

Összefoglalás

Az utóbbi években a transzkriptómikai vizsgálatokban alkalmazott technológiák fejlődésének köszönhetően a genom kutatás területén jelentős előrehaladás figyelhető meg. A disszertáció **első fejezete** ezen technológiákról, a génexpresszió szabályozásáról, és a szabályozás vizsgálatához használt modellekről ad átfogó képet. A transzkriptómikában alkalmazott technológiák fényt derítettek néhány prokarióta és eukarióta szervezet transzkriptómájának komplexitására, továbbá bizonyos fejlődési és patológiás folyamatok molekuláris hátterére. Számos high-throughput technikát fejlesztettek már ki a transzkriptómikában, melyek alapvetően két csoportba sorolhatóak: a mikrochip alapú és a szekvenálás alapú eljárások, melyek mindegyike lehetőséget biztosít az átfogó vizsgálatokra. A mikrochip analízis széles körben használt technológia, mely több ezer transzkript egyidejű vizsgálatára képes. Bár a mikrochipek sok biológiai probléma megoldásában hasznosnak bizonyultak, a hibridizáció és a chipre felvitt, előre meghatározott szekvenciájú próbák hátrányt jelentenek a transzkriptómikai vizsgálatok során. Az új-generációs szekvenálási technikák kifejlesztésével ezen hátrányokat legyőzve több millió transzkript szimultán detektálására van lehetőség. A két technika egymást kiegészítő eljárásként használható a genom vizsgálatára, melyek nem csak átfedő, de az egyes módszerek tulajdonságából következő specifikus eredményeket is hoznak. Transzkriptómikai elemzések elengedhetetlenül fontosak a génexpresszió szabályozásának vizsgálatánál. A génexpresszió több szinten szabályzott, egészen a transzkripciótól a fehérjék poszt-transzlációs módosításáig. Az utóbbi években fény derült arra, hogy ebben a szabályozásban nagy szerepet játszanak a kisméretű nem-kódoló RNS-ek, mint például a mikroRNS-ek (miRNS). A miRNS-ek negatívan szabályozzák a mRNS transzlációját vagy stabilitását. Számos biológia folyamatban bizonyították már szerepüket, így például a fejlődés valamint az immunrendszer működése során. A miRNS-ek megváltozott expresszióját mutatták ki különböző betegségek, mint például a fertőző betegségek és a rák esetében. Annak érdekében, hogy jobban megismerjük ezen megbetegedések patogenezisét, fontos tudnunk, mely miRNS-ek expressziója változott meg az egyes esetekben. Az egyes betegségek következtében megváltozott mRNS és miRNS expressziós vizsgálatokhoz *in vitro*, és *in vivo* modelleket is használnak. A zebrahal egy gyakran alkalmazott gerinces modellszervezet, melyet fejlődésbiológiai, embriogenenezist érintő, valamint újabban immunológiai kísérletekben használnak köszönhetően annak, hogy immunrendszere jelentős hasonlóságot mutat a humánéval. Az utóbbi években a zebrahal, az emlős állatmodellek mellett, egy kiváló modellszervezetnek bizonyult számos fertőző betegség és a tumoros megbetegedés vizsgálatában.

Kihhasználva a transzkriptómikában megjelenő újfajta technológiai lehetőségeket, valamint alkalmazva a zebrahalat, mint modellszervezetet ez a doktori disszertáció a fertőző betegségek és tumoros megbetegedések során bekövetkező transzkriptómikai változások vizsgálatát és annak eredményeit foglalja össze, valamint betekintést nyújt a miRNS-ek szabályzó funkciójába.

A **második fejezetben** elsőként mutatjuk be a fertőző megbetegedések során bekövetkező transzkriptómikai változásokat, melyet a Solexa/Illumina rendszer úgynevezett digitális génexpresszió (DGE vagy Tag-Seq) technológiájával vizsgáltunk, mely egy szekvencia mintavételezésen alapuló, ún. tag-alapú transzkriptóm szekvenálási technika. Ebben a tanulmányban a humán tuberkulózist modellező *Mycobacterium marinum* fertőzés során fellépő változásokat vizsgáltuk zebrahalban. Kontrol és fertőzött halak esetében is két-két könyvtárat hoztunk létre, melyek bizonyították a technikai reprodukálhatóságot. Az eljárással könyvtáranként 5-8 millió tag-et detektáltunk, melyek lefedték a transzkript adatbázisokban található összes gén több mint 70%-át. A szignifikánsan megváltozott tag szekvenciák az adatbázis transzkriptjeinek 2%-ára térképeződtek. A Tag-Seq analízis nem csak kvantitatív információt nyújt a génexpresszióról, hanem a transzkriptek irányultságáról is tájékoztat. Vizsgálatunk során a tag-ek közel 40%-a térképeződött az antiszensz szálra, mely megegyezik más tanulmányokkal. Azonban, mivel a szignifikánsan megváltozott tag-ek nagy része a szensz szálra térképeződött, és bár az antiszensz jelenségre egyre több bizonyíték létezik, de biológiai jelentősége még nehezen értelmezhető, a továbbiakban csak a szensz transzkripteket tanulmányoztuk.

Annak érdekében, hogy bizonyítsuk a Tag-Seq technológiával nyert eredményeink helyességét, egy korábban, különböző típusú mikrochip kísérletek során felállított, mikobaktérium által regulált gének referencialistájával hasonlítottuk össze Tag-Seq eredményünket. Az összehasonlítás erős korrelációt mutatott alátámasztva a kétféle módszer összehasonlíthatóságát, másrésztől azonban felfedte az egyes eljárások hátrányait is. Ezért a két technika egymást kiegészítő eljárásnak tekinthető. A mikrochip mellett qPCR segítségével is ellenőriztünk egyes megváltozott tag szekvenciák expresszióját. Ezek a Tag-Seq eredményeket igazolták olyan esetekben is, ahol elmentés expressziót mutatott a Tag-Seq és mikrochip technika. Ezenkívül bemutattuk, hogy a Tag-Seq technológia milyen más értékes információt nyújthat a kutató számára. Használható együttesen szabályzott transzkriptek vizsgálatára, prediktált génmodellek megerősítésére, fertőzés által indukált izoforma-változás vizsgálatához, újabb, mikobaktérium által regulált transzkriptek detektálására és térképezésére. Összefoglalva tehát bemutattuk, hogy a Solexa/Illumina digitális génexpressziós rendszere egy igen alkalmas technológia a transzkriptómikai analízisek során, kvantifikációs és komplexitási vizsgálatokhoz egyaránt.

A **harmadik fejezetben** tag-alapú szekvenálást (Tag-Seq) és teljes transzkript szekvenálást (RNA-Seq) alkalmazva végeztünk transzkriptómikai analízist olyan 1 napos zebrahal embriók esetében, amelyeket *Salmonella enterica* serovar Typhimuriummal (*S. typhimurium*) fertőztünk 8 órával a vizsgálat előtt. Egy korábbi mikrochip kísérletben a *S. typhimurium*-mal fertőzött embriók transzkriptómikai vizsgálatakor számos gyulladást okozó gén indukcióját mutattuk ki. A Tag-Seq és a mikrochip kísérletek eredményeit összehasonlítva 165 olyan transzkriptet találtunk, mely mindkét esetben változást mutatott. A Tag-Seq és a RNA-Seq összehasonlításával 241 mindkét esetben egyaránt megváltozott expressziójú transzkriptet azonosít-

tottunk, így elsőként demonstráltuk a két módszer hasonló teljesítményét fertőzés során fellépő transzkriptómikai változások vizsgálatakor. Egyesítve a szekvenálás alapú és a mikrochip alapú transzkriptóm vizsgálatok eredményeit összeállítottunk egy annotált referencia génlistát, mely zebrahal embriókban fertőzés következtében megváltozik. Ide tartoznak a transzkripció faktorokat, szignál transzdukciós fehérjéket, citokineket és kemokineket, komplement faktorokat, apoptózisban és proteolízisben részt vevő fehérjéket, anti-mikrobiális aktivitással bíró fehérjéket kódoló gének, valamint számos olyan ismert és nem ismert gén, amelyet eddig nem hoztak összefüggésbe az immunválasszal. Ezenkívül összehasonlítottuk a *S. typhimurium*-mal fertőzött zebrahal embriókkal végzett kísérlet Tag-Seq adatait a második fejezetben leírt *M. marinum*-mal fertőzött kifejllett zebrahalakkal végzett kísérlet Tag-Seq adataival, mivel mindkét esetben erős gyulladási immunválaszt figyeltünk meg. Összesen 206 fertőzés következtében megnövekedett expressziójú gént azonosítottunk, melyek a természetes immunválasszal részvevő transzkripció faktorok és jelátviteli komponensek, valamint olyan gének, melyeket eddig nem kötöttek az immunválasz folyamatához. Ezzel a transzkriptómikai analízissel egy értékes referencialistát állítottunk össze, mely a további, zebrahal és patogén kapcsolatát tanulmányozó vizsgálatban hasznos lehet.

A **negyedik fejezetben** célul tűztük ki, hogy megismerjük a miRNS-ek fertőzéses megbetegedések esetén betöltött szerepét a gerincesek immunrendszerében. *M. marinum* és *S. typhimurium* bakteriális patogénnel fertőzött kifejllett zebrahalakat, valamint embriókat alkalmaztunk, hogy modellezzük az egyes humán betegségeket. Azzal, hogy mind embrionális, mind pedig kifejllett egyedeket használtunk, meghatározhattuk, hogy az egyes miRNS-ek a természetes vagy a szerzett immunválasszal játszhatnak szerepet, hiszen az embriókban csak a természetes immunitás van kifejlődve. Egyedi tervezésű mikrochipet alkalmazva számos közös, fertőzésre reagáló miRNS-t sikerült azonosítanunk zebrahalban, beleértve a miR-21, miR-146 és a miR-181 családot. Ezek konzerváltságát, immunrendszerben való közreműködését, illetve tumorok kifejlődésében való szerepét humánban és más emlősben több egyéb kísérlet is jól bizonyítja. Azonban ez a tanulmány hozza kapcsolatba elsőként ezen miRNS-eket mikobaktérium és szalmonella fertőzésekkel. Továbbá eredményeink azt a korábbi feltevést is igazolják, miszerint azonos miRNS-ek vehetnek részt az immunrendszer és a tumoros folyamatok szabályozásában.

A miR-146 család természetes immunitásban betöltött szerepét már korábban bizonyították emberben és állat modellekben. Eredményeink megegyeznek ezekkel az adatokkal, hiszen a miR-146 a/b expresszió növekedést mutatott fertőzés következtében a kifejllett halakban és az embriókban egyaránt, melyeknél csak a természetes immunrendszer van kifejlődve. Feltételezések szerint a miR-146 a/b természetes immunválasszal betöltött szerepe a TLR és az IL1R szignalizáció szabályozásában lehet, amely a patogének felismerésében és a természetes immunválasz aktiválásában jelentős. Annak érdekében, hogy megtudjuk, hogy a miR-146 funkciója konzervált-e zebrahalban, azonosítottuk a család prediktált célgénjeit. Ezek között találtuk a TLR

és IL1R szignalizációs útvonalakban részt vevő *irak1* és *traf6* gént, mely emlősökben is a miR-146 a/b célgénje. Ezenkívül találtunk vélt miR-146 a/b kötődési pontokat a zebrahal MyD88 génjén, mely a két szignalizációs útvonal közös adaptere. A miR-146 bakteriális fertőzés hatására bekövetkező indukciója összhangban áll a második és harmadik fejezetben leírt mRNS expressziós adatokkal, ezzel demonstrálva néhány TLR szignalizációs gén, effektor gén és azok szabályzó génjeinek indukálódását fertőzés hatására zebrahalban. Tehát eredményeink alátámasztják azt a feltevést, hogy a miRNS-ek fontos feed-back mechanizmusként szerepet játszanak az immunválasz pontos szabályozásában. Ezenkívül bioinformatikai szoftverek segítségével azonosítottunk további prediktált miR-146 célgént. A legtöbb gén, mely konzervált a humán és a zebrahal között, közreműködik az immunrendszer egyes folyamataiban, így például az apoptózisban, az NF-KB transzkripció faktor aktivitását szabályozásában, hemosztázisban, fertőzés során, T-sejtek fejlődésében és funkciójában, TLR szignalizációban, valamint tumor fejlődésében. Összességében tehát ez a tanulmány megerősítést ad arról, hogy a zebrahal egy megfelelő modellszervezet a gerincesek immunrendszerében részt vevő miRNS-ek funkciójának vizsgálatára, hiszen számos bakteriális fertőzésben résztvevő konzervált miRNS-t, valamint számos konzervált miRNS célgént azonosítottunk.

Az **ötödik fejezetben** célunk az volt, hogy megtudjuk, hogy a miRNS-ek milyen szerepet töltenek be a rák mechanizmusában, ezért azonosítottuk azokat a miRNS-eket, amelyek szerepet játszhatnak a májtumor kialakulásában zebrahalak esetében. A zebrahal ígéretes modellnek bizonyult a májtumor modellezésében, hiszen molekulárisan nagyon hasonlít a humán hepatocelluláris karcinómára (HCC). Annak érdekében, hogy kiderítsük, hogy ez a hasonlóság, konzerváltság megtalálható-e a miRNS expresszió szintjén is, miRNS transzkriptómikai analízist végeztünk zebrahalból nyert, karcinogénnel indukált májtumor mintákkal. Összehasonlítottuk a zebrahalban általunk azonosított és a humán HCC-vel korábban kapcsolatba hozott szignifikánsan megváltozott expressziójú miRNS-eket, és összeállítottunk azoknak a listáját, melyek mindkét szervezetben deregulációt mutattak. Ide sorolható a megnövekedett expressziójú miR-21, miR-23a, miR-146a/b, miR-221 és miR-222, valamint a csökkent expressziójú miR-1 és miR-122. Ezeken felül kimutattunk olyan miRNS-eket is, amelyeket eddig még csak másfajta humán tumoros megbetegedéssel kapcsolatban publikáltak, és amelyek részt vesznek a tumor képződésében, tumor szuppresszióban, apoptózisban, sejtosztódásban, differenciációban, invázióban és metasztázisban. Az érett miRNS-ek mellett bizonyos esetekben megváltozott expressziót figyeltünk meg a miRNS hajtű-struktúra másik karjánál is, illetve olyan szekvenciák esetében is, amelyek újabb miRNS-eket vagy másfajta nem-kódoló RNS struktúrákat reprezentálhatnak. Eredményeink tehát igazolják, hogy a zebrahal májtumor megfelelően modellezi a humán májtumort, valamint hogy az Agilent mikrochip technológiával lehetőség van újabb, vélt miRNS-eket expressziójának kimutatására.

Ezt követően összehasonlítottuk a májtumorral összefüggésbe hozott miRNS-ek listáját azon miRNS-ekkel, melyek mikobaktérium fertőzés hatására indukálódtak (4.

fejezet). A közösen megjelenő miRNS-ek, a miR-15, miR-16, miR-21, miR-34, és miR-146 család, megerősítik azt a nézetet, miszerint sok miRNS, amely szerepet játszik az immunválaszban, annak szerepe van a tumoros folyamatokban is.

Végül, vizsgáltuk a tumorban résztvevő miRNS-ek célgénjeinek lehetséges konzerváltságát. Elvégeztük a humán májtumorban közreműködő miRNS-ek kísérletesen is bizonyított célgénjeinek funkcionális annotációját, amely azt mutatta, hogy ezek a gének részt vesznek különböző tumorról kapcsolatos folyamatokban, szignalizációs útvonalakban. A homológ zebrahal géneknél végzett miRNS kötő hely prediktáció azt mutatta, hogy néhány miR-146 család célgén (*IRAK1*, *TRAF6*, *IRF5*), miR-221/222 család célgén (*CDKN1B*, *CDKN1C*, *KIT*) és miR-1 család célgén (*GJA1*, *PDCD4*, *TPM4*, *LASP1*, *TMSB4X*, *RABL2A*, *RABL2B*) konzervált lehet humán és zebrahal között. Ezek a gének mind az immunrendszerben, mind pedig a tumoros folyamatokban szerepet játszanak, így például a sejtciklus szabályozásban, sejtosztódásban, apoptózisban, sejtadhezióban, sejtmozgásban, citoskeletális organizációban, valamint immunválasszal és tumorról kapcsolatos szignalizációs útvonalakban, a MAPK, NF- κ B, p53, ErbB szignalizációban, és a kis GTPáz-hoz kapcsolt szignál transzdukciós útvonalakban. Ezek az eredmények alátámasztják a zebrahal és humán májtumor hasonlóságát, valamint azt a hipotézist, miszerint a miRNS-ek fontos szerepet játszhatnak mindkét organizmusban a tumorról kapcsolatos mechanizmusok szabályzásában. MiRNS tanulmányunk tehát a zebrahal és humán májtumor közti hasonlóság újabb szintjét mutatja be a génexpresszió és a transzkripció faktorok általi transzkripció szabályzáson túl.

Összefoglalva, a tézisben leírt tanulmányaink alátámasztják azt, hogy a zebrahal alkalmas a fertőző és a tumoros megbetegedések modellezésére, valamint alkalmasak a miRNS-eknek a gerincesek immunrendszerében és egyes megbetegedésekben betöltött szabályzó funkciójának vizsgálatára. Bemutattuk, hogy az újgenerációs szekvenálási eljárás, a Solexa/Illumina digitális génexpressziós rendszere (DGE vagy Tag-Seq) jól alkalmazható a gerincesek fertőzésre adott immunválaszának transzkriptómiai vizsgálatára, és mint egy kiegészítő technológiaként használható a mikrochip alapú eljárások mellett. Továbbá bemutattuk, hogy egy másik újgenerációs szekvenálási technika, az RNA-Seq ugyancsak megfelelő a fertőzésekre adott transzkriptómiai változások elemzésére. A szekvenálás alapú és a mikrochip alapú transzkriptómiai adatok egyesítésével egy értékes referencialistát állítottunk össze azokból a génekből, melyek expressziója a fertőzés következtében változott meg zebrahalban. Ez a génlista nemcsak jól ismert, a gerinces immunválaszban részvevő géneket tartalmaz, hanem olyanokat is, amelyeket eddig még nem figyeltek meg fertőző betegségeknél, viszont értékes információkat rejthetnek a gazda-patogén kölcsönhatásban betöltött szerepüket illetően. Ezenkívül összeállítottuk azon miRNS listáját, amelyek fertőzésekben és a májtumor folyamatában egyaránt közreműködnek, és konzerváltságot mutatnak humán és zebrahal közt, mindezzel megerősítve azt, hogy közös miRNS-ek vehetnek részt az immunválasz és a tumor kialakulásának szabályzásában. Tanulmányainkban végzett mRNS és miRNS transzkriptómiai adatok ala-

pul szolgálhatnak a jövőben olyan vizsgálatokhoz, melyek a zebrahalat a fertőző és rákos megbetegedések modellezésére kívánják alkalmazni.