.mil.R-185	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	21.82	22.25	22.50	22.05	hs.mil.R-98	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
hs.mil.R-18a	17.93	17.45	17.87	18.54	15.58	15.43	15.40	15.26	mm.mil.R-124a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	13.27	13.83	14.26	14.16
hs.mil.R-191	5.62	5.05	5.21	4.94	10.88	10.53	10.23	11.21	mm.mil.R-93	12.18	12.57	12.45	11.76	10.37	9.65	10.74	10.79
hs.mil.R-192	20.08	20.47	20.50	20.80	16.32	15.34	15.74	16.40	mm.mil.R-96	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	17.41	17.02	16.97	16.64

2.kiegészítő táblázat miRNS expressziós változások többszörösen telítetlen zsírsavakkal etetett patkányok szív és májszövetében

Jelölt neve: Faragó Nóra Katalin

Doktori iskola (Program): SZTE TTIK, Biológia Doktori Iskola

Közlemény címe: Purification of high-quality micro RNA from the heart tissue.

Szerzői: Faragó N, Zvara A, Varga Z, Ferdinandy P, Puskás LG.

Megjelenés helye, ideje: Acta Biologica Hungarica. 2011

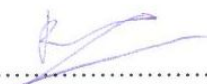
Nyilatkozat

Alulírottak kijelentjük, hogy a fenti közleményben megjelent és a Jelölt által a Szegedi Tudományegyetemre benyújtott Ph.D. értekezésben felhasznált tudományos eredmények eddig nem szerepeltek más Ph.D. értekezés tudományos eredményei között. Tudomásul vesszük, hogy a fenti tudományos eredmények a jövőben nem szerepelhetnek más Ph.D. értekezés eredményei között.

Faragó Nóra Katalin (jelölt)


.....

Dr. Puskás László (témavezető, társszerző)


.....

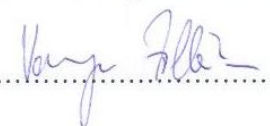
Dr. Ferdinándy Péter (társszerző)


.....

Dr. Zvara Ágnes (társszerző)


.....

Dr. Varga Zoltán (társszerző)


.....

Szeged, 2012, 01.13.

Jelölt neve: Faragó Nóra Katalin

Doktori iskola (Program): SZTE TTK, Biológia Doktori Iskola

Közlemény címe: MicroRNA profile of polyunsaturated fatty acid treated glioma cells reveal apoptosis-specific expression changes.

Szerzői: Faragó N, Fehér LZ, Kitajka K, Das UN, Puskás LG.

Megjelenés helye, ideje: Lipids in health and disease. 2011.


Nyilatkozat

Alulírottak kijelentjük, hogy a fenti közleményben megjelent és a Jelölt által a Szegedi Tudományegyetemre benyújtott Ph.D. értekezésben felhasznált tudományos eredmények eddig nem szerepeltek más Ph.D. értekezés tudományos eredményei között. Tudomásul vesszük, hogy a fenti tudományos eredmények a jövőben nem szerepelhetnek más Ph.D. értekezés eredményei között.

Faragó Nóra Katalin (jelölt)



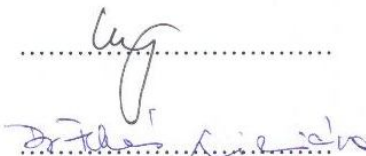
Dr. Puskás László (témavezető, társszerző)



Dr. Kitajka Klára (társszerző)



Dr. Fehér Liliána (társszerző)



Szeged, 2012, 01.13.