

NEM KANONIKUS MIKRORNS-EK: A HUMÁN MIRTRON BIOGENEZIS ÚTVONAL KARAKTERIZÁLÁSA

Doktori értekezés

Schamberger Anita

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

KLASSZIKUS ÉS MOLEKULÁRIS GENETIKA DOKTORI PROGRAM



Doktori Iskola vezetője:	dr. Erdei Anna
Programvezető:	dr. Vellai Tibor
Témavezető:	dr. Sarkadi Balázs
Konzulens:	dr. Orbán Tamás

Magyar Tudományos Akadémia, Természettudományi Kutatóközpont
Molekuláris Farmakológiai Intézet

Budapest

2013

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
1. BEVEZETÉS.....	6
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
2.1. A mikroRNS-ek	8
2.1.1. Kanonikus mikroRNS biogenezis és nevezéktan	9
2.1.2. A megfelelő kis RNS-ek RISC-be épülése	12
2.1.3. MikroRNS közvetített szabályozási mechanizmusok	15
2.1.4. A „szabályozó szabályozása”: a mikroRNS funkció finomhangolása	19
2.1.5. Alternatív mikroRNS biogenezis útvonalak.....	23
2.2. Mirtronok	27
2.2.1. A mirtronok felfedezése és biogenezise	27
2.2.2. <i>Tailed</i> mirtronok	29
2.2.3. Mirtronok előfordulása és jellemzői.....	30
3. CÉLKITŰZÉSEK	32
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	33
4.1. Bioinformatikai analízis és statisztika	33
4.2. Plazmidok létrehozása	33
4.2.1. Baktérium törzsek és transzformálás	33
4.2.2. Genomi DNS izolálás.....	34
4.2.3. Polimeráz láncreakció (PCR).....	34
4.2.4. <i>Sleeping Beauty</i> transzpozonos vektorok klónozása.....	36
4.2.5. shRNS-t kifejező vektor és luciferáz szenzorok klónozása.....	37
4.3. Sejttenyésztés, transzfekció és sejtvonalak létrehozása	37
4.4. Luciferáz esszé	38
4.5. RNS izolálás és kis RNS Northern blot	39
4.6. Kis RNS reverz transzkripció és kvantitatív RT-PCR	39
5. EREDMÉNYEK	41
5.1. Prediktált humán és <i>Drosophila</i> mirtronok vizsgálata emlős sejtvonalakban.....	41
5.1.1. A vizsgálandó szekvenciák kiválasztása.....	41
5.1.2. Prediktált mirtronok kifejeződésének vizsgálata eredeti genomi környezetből.....	43
5.1.3. Funkcionális teszt: génexpressziót gátló képesség vizsgálata	45

5.1.4. Prediktált mirtronok heterológ szekvencia környezetben történő vizsgálata.....	49
5.2. Stabil mikroRNS expresszió létrehozása a <i>Sleeping Beauty</i> transzpozon alapú géntovábbviteli rendszer segítségével	54
5.3. A humán mirtron biogenezis vizsgálata	57
5.3.1. Humán mirtron szekvenciákból történő miRNS és splicing függésének vizsgálata	58
5.3.2. A humán mirtron biogenezis Drosha/DGCR8 komplextől való függetlenségének igazolása.....	61
5.4. Humán mirtron eredetű érett mikroRNS-ek direkt módon történő kimutatása.....	63
5.4.1. Northern blot technika	63
5.4.2. Kvantitatív stem-loop RT-PCR optimalizáció.....	65
5.4.2.1. A reverz transzkripciót érintő elővizsgálatok	66
5.4.2.2. A DNS szennyezés hatásának vizsgálata az érett mikroRNS kimutatására.....	68
5.4.3. Érett mikroRNS-ek kimutatása kvantitatív RT-PCR-el	71
6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	73
6.1. A humán mirtron biogenezis vizsgálata.....	73
6.2. Az emlős mirtronok jellemzői.....	75
6.3. Az emlős mirtron szekvenciák lehetséges szabályozó szerepe	76
6.4. Kvantitatív stem-loop RT-PCR optimalizálása érett miRNS-ek kimutatására.....	78
7. ÖSSZEFOGLALÁS	79
8. SUMMARY	80
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	81
10. PUBLIKÁCIÓS LISTA	82
10.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	82
10.2. Az értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó közlemények	82
11. IRODALOMJEGYZÉK	83
12. MELLÉKLET	104
12.1. Klónozó primerek és mirtron oligonukleotidok	104
12.2. Luciferáz szenzor oligonukleotidok	106
12.3. Northern blot próbák	107
12.4. Splicing predikciók.....	108
12.5. FACS adatok.....	108

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A: adenin

AGO: Argonauta fehérje

ATP: adenzin trifoszfát

bp: bázispár

C: citozin

cdNS: RNS reverz transzkripciójával előállított DNS (*complementary DNA*)

CLIP: keresztkötés és immunoprecipitáció (*Crosslinking and Immunoprecipitation*)

Ct érték: kvantitatív PCR során mért azon fluoreszcencia küszöbérték (ciklusszám), ahol már jelentős mennyiségi változást észlelünk

DGCR8: *DiGeorge syndrome critical region gene 8*

DNáz: dezoxiribonukleáz (*deoxyribonuclease*)

EGFP: erősített zöld fluoreszcens fehérje (*enhanced green fluorescent protein*)

FACS: fluoreszcencia aktivált sejtválogatás (*fluorescence activated cell sorting*)

G: guanin

gDNS: genomikus DNS (*genomic DNA*)

GW182: sokszoros glicin (G)- triptofán (W) ismétlődést tartalmazó 182 kiló Dalton fehérje

HEK-293: emberi embrionális vese 293 sejtvonala (*human embryonic kidney 293*)

HeLa: méhnyakrák sejtvonala (*Henrietta Lacks*)

HUES9: emberi embrionális őssejt 9 (*human embryonic stem cell 9*)

IR/DR: fordított ismétlődés/közvetlen ismétlődés (*inverted repeat/direct repeat*)

kDa: kiló Dalton

LNA: *locked nucleic acid*

Loqs: *Loquacious* fehérje

Loqs-PD: a Loqs PD izoformája

MDCKII: Madin-Darby kutya vese sejtvonala (*Madin-Darby canine kidney, subclone*)

MEF: egér embrionális fibroblaszt sejtvonala (*mouse embryonic fibroblast*)

miRISC: mikroRNS-indukált csendesítő komplex (*miRNA-induced silencing complex*)

miRNS: mikroRNS (*microRNA*)

mRNS: hírvivő ribonukleinsav (*messenger ribonucleic acid*)

nt: nukleotid (*nucleotide*)

piRNS: *Piwi-interacting RNA*

pre-miRNS: prekursor miRNS forma (*precursor miRNA*)

pri-miRNS: elsődleges miRNS átírat forma (*primary miRNA*)

qRT-PCR: kvantitatív valós idejű (*real-time*) reverz transzkripció polimeráz
láncreakció (*quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*)

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

RNAi: RNS interferencia

SA: splice akceptor

SD: splice donor

SD: standard deviáció

SEM: standard hiba, a középérték közepes hibája (*standard error of the mean*)

shRNS: rövid hajtú-szerkezetű RNS (*short hairpin RNA*)

siRNS: kis interferáló RNS (*small interfering RNA*)

snoRNP: kis nukleoláris ribonukleoprotein (*small nucleolar ribonucleoprotein*)

snoRNS: kis nukleoláris RNS (*small nucleolar RNA*)

snRNS: kis magi RNS (*small nuclear RNA*)

TRBP: *trans-activation response RNA-binding protein*

tRFs: tRNS-eredetű RNS fragmentumok (*tRNA-derived RNA fragments*)

tRNS: transzfer RNS

tsRNAs: tRNS-eredetű kis RNS-ek (*tRNA-derived small RNAs*)

U: uracil

U6: kis magi RNS, az U6 kis magi ribonukleoprotein része

UTR: nem transzlálódó régió

3' UTR: 3' nem transzlálódó régió (*3' untranslated region*)

1. BEVEZETÉS

Az elmúlt évtizedek talán egyik legjelentősebb molekuláris biológiai felfedezése az RNS interferencia leírása volt, amely forradalmasította a génkifejeződés szabályozásáról kialakult korábbi elképzeléseinket. Az RNS biológia tudományterület kutatása ennek köszönhetően új lendületet kapott, eredményei fényében újra kell gondolnunk az RNS molekulák sejten belüli – és kívüli – szerepéről eddig kialakult képet.

Az RNS interferencia (RNAi) specifikus, kis RNS-ek által közvetített géncsendesítési mechanizmusának leírása *C. elegans*-ban történt 1998-ban [1], bár a jelenséggel összefüggő megfigyelések – különböző néven említve, prokariótákban, vírussal fertőzött/ transzgenikus növényekben, ill. *Neurospora*-ban – sokkal korábbra nyúlnak vissza [2-6]. Az RNS interferencia jelentőségét méltatja, hogy Andrew Z. Fire és Craig C. Mello 2006-ban orvosi Nobel-díjat kaptak a leírásáért.

Az RNAi napjainkig megismert különféle útvonalainak közös jellemzője, hogy a génextpresszióra kifejtett hatás mindig egy – az Argonauta fehérjék családjába tartozó – fehérjébe ágyazott egyszálú, ~20-30 nukleotid hosszúságú kis RNS molekulán keresztül valósul meg [7]. Ezek a kis RNS-ek a szekvencia komplementaritáson keresztül jelölik ki az effektor fehérjék számára a cél nukleinsavat. Az RNAi mechanizmusait az élőlények legkülönbözőbb csoportjaiban, egysejtűekben és többsejtűekben egyaránt leírták. Ezeknek a mechanizmusoknak egy része a genom védelmét biztosítja az invazív nukleinsavak ellen, más részük pedig az endogén gének expresziójának szabályozásában vesz részt. Az RNAi hatásmechanizmusa a legtöbb esetben gátló jellegű, transzkripcionális, illetve poszt-transzkripcionális szinteken is megvalósulhat: hatással lehet a kromatin struktúrára, a kromoszóma szegregációra, a transzkripcióra, az RNS-ek processzáldására és stabilitására, valamint a translációra [8].

Az RNAi-t közvetítő kis RNS molekulák származásukat tekintve lehetnek endogén vagy exogén eredetűek. Különböző prekursorokból keletkezhetnek, biogenezisüknek és szabályozási mechanizmusaiknak egyre részletesebb megismerése még napjainkban is tart. A számos tagot számláló reguláló kis RNS-ek legjelentősebb képviselői az siRNS-ek, a mikroRNS-ek és a piRNS-ek [8-11].

Az RNS interferencia mediátorai közül talán a miRNS-ek állnak a leginkább a figyelem középpontjában. Ezek a kis nem kódoló RNS-ek esszenciális szerepet töltenek be a génjeink szabályozásában, így nem meglepő, ha napjainkban ez az egyik

legintenzívebben kutatott tudományterület. PhD munkám keretében egy speciális miRNS keletkezési útvonal, a mirtron biogenezis vizsgálatát tűztem ki célul emlős sejtekben. Ebből kifolyólag, a teljesség igénye nélkül, a továbbiakban csak a miRNS-eket érintő irodalom egy része kerül részletesebb tárgyalásra, nem kisebbítve ezzel a többi RNS interferencia útvonal biológiai jelentőségét.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A mikroRNS-ek

A mikroRNS-ek (miRNS) első képviselőit 1993-ban, *C. elegans*-ban fedezték fel [12; 13]. Azóta a törzsfajlás legkülönbözőbb szintjeit képviselő egyszélű, ill. többszélű élőlényekből (algák, növények, alacsonyabbrendű állatok, emlősök stb.) is kimutatták őket [9]. Intenzív kutatásuknak és a molekuláris biológiai technikák fejlődésének köszönhetően máig összesen 206 különböző fajból 30424 érett miRNS-t mutattak ki (www.mirbase.org; 2013. június). Számuk emberben jelenleg 2578-ra tehető, és becslések szerint génjeink ~50%-a áll a szabályozásuk alatt (www.mirbase.org; [14]).

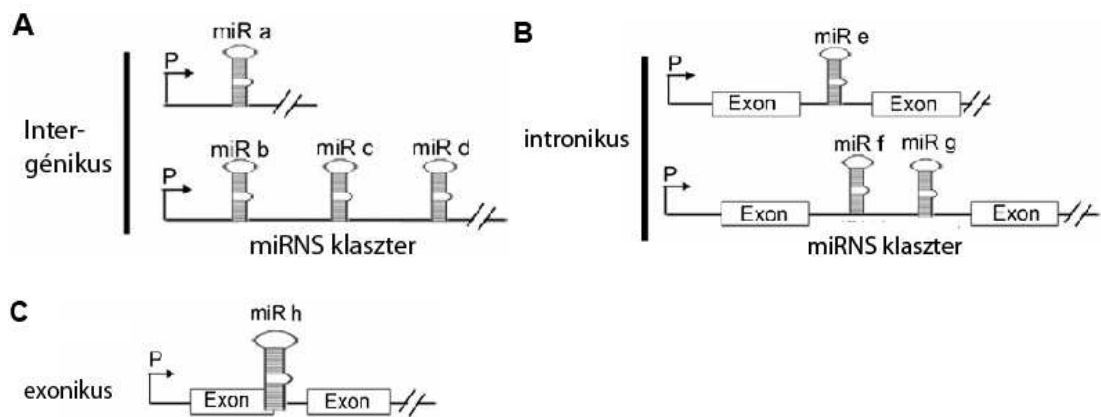
A miRNS-ek kb. 20-24 nukleotid (nt) hosszúságú, egyszálú, nem kódoló kis RNS-ek, amelyek a legtöbb esetben a hírvivő RNS-ekre (mRNS) irányuló gátláson keresztül fejtik ki hatásukat (transzlációs blokk és/vagy mRNS degradáció). A génexpresszió szabályozásának egy teljesen új szintjét képviselik, a transzkripciós faktorokéhoz mérhető génszabályozási hálózatot alkotnak. A génkifejeződés általuk megvalósított ún. finomhangolását segíti, hogy egy miRNS általában több mRNS-t is szabályozhat, illetve egy adott mRNS több miRNS szabályozása alatt is állhat [8; 15].

A miRNS-ek biológiai jelentősége sokrétű: részt vesznek szinte az összes sejten belüli folyamat, többek között az egyedfejlődés, a sejtproliferáció, a sejt differenciáció és az apoptózis szabályozásában, működési zavarai pedig szerepet játszhatnak különböző betegségek, többek között daganatok és különféle anyagcserezavarok patomechanizmusában [8; 14; 16]. A különböző organizmusokra egyedi miRNS mintázat jellemző. Sok miRNS szövet-, ill. fejlődési stádium specifikusan fejeződik ki, így többek között hozzájárulnak a sejt típus specifikus fehérje expresszióhoz is. Az elmúlt évek tanulmányai szerint a különböző miRNS-ek expressziójának zavara szerepet játszhat neurológiai [17; 18], szív- és érrendszeri [19], reumatikus megbetegedésekben [20], illetve rákban [21]. A fentiek fényében nem meglepő, hogy az orvostudomány megpróbálja a miRNS-eket biomarkerként alkalmazni a klinikai diagnosztikában és a személyre szabott gyógyászatban [22].

A növényi és állati mikroRNS-ek éréseben és hatásmechanizmusában sok hasonló vonást, ugyanakkor sok különbséget is találunk mind a résztvevő faktorokat, mind a mechanizmusokat tekintve. A továbbiakban - ha nincs külön kiemelve másként - állati, azon belül is főként emlős miRNS-ekről lesz szó.

2.1.1. Kanonikus mikroRNS biogenezis és nevezéktan

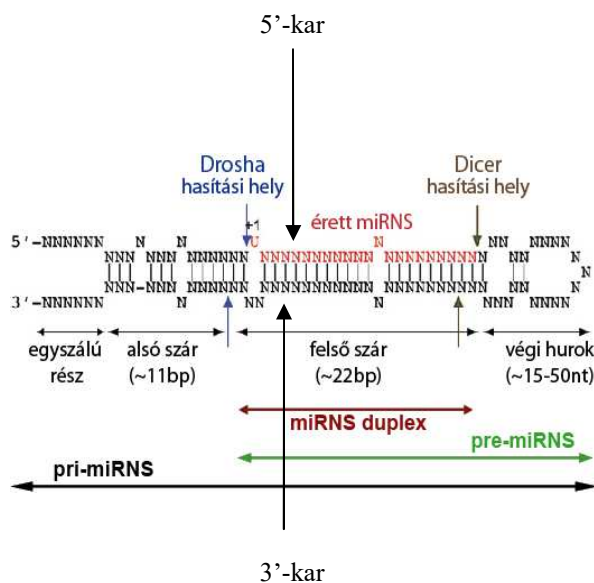
A miRNS-ek a különböző organizmusok genomjában egyesével vagy klaszterekben helyezkedhetnek el. Megtalálhatóak az intergénikus régiókban, a fehérjekódoló gének intronjaiban, ritkábban exonikus régiókban (**1. ábra**; [23-25]). Emberben a miRNS gének az Y kromoszómát kivéve az összes kromoszómán megtalálhatóak, számuk megközelíti a fehérje kódoló génjeink számának kb. 3%-át [22; 26; 27]. Átírásukat – a gazda génnel együtt, vagy önálló transzkripciós egységként – a Pol II, ritkábban a Pol III DNS-függő RNS polimeráz végzi. A Pol II által átírt miRNS transzkriptumokon megtalálható a jellegzetes 5' sapka struktúra, a 3' poliA farok, illetve intronokat is tartalmazhatnak [28; 29].



1. ábra. miRNS gének elhelyezkedése a genomban.

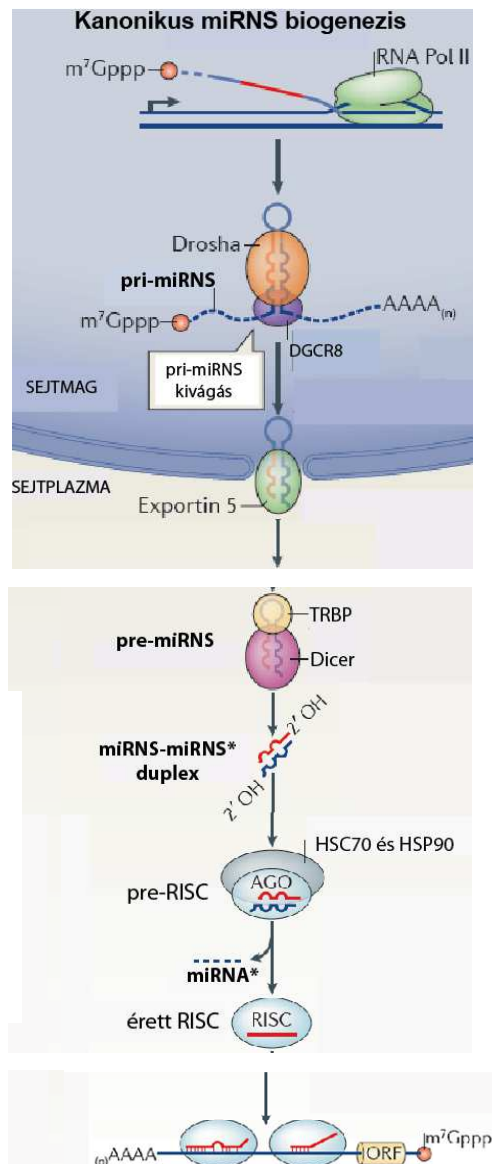
A pri-miRNS átírása történhet önálló transzkripciós egységként (A) vagy fehérje kódoló génnel együtt (B és C). 'P' jelzi a promótort. (Hussain, Cell Tissue Res, 2012, ábrája alapján.)

A miRNS génekről a transzkripció során keletkezik az elsődleges átírat, a pri-miRNS (*primary miRNA*), ami az érés során két egymást követő endonukleolitikus hasításon esik át. Mindkét vágást RNáz III típusú enzim végzi RNS kötő partnerek segítségével, az első hasítást a sejtmagban a Drosha, a másodikat a sejtplazmában a Dicer nevű enzim hajtja végre (**2. ábra**).



2. ábra. Kanonikus mikroRNS szerkezet és biogenezis.

Balra: egy kanonikus pri-miRNS általános szerkezete, az éréshez szükséges hasítási helyek feltüntetésével (Okamura, Cell, 2007, ábrája alapján). **Jobbra:** A kanonikus miRNS érési útvonal folyamatábrája (Ameres, Nat Rev Mol Cell Biol, 2013, ábrája alapján.)



A pri-miRNS-en belül hajtú-szerű struktúrába rendeződik a későbbi érett miRNS szekvenciát is tartalmazó ún. pre-miRNS (*precursor miRNA*), amit a kanonikus miRNS biogenezis során az ún. mikroprocesszor-komplex vág ki [30-33]. A mikroprocesszor fehérje komplex része az endonukleolitikus hasítást végző Drosha, illetve annak dupla szálú RNS kötő partnere, a DGCR8. A DGCR8 mintegy pozicionálja a vágáshoz a Drosha-t, ami a pri-miRNS dupla szálú, bázispárosodott alsó részén, az egyszálú és duplaszálú rész találkozásától számított egy hélix fordulatnyi (~ 11 bázispár) távolságnál vág [34]. Az RNáz III típusú enzimekre jellemző hasításnak megfelelően a pre-miRNS-nek 2 nukleotidos túlnyúló 3'-hidroxil, illetve 5'-foszforilált végei keletkeznek [35]. A vágás feltétele tehát egy nem tökéletesen bázispárosodott hajtú struktúra, amit egyszálú, strukturálatlan részek határolnak. Mivel ilyen másodlagos

struktúra nem csak miRNS-t kódoló RNS molekulákon belül alakulhat ki, ez további speciális motívumok meglétét feltételezi a miRNS-t tartalmazó hajtú struktúrákban, illetve annak környezetében. Ezt támasztja alá egy frissen megjelent tanulmány is, amiben ilyen specifikus motívumokat írtak le a humán pri-miRNS-ekben: a hajtút közvetlenül határoló egyszálú, a bázispárosodott szár rész alsó, illetve felső részén [36]. Az intronikus miRNS-ek kivágása ko-transzkripcionálisan történik, és a korábbi eredmények szerint ez még a gazda pre-mRNS splicingja előtt következik be, s nem függ tőle [37-40]. Az újabb eredmények szerint azonban a pre-miRNS intronból történő kivágása és a gazdagén intronjának splicingja között kölcsönösen mutualisztikus, *feed-forward* kapcsolat van [41]. Említést érdemel még az is, hogy abban a speciális esetben, amikor a pre-miRNS szekvenciája az exon-intron határára esik (átfed a splice hellyel), a *spliceosoma* és a mikroprocesszor közt kompetíció van a keletkező transzkriptumért [42; 43]. A mikroprocesszor fő részét a fentebb említett Drosha és DGCR8 fehérjék alkotják, de más fehérjék is képesek komplexet alkotni velük, amik befolyásolhatják a Drosha vágás fidelitását, specifikitását és aktivitását [27; 31]. A Drosha vágást követően felszabaduló ~60-70 nt hosszúságú pre-miRNS-t a sejtmagban az Exportin-5 transzport fehérje ismeri fel és Ran-GTP függő módon szállítja a sejtplazmába [44-47].

A citoplazmában egy újabb RNáz III típusú enzim, a Dicer egy dupla szálú RNS kötő fehérje (dsRBD) közreműködésével két hélix fordulatnyira hasít a Drosha vágás helyétől. Ezzel eltávolítja a pre-miRNS hurok (*loop*) régióját, ami egy ~22 nt hosszúságú dupla szálú kis RNS molekula (miRNS:miRNS* duplex) felszabadulását eredményezi [48-51]. Emlősökben a Dicer lehetséges dsRBD fehérje partnere a TRBP (*trans-activation response RNA-binding protein*) és a PACT (*protein activator of PKR*; [52-55]), *Drosophila*-ban pedig a Loquacious fehérje (Loqs; [56-60]). Az RNáz III típusú vágások eredményeként a kis RNS duplex mindkét végén 5'-foszforilált és 3'-hidroxil (ez utóbbi egyszálú, 2 nt hosszúságú túlnyúló vég) keletkezik. A duplex egyik végét a Drosha, a másikat pedig a Dicer enzim vágása definiálja. A dupla szálú kis RNS molekulából az egyik szál (érett miRNS, miR) beépül egy Argonauta (AGO) fehérje tartalmú csendesítő komplexbe (RNS-indukált csendesítő komplex, RISC), míg a másik szál (általában a miR*) lebomlik. Ez az ún. RISC *loading* folyamata. Az érett, miRNS tartalmú RISC-et miRISC-nek is szokták nevezni.

A „mir-” előtaggal általában a miRNS géneket, illetve a pre-miRNS-t szokták jelölni (pl. mir-21), míg az érett miRNS jelölésére a „miR-” előtagot használják (pl. miR-21). Azt, hogy melyik fajból származik az adott miRNS, egy három betűs előtaggal jelzik:

pl. hsa-mir-21 (*Homo sapiens* mir-21). Az azonos számmal jelölt miRNS-ek ortológok: pl. a hsa-miR-21 (ember) és a mmu-miR-21 (egér). A paralóg miRNS-eket (pár nukleotid különbség) pedig egy egybetűs utótag különbözteti meg: pl. hsa-miR-216a és hsa-miR-216b. A különböző lókuszokon elhelyezkedő pre-miRNS-ekből származó, de azonos szekvenciájú érett miRNS-eket egy számmal jelölt utótag különíti el: pl. hsa-miR-218-1 és hsa-miR-218-2. Egy pre-miRNS-nek elvileg bármelyik „karjából” (a „felső szár” rész bármely szálából; lásd **2. ábra**, bal oldal) képződhet érett miRNS. Az 5'-kARBól származó érett miRNS az „-5p”, a 3'-kARBól származó pedig a „-3p” jelölést kapja: pl. hsa-miR-21-5p vagy hsa-miR-21-3p. Amikor egyértelműen meghatározható, hogy melyik kARBól származó miRNS a predomináns, a kevésbé abundáns miRNS-t szokták „miR*”-gal is jelölni: pl. hsa-miR-21 (predomináns) és hsa-miR-21* (<http://www.mirbase.org/help/nomenclature.shtml>; [61]). Az elmúlt évek kutatásai során nyilvánvalóvá vált, hogy egy adott miRNS-nek akár többféle izoformája is lehet (*isomiRs*), amelyek leggyakrabban az 5' vagy a 3' vég nukleotid szekvenciáiban különbözhetnek egymástól, s befolyásolhatják akár a funkciót is [62-65]. Ezeknek az *isomiR*-eknek a nevezéktana jelenleg még nem megoldott.

2.1.2. A megfelelő kis RNS-ek RISC-be épülése

Az AGO fehérjék által közvetlenül kötött kis RNS-ek, így a miRNS-ek is általában a szekvencia-komplementaritás alapján jelölik ki a csendesítésre a cél RNS-t. Az, hogy a kis RNS duplex melyik szála épül be a géncsendesítő komplexbe (RISC) és melyik bomlik le, nem lehet csupán random kiválasztási folyamat eredménye, mivel a nem megfelelő szál beépülése nem megfelelő gén csendesítéséhez vezethet. Ezt támasztja alá az is, hogy a miRNS duplexnek általában csak az egyik szála van erős evolúciós nyomás alatt [10]. Az, hogy pontosan mitől függ/ hogyan történik maga a RISC *loading* folyamata, még napjainkban is egy intenzíven kutatott terület.

Jelenlegi tudásunk szerint a Dicer vágás következtében keletkező ~22 nt hosszúságú dupla szálú kis RNS molekula az AGO fehérjével való asszociálódás után rendkívül gyorsan széttekeredik, majd az egyik szál beépül, a másik pedig lebomlik [8]. Az AGO fehérjék 4 doménje két „lebenybe” rendeződik (N-PAZ; MID-PIWI), a MID domén köti a beépült egyszálú kis RNS 5', míg a PAZ domén a 3' végét [66]. Az N doménnek a duplex a széttekerésében és a kis RNS *loading*-jában van szerepe [67]. A megfelelő szál kiválasztására hatással lehet egyrészt a Dicer, ami processzálja a pre-miRNS-t

(emlősökben egy, de *Drosophila*-ban pl. 2 Dicer van), másrészt magában a duplex szerkezetében hordozott információk (végi pozícióban elhelyezkedő nukleotidok, termodinamikai tulajdonságok), illetve az adott AGO protein, amire a kis RNS *load*-olódik (emlősökben 4, míg pl. *Drosophila*-ban 2 fajta AGO létezik). Tehát elképzelhető, hogy a megfelelő szál beépülése a RISC-be a miRNS biogenezisben résztvevő, illetve az effektor komplexet alkotó fehérjék specifikus, megfelelő kölcsönhatásának az eredménye (a Dicer általi hasítás és az AGO *loading* összehangolt módon történik [68; 69]), bár találunk ennek az ellentmondó publikációt is [70].

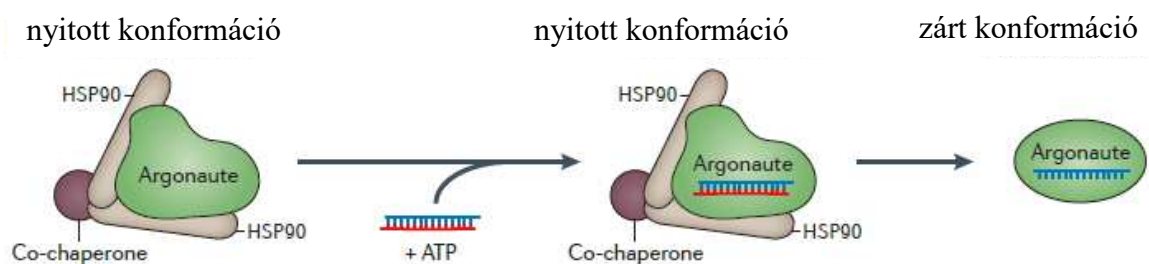
Mint az fentebb említésre került, a kis RNS duplex szerkezete maga is kódolhat információt a megfelelő szál beépülésére vonatkozóan. *Drosophila*-ban tanulmányozva a kis RNS duplexek szerkezete és a szál-beépülés közti összefüggéseket, néhány általános következtetés volt levonható: 1. a miRNS duplexekből származó érett kis RNS-ek általában az AGO1, míg a teljes szekvencia komplementaritású siRNS duplexekből származó kis RNS-ek általában az AGO2 tartalmú RISC-be épülnek be; 2. a (közel) teljes szekvencia-komplementaritású duplexekből a leggyakrabban az a szál épül be, aminek az 5' vége termodinamikailag kevésbé stabil (ezt szokták az aszimmetria szabálynak is nevezni); 3. az AGO1-be beépült egyszálú kis RNS-ek 5' végi pozíciójában gyakori az uracil (U), míg az AGO2-be beépültekében a citozin (C) [71-76].

A *Drosophila* kis RNS-ekhez hasonlóan emlősökben is van olyan miRNS, ami preferenciát mutat bizonyos AGO irányában [77], mégis úgy tűnik, hogy a miRNS-ek nagy része inkább random eloszlást mutat az AGO fehérjékhez való kötődésben [78; 79]. Ez azt sugallhatja, hogy a négy emlős AGO-ból a katalitikus aktivitással nem bíró három (AGO1, AGO3 és AGO4) funkcióját tekintve esetleg redundáns. Ennek ellentmondani látszik azonban, hogy például az AGO4 – az AGO1-el és AGO3-al ellentétben – nem annyira széles körben expresszálódik, ill. specifikus szerepét mutatták ki a spermatogenezisben [80]. Mint az fentebb említésre került, a négy emlős AGO fehérje közül csak az AGO2-nek van a cél RNS-t vágó (katalitikus) aktivitása (hasonlóan a *Drosophila* AGO2-höz). Az emlős AGO2 az siRNS-eken kívül képes miRNS-eket is kötni, és így „programozva” az AGO1,3,4-hez hasonló típusú géncsendesítésre képes [81].

Az emlős AGO-k vizsgálata során felmerült, hogy akár önmagukban is képesek lehetnek a duplex nem beépülő szálának eltávolítására [82]. Más vélemények szerint különféle helikázoknak szintén szerepe lehet a duplex széttekerésében (*unwinding*) és a

RISC *loading*-ban [83; 84]. Ezen felül vannak olyan az elképzelések is, hogy szemben a helikázok feltehetően szekvenciától független hatásával, inkább a duplex szekvenciájából adódó termodinamikai stabilitás a meghatározó tényező a megfelelő szál kiválasztásában és beépülésében [85; 86]. Érdekes újabb eredmény, hogy egy, a humán AGO2 MID doménjében elhelyezkedő rigid hurok specifikus, erős kapcsolatot tud létesíteni a kis RNS 5' végi uraciljával vagy adeninjével, míg az ugyanebben a pozícióban elhelyezkedő guanin vagy citozin bázisokhoz kisebb affinitással kötődik [87]. További érdekes megfigyelés, hogy az endonukleáz aktivitással bíró és azzal nem rendelkező AGO fehérjék ugyanolyan jól *load*-olódnak, de az utóbbiak esetében a nem beépülő (*passenger*) szál eltávolítása lassabban történik meg. A katalitikus aktivitással bíró AGO2 által elvágott *passenger* szál eltávolítása a C3PO endonukleáz segítségével történik, ily módon aktiválva a RISC-et, ami ezek után kész a target RNS vágására [88; 89].

A kis RNS *loading* mechanizmus fehérje partnereinek felderítése kapcsán a legújabb eredmények azt mutatják, hogy *Drosophila*-ban a Hsc70-Hsp90 (hősokk felismerő fehérje 70kDa-hősokkfehérje 90), míg emlősökben és növényekben a Hsp90 dajkafehérje (*chaperone*) komplex segíti a duplexből az egyik szál *load*-olódását az AGO fehérjébe. Ez a *chaperone* komplex ATP-t hidrolizál, hogy nyitott konformációt biztosítson az AGO fehérjének a kis RNS duplex befogadásához (3. ábra; [90-92]).



3. ábra. A Hsp90 hősokkfehérje szerepe kis RNS-ek AGO fehérjébe történő *load*-olásában.

A Hsp90 és *co-chaperon*-ja ATP hidrolízis mellett nyílt konformációban tartja az Argonaute (AGO) fehérjét a kis RNS duplex befogadásához, majd a duplex széttékeredik, az egyik szál degradálódik, a másik beépül és létrejön az érett RISC. (Meister, Nat Rev Gen, 2013, ábrája alapján.)

A hősokkfehérjéknek gyakran van *co-chaperone* partnere, és egérben valóban azt találták, hogy az FKBP5 *co-chaperone* az AGO2-vel asszociált [93]. Az viszont még

további kísérletek tárgyát fogja képezni, hogy valóban esszenciális szerepe van-e a RISC *loading*-ban.

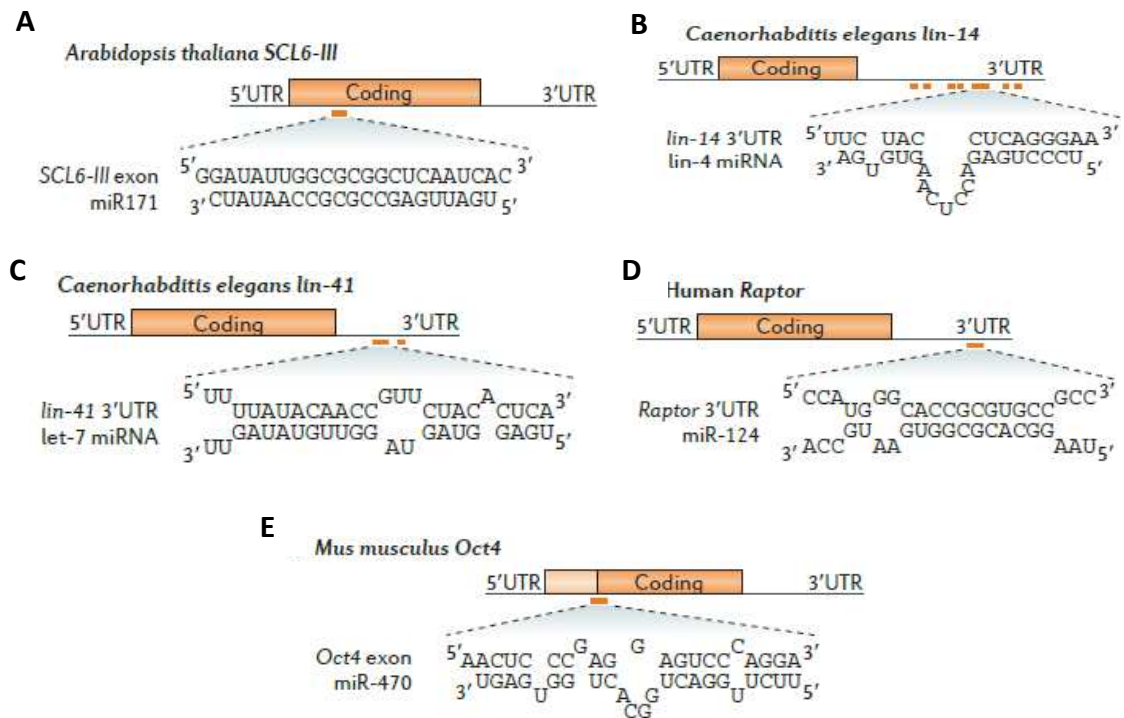
Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a RISC összeszerelődésének, a kis RNS duplexből a megfelelő szál kiválasztásának pontos folyamata még napjainkban sem teljesen ismert. A mechanizmusok felderítését nehezíti, hogy a kis RNS-ek – és ezen belül maguk a miRNS-ek is – különböző útvonalakon érhetnek/ módosulhatnak. Ezen felül a különböző érési folyamatok végső lépéseiben eltérő fehérje partnerek vehetnek részt (akár az adott pre-miRNS szekvenciától/szerkezettől függő módon), amik aztán az effektor funkciót közvetítő szintén sokféle AGO tartalmú fehérje komplexekkel/partnerekkel kombinálódhatnak/hathatnak kölcsön [14; 27] Egy másik érdekes és fontos kérdés a RISC *unloading* folyamata, aminek vizsgálata csak napjainkban kezdődött meg igazán [94].

2.1.3. MikroRNS közvetített szabályozási mechanizmusok

Abban, hogy egy adott kis RNS milyen hatásmechanizmus szerint fejti ki a hatását, nagy szerepet kap, hogy milyen RISC-be épül be. A megfelelő biológiai funkció eléréséhez kulcsfontosságú, hogy a kis RNS a megfelelő partnerekkel találkozzon. Az effektor funkció közvetítésében kulcsfontosságú AGO fehérjék például eltérő biokémiai tulajdonságokkal, sejten belüli lokalizációval és különféle expressziós mintázattal rendelkezhetnek, ami nagyban befolyásolhatja az effektor funkciót. Ehhez járulhat még hozzá az adott sejt állapota, a miRNS érés során bekövetkező módosítások, az AGO fehérje kötő partnereinek a hatása, ill. magát az AGO fehérje funkcióját befolyásoló különféle poszttranszlációs módosítások [81].

Emlősökben a fehérje kódoló gének több mint 50%-át becsülik miRNS által szabályozottnak. Ez a legtöbb esetben poszttranszkripcionális génexpresszió gátlást jelent [95]. Az érett RISC-ben kötött miRNS bázispárosodás által jelöli ki a szabályozandó cél hírvivő RNS-t (mRNS, *messenger* RNA). Az állati miRNS-ek általában csak részleges bázispárosodást mutatnak a cél mRNS-sel, ami leggyakrabban a miRNS 5' végén található ún. *seed* régió (2-8. nt) bázispárosodását jelenti az mRNS ún. 3' nem transzlálódó régiójával (3' UTR; [16]). Növényekben leggyakrabban a teljes szekvencia komplementaritás jellemző az adott miRNS és a target közt (**4A ábra**). Állatokban, a fentebb már említett módon, általában a miRNS 5' *seed* régiója bázispárosodik (**4B ábra**), de előfordul, hogy a 3' vég (**4C ábra**), vagy a miRNS

középső régiója komplementer a targettel (**4D ábra**), míg egyes esetekben jellemzően egyik rész sem (**4E ábra**). A növényekhez hasonlóan, állatokban is találunk példát arra, hogy a miRNS szinte teljesen egészében komplementer a targettel, ami a target RNS vágását idézi elő [96], illetve előfordul kódoló régióba eső konzervált és nem konzervált target helyek használata is [97].

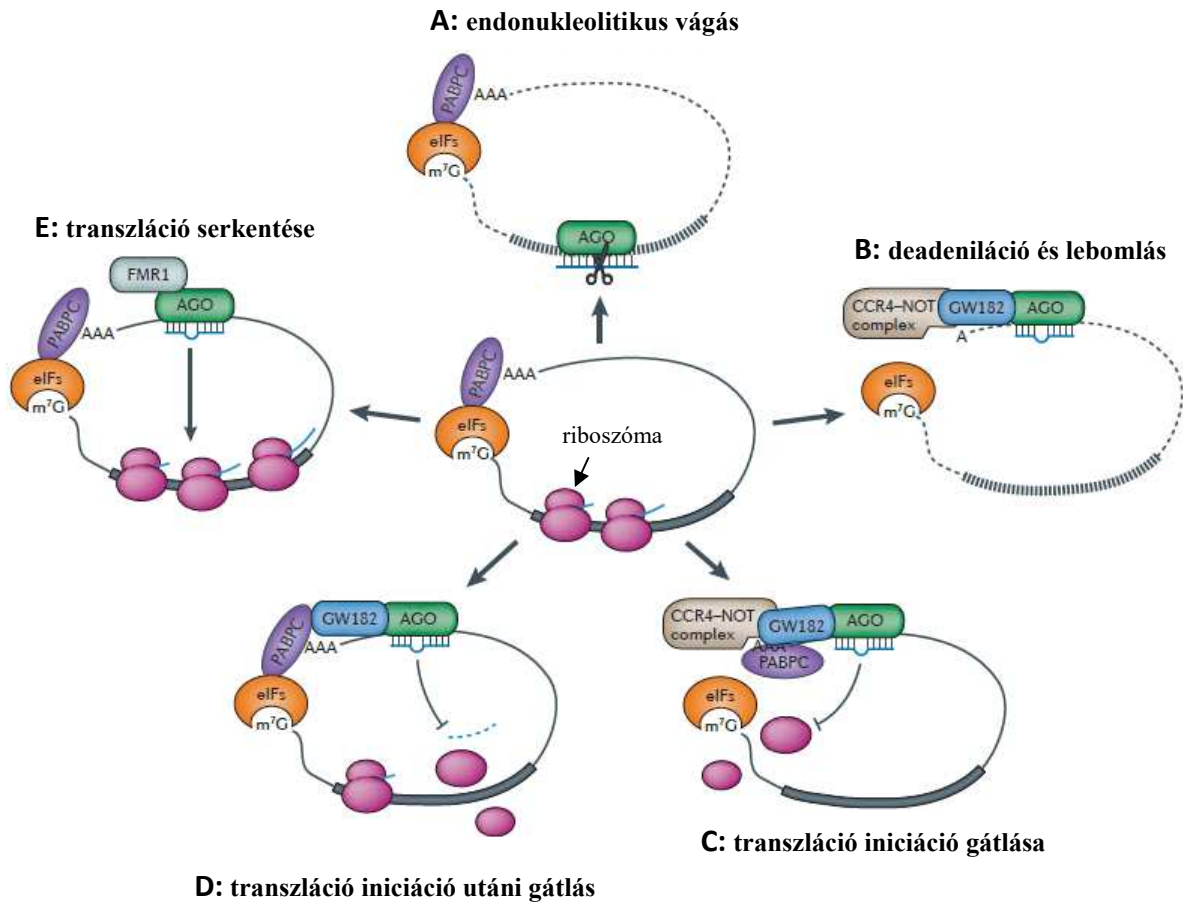


4. ábra. Különböző mikroRNS–target mRNS interakciók.

Növényekben a leggyakrabban közel teljes komplementaritást mutat a miRNS és a target, mint például az *Arabidopsis thaliana* SCL6-III gén mRNS-e és az azt reguláló miR-171 (mir-39) esetében [98] (A). Állatokban a részleges komplementaritás a jellemzőbb, leggyakrabban ez az ún. *seed* régióra esik, ami az érett miRNS 5' 2-8. pozíciója [13; 99] (B). Ritkábban előfordul, hogy a *seed* régió nem teljes komplementaritású, hanem a miRNS 3' vége [100; 101] (C) vagy a középső része [102] (D) bázispárosodik a targettel. Vannak azonban olyan esetek is, amikor kiterjedtebb, folyamatos bázispárosodás nem figyelhető meg [103] (E). Az ábrák tetején az adott faj és a szabályozott gén neve található. Az 5' és 3' UTR az mRNS kódoló részétől (*coding*) 5' és 3' irányban elhelyezkedő nem transzlálódó régiót jelzi. Az ábrák alatt kinagyítva a kölcsönható szekvenciák látszanak: az adott mRNS (felül) és a szabályozó miRNS (alul). Az mRNS mellett fel van tüntetve, hogy az adott mRNS melyik részére esik a kölcsönható szekvencia: exon (A), exonok csatlakozási helye (E) vagy 3' UTR (B-D). (Pasquinelli, Nat Rev Gen, 2012, ábrája alapján.)

A miRNS-ek target szabályozási mechanizmusai még ma is intenzív kutatás és vita tárgyát képezik. Találunk példát az mRNS destabilizálására, translációs gátlására, de akár serkentésre is [11; 25; 104; 105]. Kezdetben úgy gondolták, hogy az állatokban leírt – részleges bázispárosodáson keresztüli – represszió a transláció gátlásán keresztül, az mRNS lebomlása nélkül valósul meg, bár voltak olyan tanulmányok is, amik a target mRNS degradációját írták le [8; 106-108]. A korábbi elképzelésekkel szemben az újabb vizsgálatok azt mutatják, hogy a miRNS-függő mRNS lebomlás sokkal elterjedtebb szabályozási mechanizmus a translációs gátlással szemben [109-113]. Ezek a vizsgálatok azonban jobbra korlátlan osztódásra képes emlős sejtvonalakban készültek (pl. HEK-293, HeLa), így továbbra is érdekes kérdés maradt, hogy *in vivo* (a fejlődési stádium, a sejt típusa és állapota, ill. a miRNS target hely környezete által befolyásolva) milyen mechanizmus szerint következik be a target repressziója [11].

Az eddig leírt főbb miRNS általi szabályozási útvonalak összefoglalása az **5. ábrán** található. A növényekben leírtakhoz hasonlóan a miRNS teljes komplementaritása a targettel valószínűsíti a target – egy katalitikus aktivitással rendelkező AGO általi – endonukleolitikus vágását ([96; 98]; **5A ábra**). Ez állatokban egy ritkán előforduló szabályozás, de az mRNS más mechanizmusok általi destabilizálása már gyakrabban előfordul (**5B ábra**): a target 3' UTR-éhez kötődő GW182 fehérjét tartalmazó miRISC komplex képes deadeniláz faktorok toborzásával előidézni az mRNS poliA farkának lebomlását, ami a citoplazmatikus poliA kötő fehérje disszociációját idézi elő, így az mRNS hozzáférhetővé válik a sejtben belüli exonukleázok számára, s lebomlik [114-119]. Egy másik típusú gátlás, amikor egy miRNS hatására csökken egy adott fehérje mennyisége, de az mRNS-ének a szintje nem: ez a fehérje translációjának a repressziójára utal (**5C és 5D ábra**). A mechanizmus nem pontosan tisztázott, de az adatok arra utalnak, hogy a transláció iniciációja vagy elongációja gátlódhat, ill. előfordulhat a frissen szintetizált fehérje ko-transzlációs lebomlása, vagy a transláció idő előtti terminációja is [104; 120-126]. Friss publikációk azt mutatják, hogy az mRNS deadenilációjában részt vevő GW182 fehérje által toborzott CCR4-NOT komplex szintén képes lehet a transláció iniciáció gátlására (**5C ábra**; [117-119]). Mint az már fentebb is említésre került, nem csak miRNS-ek által kiváltott translációs gátlásra, hanem bizonyos körülmények közt miRNS kiváltotta transláció serkentésre is találunk példát (**5E ábra** [127; 128]).



5. ábra. mikroRNS-ek közvetítette mRNA szabályozási mechanizmusok.

A transzlációs iniciációs faktorok komplexe (eIFs) az mRNA 5' sapka (m^7G) struktúrájához, ill. a citoplazmatikus poliA kötő fehérjéhez (PABPC) köt, így serkentve a riboszóma általi transzlációt [129]. A target és mikroRNS tökéletes bázispárosodása a target mRNA AGO általi vágását indukálhatja, ami az mRNA gyors lebomlásához vezet (A). A miRNS részleges bázispárosodása a target 3' UTR régiójával a CCR4-NOT komplex GW182 általi toborzásához, majd az mRNA deadenilációjához és degradációjához vezet (B). A CCR4-NOT komplex a transzláció iniciációját is gátolhatja (C). A miRNS kiváltotta transzlációs gátlás megvalósulhat a transzláció iniciációja után is, például a riboszómák idő előtti disszociálódása (*ribosome drop-off*) vagy a keletkező polipeptid lebomlása által (D). A miRNS transzlációt serkentő hatására szintén található példa (E; [130]). 'FMR1': *fragile X mental retardation protein 1*. (Pasquinelli, Nat Rev Gen, 2012, ábrája alapján.)

Az mindenesetre továbbra is egy érdekes kérdés maradt, hogy az újabb eredmények szerint túlsúlyban levő miRNS általi mRNA degradáció a megakadt transzláció következménye, vagy esetleg éppen fordítva, annak az oka.

2.1.4. A „szabályozó szabályozása”: a mikroRNS funkció finomhangolása

A miRNS-ek indukálta szabályozás önmagában is sokféle ponton szabályozódhat: a miRNS-ek keletkezésének, a stabilitás, a funkció szintjén, vagy akár a miRNS-target interakciók által. A miRNS-ek különösen alkalmasak visszacsatolások körökben (*feedback loop*) részt venni, mivel direkt kapcsolat (bázispárosodás) révén képesek olyan faktorok mRNS-ét szabályozni, amik a saját biogenezisükre/funkciójukra hatnak. (Pl. néhány miRNS olyan transzkripció faktorot szabályoz, ami magának a miRNS-nek a transzkripcióját szabályozza). A visszacsatolások körök lehetnek egyszeres vagy kétszeres negatív, sőt akár pozitív *feedback loop*-ok is [14; 27; 131-135]. Transzkripcionálisan akár több miRNS expressziója is regulálható egyszerre, különösen klaszterekben elhelyezkedő miRNS-ek esetében. A transzkripció szintjén ható szabályozási mechanizmusok járulnak hozzá leginkább a sejttípus/fejlődési stádium specifikus miRNS expresszió fenntartásához. Egy miRNS klaszterben elhelyezkedő adott miRNS viszont akár klasztertől függetlenül, egyedi módon is szabályozódhat, független transzkripció/alternatív splicing [136], vagy poszttranszkripcionális szabályozási mechanizmusok által [137]. A poszttranszkripcionális szabályozás jelentőségét jelzi, hogy például a korai fejlődés során sok miRNS pri-miRNS formában átírásra kerül, de nem processzálódik belőle érett miRNS [138].

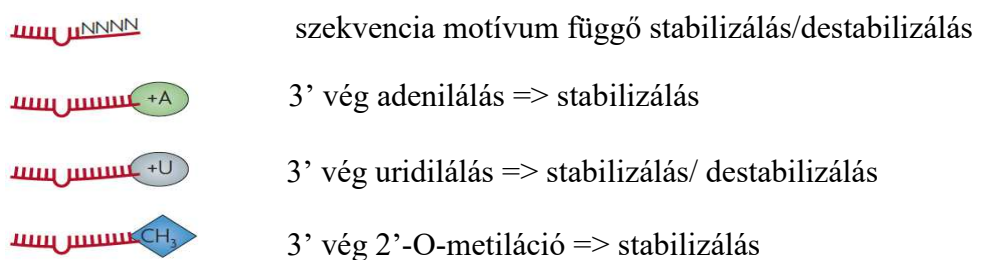
A poszttranszkripcionális miRNS expresszió szabályozás egyik formáját képviseli a miRNS processzálásában közvetlenül részt vevő fehérjék (Drosha, Dicer és dsRBD partnereik) szabályozása [14]. A DGCR8-Drosha interakció például stabilizálja a Drosha-t, míg cserébe a Drosha a DGCR8 mRNS-be található hajtúk hasítása által indukálja annak lebomlását [139; 140]. Egy másik példa a Dicer TRBP függő felhalmozódása (a TRBP fehérje csökkenése a Dicer destabilizálásához és a pre-miRNS processzálas sérüléséhez vezet [52; 141; 142]), vagy pl. a Dicer mRNS let-7 által történő szabályozása [143]. Ezen kívül különböző „járulékos” fehérjék is modulálhatják a miRNS biogenezist a Drosha/ Dicer általi interakciójukkal vagy a miRNS előformákhoz való kötődésükkel [14; 144]. Ilyenek például a lin-28 [145-151], a p68 és p72 helikázok [152; 153], a Drosha-val kölcsönható, a sejtmagi mRNS sapka-kötő komplex részét képező ARS2 (*arsenite-resistance protein 2*; [154]) és különféle (alternatív) splicing faktorok [155-157]. A TGF- β (*transforming growth factor- β*) és BMP (*bone morphogenetic protein*) jelátviteli útvonalakban részt vevő SMAD-oknak szintén nem

csak a transzkripció szabályozásában, hanem bizonyos miRNS-ek érésében is lehet szerepük [158; 159].

Egy másik szabályozási pont lehet a miRNS előformáknak a módosítása. Az ADAR enzim (*adenosine deaminase, RNA specific*) a pri- és pre-miRNS-ek dupla szálú részeit alakíthatja át az adenosin inozinra való módosításával. Ez hatással lehet a Drosha/ Dicer vágására, megakadályozhatja a pre-miRNS exportját, vagy – ha a *seed* régióban történik a módosítás – befolyásolhatja a targethez való specifitást is [160-164].

Az általános nézet szerint maguk a miRNS-ek meglehetősen stabilak bizonyos szövetekben (szív, máj), a féléletidejük akár több órában/napokban mérhető, bár találunk példát (pl. idegsejtekben) gyors *turnover*-re is [14; 165-168]. A gyors *turnover* elméletileg jobban összeegyeztethető a miRNS-ek azon funkciójával, hogy mintegy kapcsolóként, gyors szabályozóként működnek. A másik oldalról, a lassú miRNS *turnover* és a mégis gyors szabályozási funkció látszólagos ellentmondását oldhatják fel többek között az újonnan felfedezett cirkuláris RNS-ek, amik mintegy „kititrálhatják” vagy gyorsan elérhetővé tehetnek miRISC komplexeket [169-171].

A miRNS-ek stabilitását befolyásolhatja az AGO fehérjék sejten belüli szintje is: a négy humán AGO fehérje bármelyikének megnövelt expressziója általánosan megnöveli a sejten belüli érett miRNS-ek szintjét [172]. Ezen felül hatással lehet a miRNS stabilitására magának a miRNS 3' végének a szekvenciája, a 3' véghez hozzákapcsolt A vagy U nukleotid, illetve növényekben elterjedt a miRNS-ek stabilizálása a 3' vég metilálása által (6. ábra).

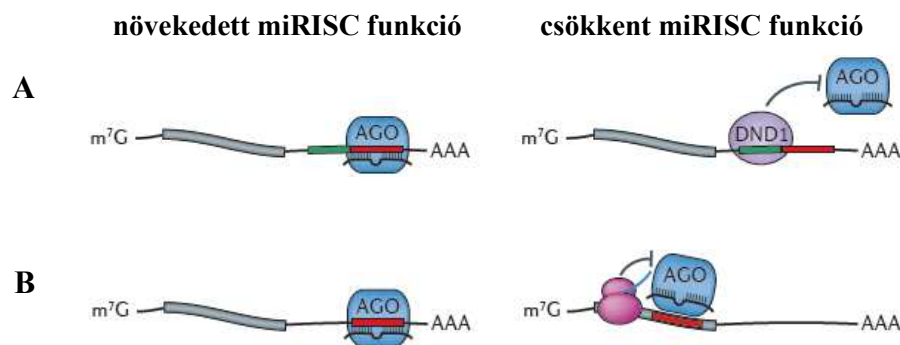


6. ábra. mikroRNS-ek stabilitásának szabályozása.

A miRNS-ek stabilitását meghatározhatja a 3' vég szekvenciája, illetve annak különféle módosításai. A különféle módosítások hatása miRNS-, ill. szövetspecifikus lehet. Májban a miR-122 3' végének adenilálása megvédi a miRNS-t az exonukleázok általi lebontástól [173]. A miR-26a uridilálása pedig megszünteti a miRNS represszálo hatását [150]. Növényekben a 3' vég metilálása megvédi a miRNS-eket az uridilációtól és lebomlástól [174]. *Drosophila*-ban az AGO1 helyett az AGO2-be *load*-olódott miRNS-ek szintén metiláltak, ami valószínűleg növeli a stabilitásukat [74-76]. (Krol, Nat Rev Gen, 2010, ábrája alapján.)

A miRNS funkció szabályozásának egyik lehetséges szintjét képviseli a miRISC is. Fő komponenseinek (AGO, GW182) és a velük kölcsönható faktorok (mRNS lebomlásban, transláció represszióban részt vevő faktorok, P-test komponensek, *chaperone*-ok stb.) szabályozásán keresztül modulálható a miRNS közvetítette funkció. Ez magában foglalhatja az adott fehérjék térben és időben eltérő expressziós mintázatát, stabilitásuk változását, a miRISC aktivitására (összeszerelődés, target kötés/disszociáció, *turnover*) való hatásokat [14; 27; 105].

A target mRNS-el kölcsönható különböző RNS-kötő fehérjék szintén befolyásolhatják a miRISC funkcióját. A HuR (más néven *embryonic lethal abnormal vision: ELAV*) az mRNS-ek AU-gazdag régióhoz köt és megóvjja őket a degradációtól [175]. A HuR és a DND1 (*deadend 1*) voltak az első RNS-kötő fehérjék, amikről kimutatták, hogy direkt módon képesek megakadályozni egy target mRNS miRNS mediálta represszióját (**7A ábra**; [176; 177]). Érdekes módon a HuR nem csak gátolni tudja a miRISC funkcióját: HeLa sejtekben kimutatták, hogy a kötődése a *MYC* 3' UTR-éhez szükséges a let-7b és let-7c miRNS által kiváltott represszióhoz [178].



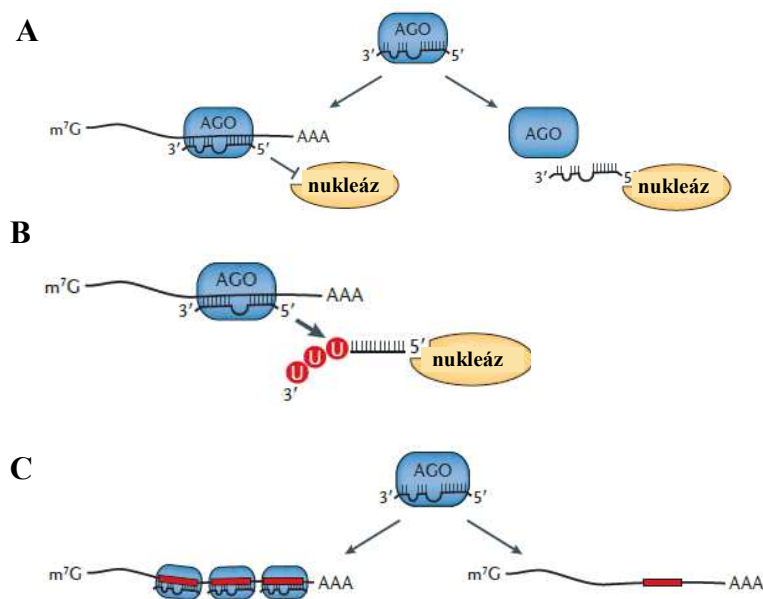
7. ábra. A miRISC funkcióját befolyásoló faktorok.

Az RNS-kötő fehérjék (pl. DND1) elfedhetik a miRNS target helyeket, ezáltal gátolva a miRISC kötődését (A). A 3' UTR-ben elhelyezkedő target helyekhez hatékonyabb a miRISC kötődés (és ezáltal a szabályozó hatás is), a kódoló régióban elhelyezkedőkhöz képest, ahol a riboszóma destabilizálhatja a target-miRISC kapcsolatot (B) [179]. (Pasquinelli, Nat Rev Gen, 2012, ábrája alapján.)

A fentebb említetteken kívül a miRISC funkcióját befolyásolhatja a target helynek a környezete is. A target hely pozíciója az adott mRNS-en belül meghatározhatja, hogy mennyire hozzáférhető a miRISC számára: az AU gazdag, illetve a nem strukturált régiók általában segítik a hozzáférést, míg pl. a translációs stop hely közvetlen környezete a riboszóma „árnyékoló” hatása miatt (a stop kodontól ~15 nt-ra, 3'

irányban) nem annyira kedvező (**7B ábra**; [16; 180]). Érdekes további adat, hogy CLIP esszéivel vizsgálva az AGO-k kötötté target helyeket arra derült fény, hogy a kötőhelyek közel fele az mRNS-ek kódoló, exonikus szakaszára esett [181-183]. Azt azonban érdemes megjegyezni ezzel kapcsolatban, hogy az AGO kötés önmagában még nem feltétlen jelent funkciót is. A fentiekén túl, általánosságban elmondható, hogy a kötőhelyek száma növeli a szabályozás hatékonyságát, míg az átfedő kötőhelyek hatása nem prediktálható: lehet akár szinergikus, vagy akár antagonisztikus is [180; 184; 185].

Legutolsó szabályozási pontként a miRNS-target interakció szabályozó hatását emelném ki. Ezt a bázispárosodáson keresztüli kapcsolatot sokáig csak egyoldalú szabályozásnak tekintették: a miRNS targetre gyakorolt hatására fókuszáltak. Az elmúlt években azonban egyre több bizonyíték látott napvilágot arra vonatkozóan, hogy nem csak a miRNS-nek van hatása az adott targetre, hanem a targetnek is a miRNS-re. Tehát a miRNS-target interakciót egy kölcsönös szabályozási viszonyként kell értelmeznünk. A target egyrészt hatással lehet az öt szabályozó miRNS stabilitására, másrészt befolyásolhatja a miRNS funkciót (**8. ábra**; [105; 186]).



8. ábra. A miRNS-target interakció hatása a miRNS stabilitásra és funkcióra.

(A) A miRNS-target kölcsönhatás stabilizálhatja a miRNS-AGO interakciót, ami megvédi a miRNS-t az exonukleázok általi lebomlástól [187; 188]. (B) A kiterjedt target-miRNS bázispárosodás előidézhetheti a miRNS 3' végének a visszavágását és uridin farokkal való ellátását, ami a miRNS lebontásra való kijelölését jelentheti [189-191]. (C) Egy adott miRNS target helyét tartalmazó különböző RNS transzkriptumok versenghetnek egymással. Ilyen módon egy adott miRNS-t tartalmazó miRISC komplex „kititrálható” bizonyos RNS-ek által, így ugyanannak a miRNS-nek a felismerőhelyét tartalmazó target RNS felszabadulhat a szabályozás alól [192]. (Pasquinelli, Nat Rev Gen, 2012, ábrája alapján.)

Mint az fentebb már említésre került, egy miRNS targetre gyakorolt hatását szabályozni lehet a miRNS szintjének változása nélkül is: ugyanazt a miRNS kötőhelyet tartalmazó targetek kölcsönösen szabályozhatják egymást az adott miRNS tartalmú RISC hozzáférhetőségének szabályozásán keresztül. A target általi miRNS funkció szabályozása kapcsán merült fel az ún. *ceRNA* hipotézis (*competing endogenous RNA*: „versengő” endogén RNS; [193]). Ennek megfelelően az RNS-ek (mRNS-ek, átíródó pszeudogének, hosszú nem kódoló RNS-ek: lncRNAs, stb.), mintegy „kommunikálhatnak” egymással a miRNS kötőhelyeiken keresztül (MRE: *miRNA responsing element*). A genom és transzkriptom egyre mélyebbre ható vizsgálatai igazolni látszanak a miRNS szabályozás finomhangolását a miRNS-target interakció által. Ennek lehetnek eszközei a gének függetlenül átíródó 3' UTR régiói, a hosszú nem kódoló RNS-ek, vagy például az elmúlt években felfedezett endogén miRNS „szivacsok” (*miRNA sponges*) [105; 170; 171; 192; 194].

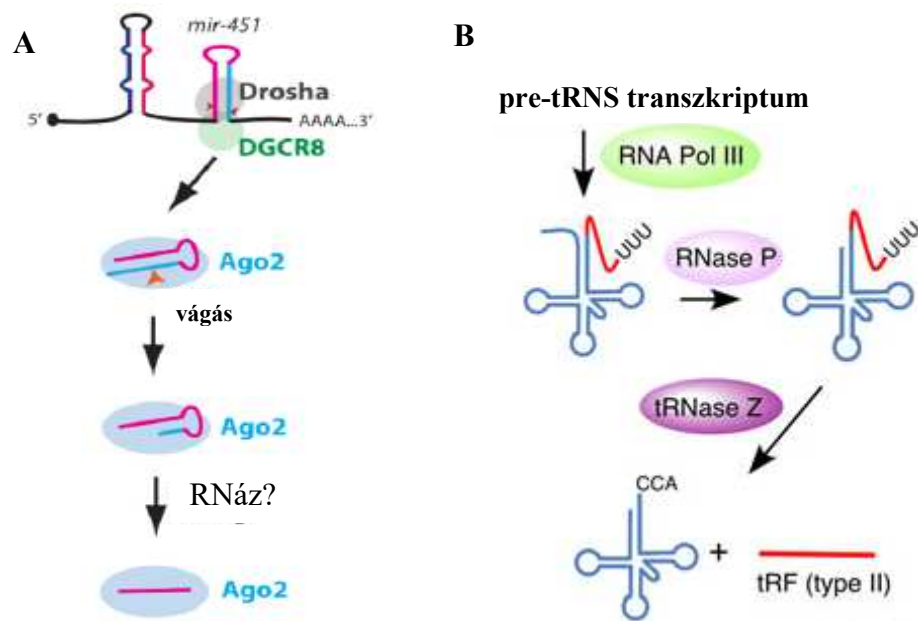
2.1.5. Alternatív mikroRNS biogenezis útvonalak

A molekuláris biológiai technikák és a bioinformatika fejlődésének köszönhetően napjainkra nyilvánvalóvá vált, hogy a kanonikus miRNS biogenezis mellett számos alternatív miRNS érési útvonal is létezik. Ezek a miRNS-ek a „klasszikus” érési útvonal bizonyos lépéseinek kikerülésével keletkeznek. Leginkább az jellemző rájuk, hogy a kanonikus érés folyamán bekövetkező két endonukleolitikus RNS hasítási lépés közül az egyiket elkerülik, és más megoldással hidalják át. Ennek alapján két fő csoportba oszthatóak: a sejtmagban lezajló első hasítási lépést elkerülők a Drosha/DGCR8 független (**9. ábra**), a sejtplazmában történő második hasítást elkerülők pedig a Dicer független útvonalak (**10. ábra**).

Dicer független miRNS érési útvonalak

A legelsőként leírt Dicer független miRNS érési útvonal a mir-451 biogenezise volt (**9A ábra**; [195-197]). A kanonikus miRNS éréshez hasonlóan a pri-miRNS vágását a Drosha/DGCR8 komplex végzi el. A felszabaduló pre-miRNS-nek azonban csak ~18 nt hosszú bázispárosodott része van, ezért a Dicer valószínűleg nem ismeri fel szubsztrátjaként. Ehelyett a pre-miRNS az AGO2-be *load*-olódik, ami képes a miRNS* szálon belül hasítani, s ezzel egy ~30 nt-os terméket eredményez. Ennek a 3' végéből

egy eddig még nem azonosított RNáz ~7 nt-ot leemészt, s így keletkezik a ~23 nt hosszúságú érett miRNS [198; 199]. Az irodalom szerint szintén a Dicer független miRNS érési útvonalak közé sorolják a tRNS-ekből tRNáz Z függő, de Dicer független módon érő kis RNS-ek biogenezisét. Mivel ezek a kis RNS-ek nem feltétlen férnek bele a klasszikus miRNS definícióba, ezért tRNS-eredetű RNS fragmentumoknak (tRFs), vagy II-es típusú tRNS-eredetű kis RNS-eknek (tsRNAs, type II) is szokták nevezni őket (**9B ábra**; [198; 200; 201]).



9. ábra. Dicer független miRNS biogenezis útvonalak.

(A) A miR-451 biogenezisében a Dicer helyett az AGO2 végzi a második hasítási lépést, majd egy eddig ismeretlen RNáz emésztése után keletkezik az érett miRNS. (B) tRNS-ekből érő kis RNS-ek (tRF type II = II-es típusú tRNS-eredetű RNS fragmentumok) 5' végét a tRNáz Z (tRNase Z) definiálja, míg a 3' végét a Pol III RNS polimeráz transzkripció terminációja. (Yang, Mol Cell, 2011, és Miyoshi, Mol Genet Genomics, 2010, ábrája alapján.)

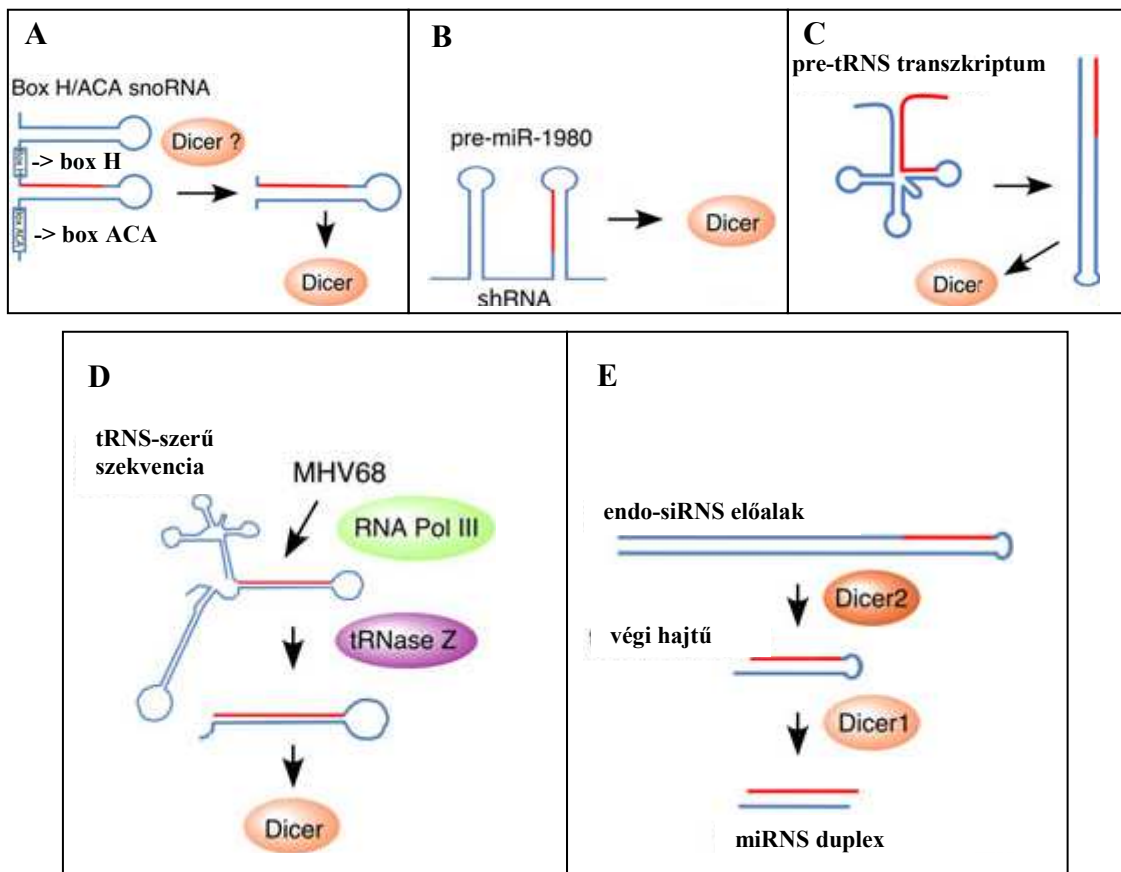
Érdeemes talán megjegyezni ezen a ponton is, hogy a Dicer független útvonalak létezése szintén nem támogatja azokat – a már korábban említett – leírásokat, amelyek szerint a Dicer általi hasítás és az RISC *loading* folyamata kapcsolt (lásd. **2.1.2.** fejezet; [52; 202]).

Drosha független miRNS érési útvonalak

A Drosha független útvonalak közé tartoznak a snoRNS-ekből (*small nucleolar RNA*: nukleoláris kis RNS) Drosha/DGCR8 független, de Dicer függő módon érő miRNS-ek (**10A ábra**; [198; 199; 203-205]). A ~70-200 nt hosszúságú snoRNS-ek a riboszómális és kis sejtmagi RNS-ek (rRNS és snRNS) poszttranszkripcionális módosítását irányítják – a miRNS-ekhez hasonlóan – bázispárosodás által kijelölve a targetet [206]. Mélyszekvenálási adatok alapján mindkét osztályukba (C/D box és H/ACA box) tartozó snoRNS-ekből származhatnak miRNS-ek, amiknek a struktúrája egy köztes szekvenciával összekapcsolt két pre-miRNS-szerű hajtű (**10A ábra**; [207-210]). Néhány snoRNS lókuszbizonyítottan kettős funkcióval bír: képes mind miRNS, mind snoRNS forrásként szolgálni [211].

A snoRNS-ekhez hasonlóan endo-shRNS és tRNS lókuszköről is képződhetnek kis RNS-ek Drosha/DGCR8 független, de Dicer függő módon (**10B és 10C ábra**; [205]). Az endo-shRNS eredetű mir-1980 – a snoRNS eredetű miRNS-ekhez hasonlóan – két egymás utáni pre-miRNS-szerű hajtű struktúra második tagjából képződik. A Dicer számára szubsztrátként szolgáló hajtűt valószínűleg egy egyelőre ismeretlen endonukleáz vágja ki az elsődleges transzkriptumból. A mir-1980-al ellentétben azonban vannak olyan endo-shRNS eredetű miRNS-ek is, amiknek a prekuzora rögtön egy rövid hajtű struktúrát alkotó RNS molekulaként íródik át a DNS-ről [198; 205]. Ezen kívül létezik például egy olyan endo-shRNS lókuszbizonyítottan kettős funkcióval bír: képes mind miRNS, mind snoRNS forrásként szolgálni [211]. Ezen kívül létezik például egy olyan endo-shRNS lókuszbizonyítottan kettős funkcióval bír: képes mind miRNS, mind snoRNS forrásként szolgálni [211]. Ezen kívül létezik például egy olyan endo-shRNS lókuszbizonyítottan kettős funkcióval bír: képes mind miRNS, mind snoRNS forrásként szolgálni [211]. Ezen kívül létezik például egy olyan endo-shRNS lókuszbizonyítottan kettős funkcióval bír: képes mind miRNS, mind snoRNS forrásként szolgálni [211]. Ezen kívül létezik például egy olyan endo-shRNS lókuszbizonyítottan kettős funkcióval bír: képes mind miRNS, mind snoRNS forrásként szolgálni [211].

A tRNS-ekből Dicer függő módon processzáldó miRNS-ek létezését további vizsgálatok szintén megerősítették [201; 212].



10. ábra. Drosha független, de Dicer függő miRNS biogenezis útvonalak.

(A) snoRNS eredetű miRNS biogenezis. A hajtú struktúrák mellett található az osztályozás alapjául szolgáló jellegzetes szekvencia motívumok (box H, box ACA). (B) Az endo-shRNS eredetű miR-1980 biogenezise. Endo-shRNS-ekből valószínűleg többféle útvonalon keletkezhet miRNS. (C) miRNS-ek keletkezhetnek tRNS lókuszkokról is. Az ábrán egy tRNS elsődleges átíratának lehetséges alternatív struktúráit látjuk. A hosszú hajtú szerkezet lehetővé teszi a Dicer általi processzálást. (D) tRNS szerű szekvenciákból Dicer és tRNáz Z függő módon is keletkezhetnek miRNS-ek. A Drosha funkcióját az tRNáz Z helyettesíti. (E) *Drosophila melanogaster*-ben kimutatták, hogy endo-siRNS előalakokból Dicer függő módon érhetnek miRNS-ek. (Miyoshi, Mol Genet Genomics, 2010, ábrája alapján.)

A Dicer független útvonalaknál már szó esett tRNS-ekből tRNáz Z segítségével keletkező miRNS-ekről, ugyanakkor léteznek tRNS-szerű struktúrából szintén tRNáz Z közvetítésével, Drosha független, de Dicer függő módon érő miRNS-ek (10D ábra). Ilyenek az egér γ -herpeszvírus 68 (*murine γ -herpesvirus 68*, MHV68) miRNS-ei. Ezek a Pol III által átírt pri-miRNS-ből keletkeznek, amelynek a struktúrája gyakorlatilag egy tRNS-hez fuzionált tandem pre-miRNS [213-216]. Van olyan eset, amikor mindkét pre-miRNS részből kimutattak érett miRNS képződést, de arra is van példa, hogy csak az

egyik hajtúból érik miRNS. Mindenesetre a pontos képződési mechanizmusok egyelőre nem tisztázottak, például a „belső” hajtú 3’ végének képződése sem. Ez történhet akár egy endonukleáz hasítása, vagy – mint arra az U gazdag szekvencia utal – alternatív Pol III termináció által [199].

Drosophila melanogaster-ben kimutatták, hogy hosszú, duplaszálú endogén siRNS (endo-siRNS) előalakokból is keletkezhetnek Drosha független módon miRNS-ek (**10E ábra**). A Dicer2 és a Loqs PD izoformája által képzett komplex (Dicer2-Loqs-PD) processzálja a hosszú hajtú struktúrából az endo-siRNS-eket, amik az AGO2-vel asszociálódnak. Úgy tűnik azonban, hogy ez a komplex nem tudja a „végi” hajtú részt processzálni, így azt pre-miRNS-ként a Dicer1 és a PA/PD Loqs izoforma által képzett komplex ismeri fel, s készíti elő az AGO1-be történő *loading*-ra [198; 217]. Ez az alternatív miRNS biogenezis útvonal egyelőre nem nyert bizonyítást emlősökben; maga az endo-siRNS biogenezis is sokkal korlátozottabban működik az interferon válasz miatt. Vannak azonban olyan speciális emlős sejtípusok (pl. embrionális őssejtek, petesejtek), amelyekben hosszú duplaszálú előalakokból képződnek endo-siRNS-ek [199; 205; 218; 219].

A Drosha független, de Dicer függő alternatív miRNS biogenezis útvonalak közül talán az egyik legjelentősebb és – mint az napjainkra kiderült – a legszélesebb körben elterjedt útvonal a mirtron biogenezis.

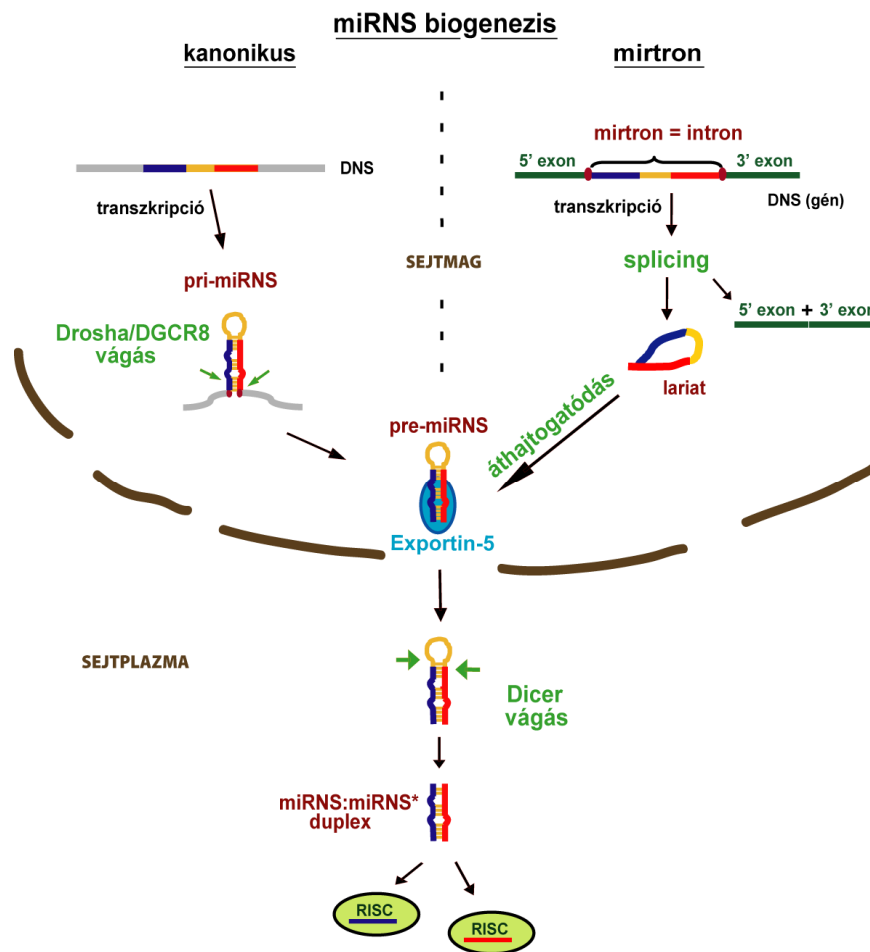
2.2. Mirtronok

2.2.1. A mirtronok felfedezése és biogenezise

Az állati miRNS-ek kb. 40%-a fehérje kódoló gének intronjaiban helyezkedik el. Az intronok méreteloszlását vizsgálva *C. elegans* és *Drosophila* fajokban azt látjuk, hogy egy markáns csúcs található az alacsonyabb mérettartományban: 60, ill. 81 nt-nál [220]. Ez a méret pont a pre-miRNS-ek mérettartományába esik. Ugyanakkor kis RNS-ek mélyszekvenálási adatait is vizsgálva ezekben a fajokban azt találták, hogy vannak olyan érett kis RNS-ek, amelyeknek valamelyik vége pontosan átfed kisméretű intronok 5’ vagy 3’ vágási helyével (5’ splice donor=SD vagy 3’ splice akceptor=SA hely). A pre-miRNS-sel egyező méretű intronból származó érett kis RNS-ek pontos illeszkedése az intron végéhez, illetve az a tény, hogy ezek az intronok elméletileg képesek hajtú struktúrába rendeződni, felvetette annak a lehetőségét, hogy ezek a miRNS-ek esetleg a

Drosha-tól függetlenül, splicing útján vágódhatnak ki az elsődleges átíratból. Ez a Drosha független, de splicing függő miRNS érés valóban bizonyítást nyert *D. melanogaster* és *C. elegans* fajokban, s ezeket a speciális, pre-miRNS-t „utánzó” intron szekvenciákat mirtronoknak nevezték el [221; 222].

A mirtron útvonalon érő miRNS-ek biogenezisének első lépéseként tehát az elsődleges transzkriptumból (mRNS/pri-miRNS) nem a Drosha vágja ki a pre-miRNS struktúrát, hanem a splicing apparátus segítségével vágódik ki az adott rövid intron (11. ábra).



11. ábra. A kanonikus és mirtron miRNS biogenezis útvonalak összehasonlítása.

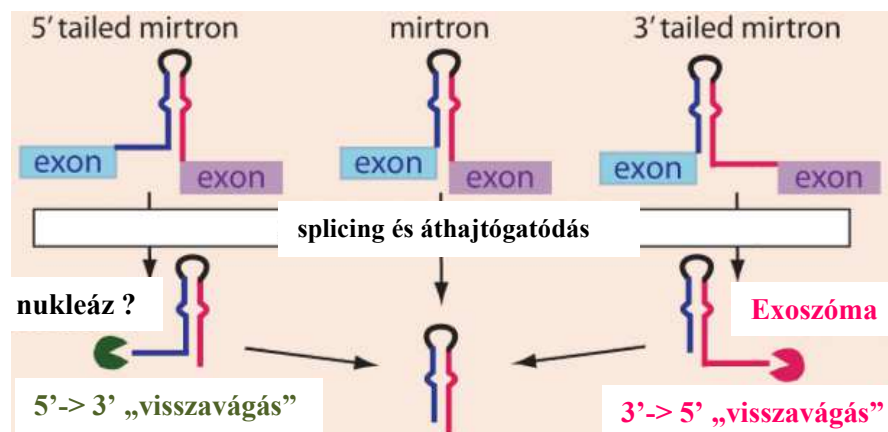
A leírás a szövegben található; *lariat*=a lasszó formában kivágódott intron. (Schamberger, Methods in Mol. Biol.: Structural and Functional RNA Mapping, in press, ábrája alapján.)

A mirtronikus intronok kivágódása a klasszikus lasszó formán keresztül történik meg (az intron 5' vége a *branch* ponthoz van ligálva), amit a „lasszó szerkezet megszüntető enzim” (*lariat debranching enzyme*) old fel. Ezután az intron nem bomlik le, hanem a pre-miRNS-ekre jellemző hajtú struktúrába rendeződik. A mirtron és a kanonikus

miRNS biogenezis ezen a ponton konvergál, inentől a már korábban részletezett, kanonikus miRNS-ekre jellemző módon történik mindkét típusú érés. Röviden: a hajtú szerkezetű pre-miRNS a sejtplazmába transzportálódik az Exportin-5 által, majd a Dicer hasítása után a miRNS duplex valamelyik szála egy AGO fehérjébe *load*-olódik, létrejön az érett RISC, ami aztán képes betölteni target szabályozó funkcióját [198; 199].

2.2.2. Tailed mirtronok

A konvencionális mirtronokkal szemben léteznek olyan atipikus mirtronok is, ahol az intronikus splice donor és akceptor helyek nem a hajtú (pre-miRNS) struktúrának a két végét definiálják. Ilyenkor a hajtú egyik vége pontosan az intron splice donor vagy akceptor helyénél végződik, de 5' vagy 3' irányban egy túlnyúló vég (farok= *tail*) található az ellenkező oldali splice helyig, innen a nevük: *tailed* mirtronok (12. ábra; [199; 223]).



12. ábra. *Tailed* mirtronok sematikus ábrázolása.

Középen látható egy konvencionális mirtron, míg kétoldalt az 5'-, ill. 3'-*tailed* mirtronok. A 3' irányban található túlnyúló farok rész *Drosophila*-ban az exoszóma által emésztődik le, míg az 5' tailed mirtronok pre-miRNS-é való processzáálásában résztvevő enzim eddig ismeretlen. (Yang, Mol Cell, 2011, ábrája alapján.)

A *tailed* mirtronok a konvencionális társaikhoz hasonlóan splicing által vágódnak ki, a lasszó forma megszüntetéséhez pedig szükség van a *lariat debranching* enzimre.

Az eddig legrészletesebben vizsgált *tailed* mirtron a 3'-*tailed Drosophila* mir-1007 [221; 224]. Ezen a *Drosophila*-k közt erősen konzervált mirtronon keresztül lett leírva a 3'-*tailed* mirtronok biogenezeise. A splice donor helynél kezdődő mir-1007 hajtú szekvencia után egy még kb. 100 nt-os 3' farok található, ami az intron splice akceptor helyéig tart. Ezt a 3'-*tail* részt az RNS exoszóma, a fő eukarióta 3' → 5' exonukleáz komplex távolítja el, felszabadítva ezzel a pre-mir-1007-et. Úgy tűnik, hogy mindez a sejtmagban játszódik le, így a pre-mir-1007 szubsztrátként tud szolgálni az Exportin-5-nek a sejtplazmába jutáshoz, ahol a kanonikus miRNS-ekhez hasonló további processzálon esik át. Bár az RNS exoszóma általában teljesen lebontja a szubsztrátját, az is ismert, hogy processzáását a stabil másodlagos szerkezetek gátolják, így fordulhat elő, hogy a 3'-*tailed* mirtron hajtú struktúrája (pre-miRNS) nem bomlik le, hanem megmarad [224; 225].

Az 5' *tailed* mirtronok biogeneziséről jelenleg nem sokat tudunk, az eukarióták közt elterjedt fő 5' → 3' exonukleáz, az XRN1/2 komplex egy lehetséges jelölt az 5' farok eltávolítására [223].

2.2.3. Mirtronok előfordulása és jellemzői

Az első mirtron szekvenciákat *Drosophila*-ban és *C. elegans*-ban találták, mint ahogy a mirtronokat érintő későbbi, részletesebb vizsgálatok – struktúra-funkció összefüggések, bioinformatikai predikciók validálása – is ezekben a fajokban történt [226]. Mindeközben mélyszekvenálással kimutattak más fajokban is olyan rövid, intron eredetű kis RNS szekvenciákat (*read*-eket), amik rövid intronok végeinél végződtek. Mirtron-szerű szekvenciák kerültek leírásra emberben, főemlősökben, egérben, csirkében, tehénben és rizsben is [205; 227-233]. Az emlős mirtronok prediktálása elsőre talán meglepőnek tűnt, hiszen az intronok mérete itt heterogénebb, s az átlagos intron méret jóval meghaladja a pre-miRNS mérettartományát (emberben pl. ezer nukleotidos tartományban mozog; [220; 234; 235]). A prediktált mirtron-szerű emlős szekvenciák a gerinctelen mirtron szekvenciákkal, illetve más kisméretű emlős intronokkal összevetve sokkal nagyobb GC összetétellel rendelkeztek. Ezen kívül hajtú formájukra nem volt jellemző a pre-miRNS-ekre (és a gerinctelen mirtronikus pre-miRNS-ekre is) jellemző 3' 2 nt-os túlnyúló vég, ami az Exportin-5 által történő felismerés és a sejtplazmába történő transzport feltétele. Mindezekon túl, a mélyszekvenálási adatok alapján úgy tűnt, hogy a prediktált emlős mirtronokra nem

jellemző a gerinctelen mirtronok azon tulajdonsága, hogy az érett miRNS leginkább a pre-miRNS 3'-karjából származik (3'-kar dominancia). Egy további különbség, hogy a 3'-kARBól származó gerinctelen mirtronokra jellemző az 5' U végződés, míg a 3'-kARBól prediktált érett emlős szekvenciák kb. ugyanolyan arányban kezdődtek U-val vagy C-vel [227]. Az emlős mirtronokon belül humán mirtron szekvenciákat is találtak bioinformatikai predikciók és mélyszekvenálási adatok alapján, de konkrét kísérletes validálás, illetve mélyebbre ható vizsgálatok sem a humán, sem más emlős mirtronok esetében nem történtek. A mirtronokat illetően még jelenleg is kevés kísérletes információ van birtokunkban, bár az elmúlt két évben számos új publikáció látott napvilágot. A humán mirtronokat érintő új eredményeket a saját eredményekkel együtt, a „Eredmények megvitatása” fejezetben fogom tárgyalni.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Az egyik legjelentősebb nem kanonikus mikroRNS érési útvonal, a mirtron biogenezis felfedezése és leírása gerinctelen fajokban (*D. melanogaster* és *C. elegans*) történt. Bioinformatikai predikciók és mélyszekvenálási adatok alapján valószínűsítették mirtronok létezését magasabbrendűekben is, de munkám kezdetekor nem állt rendelkezésre kísérletes bizonyíték a mirtron útvonal létezésére gerincesekben. A kísérletesen validált, magas expressziót mutató gerinctelen mirtronok, és a prediktált emlős mirtron szekvenciák számos tulajdonságukban eltértek. Munkám keretében azt szerettem volna megvizsgálni, hogy ez a speciális, mirtronikus mikroRNS keletkezési útvonal valóban létezik-e emlősökben/emberben. A humán mirtronok vizsgálatára az alábbi célokat tűztük ki:

1. Három prediktált humán mirtron és egy *Drosophila* mirtron (kontroll) képződésének és funkciójának vizsgálata eredeti szekvencia környezetből humán sejtekben.
2. A határoló exonok hatásának vizsgálata az expresszióra: expresszió és funkció vizsgálata heterológ környezetből.
3. Humán mirtronokat stabilan expresszáló sejtvonalak létrehozása a *Sleeping Beauty* transzpozon alapú génbeviteli rendszer segítségével.
4. A mirtron biogenezis útvonal létezésének igazolása magasabbrendűekben: splicing függés, ill. a DGCR8/Drosha komplextől való függetlenség bizonyítása.
5. Mirtron eredetű érett miRNS-ek direkt detektálása.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Bioinformatikai analízis és statisztika

A prediktált mirtron szekvenciák kiválasztása az 5.1.1. fejezetben leírt kritériumok alapján történt, a szekvenciák elérhetők a <http://www.mirbase.org/> internetes oldalon. Az evolúciós konzerváltság megállapításához (a szekvenciák illesztéséhez) egy online ingyenesen elérhető programot használtunk: www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/.

Annak a megbecslésére, hogy egy adott szekvencia képes-e kivágódni egy adott exonikus környezetből a SoftBerry-FSPLICE, illetve a Human Splicing Finder Version 2.4.1 nevű, az interneten szabadon elérhető programokat használtuk.

A luciferáz esszék és a qRT-PCR eredményeinek statisztikai kiértékeléséhez – az F-próba elvégzése után – kétmintás t-próbát alkalmaztunk.

4.2. Plazmidok létrehozása

4.2.1. Baktérium törzsek és transzformálás

A különböző plazmidok felszaporításához a legtöbb esetben az *Escherichia coli* TOP10 törzsét használtuk. Amikor a klónozás úgy kívánta, az *Escherichia coli* nem metiláló, dam-/dcm- K12 törzsét (NEB) alkalmaztuk. A sejtek kompetenssé tétele általános (MgCl₂-CaCl₂) módszer alapján történt (Sambrook *et al.*, 1989).

A baktériumok transzformálására hősokkot alkalmaztunk:

- 1 µl plazmid vagy 10 µl ligátum + 100 µl kompetens sejtet összekeverünk
- jégen állni hagyjuk ~30 percet
- 42⁰C-os vízfürdőbe helyezzük egy percre
- jégre tesszük pár percig
- hozzáadunk 890-900 µl LB oldatot (10 g tripton, 5 g élesztő kivonat, 10 g NaCl 1 l desztillált vízben) és ~30 percet rázatjuk (200 rpm)
- egy részét, vagy centrifugálás után (8000 x g, 1 perc) az egészet a megfelelő antibiotikumot tartalmazó LB-agar (1 l LB+15 g agar) lemezre kikenjük

4.2.2. Genomi DNS izolálás

- ~ 2×10^6 sejtet összegyűjtünk (tripszinezünk), PBS-sel mossuk, majd centrifugáljuk (250 x g, 5 perc). A pellet rögtön használható, vagy -80°C -on tárolható a későbbi felhasználásig.
- a pelletet 500 μl lízis pufferben (10 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, pH=8.0) felfuszpendáljuk

(Alkalmazástól függően opcionális, az RNS szennyezés eltávolítására:

- +5 μl RNáz A (10 mg/ μl)
- inkubálás 37°C -on 1 óra)
- hozzáadunk 28 μl 10%-os SDS-t, alaposan összekeverjük (vortex)
- hozzáadunk 5 μl proteináz K-t (20 mg/ml), vortex
- inkubálás 50°C -on, 1 órát
- hozzáadunk 600 μl fenol:kloroform:izoamil-alkoholt, alaposan összekeverjük
- centrifugálás 10 percig ~21000 x g-n
- a felső vizes fázist átpipettázzuk új Eppendorf csőbe
- 1:1 térfogatarányban kloroformot adunk hozzá, alaposan összekeverjük
- centrifugálás 10 percig ~21000 x g-n
- a felső vizes fázist átpipettázzuk új Eppendorf csőbe
- 1:1 térfogatarányban 4°C -os izopropanolt adunk hozzá, óvatosan átkeverjük
- inkubálás jégen 10 percig
- centrifugálás 10 percig ~21000 x g-n
- a felülúszót leöntjük, a csapadékot mossuk 500 μl 75%-os 4°C -os etil-alkohollal, inkubálás 5 percig jégen
- centrifugálás 10 percig ~21000 x g-n
- a DNS csapadékot szárítjuk, majd felvesszük ~ 150 μl desztillált vízben (tárolás - 20°C -on)

4.2.3. Polimeráz láncreakció (PCR)

PCR klónozáshoz, telep PCR, RT-PCR

A mirtronok/intronok genomból való amplifikálásához, a sikeres klónozás telep PCR-rel történő megállapításához, ill. az RT-PCR-hez az általánosan használt PCR reakció a

következő volt: 12.5 µl 2X PCR Master Mix (Promega), 1 µl *forward* primer [10 µM], 1 µl *reverse* primer [10 µM], 9.5 µl H₂O, 1 µl templát. Az első esetben a templát ~100-150 ng genomi DNS, a második esetben 1 µl telep lizátum volt (10 µl desztillált vízben 1 baktérium telep 3 percig 95⁰C-on lizálva). Az RT-PCR esetében pedig 1 µl cDNS, ami tranziens transzfeccót követően 48 óránál izolált totál RNS mintából 'High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit' (Life Technologies) segítségével lett átírva a gyártó utasításainak megfelelően. Az általánosan használt PCR program a következő volt: 95°C 3 perc; 35 ciklusban: 95°C 30 sec (denaturálás), 59°C 30 sec (primer hibridizáció), 72°C 45 sec (láncosszabbítás, ennek az ideje az amplitikon várt mérete szerint változtatva lett); 72°C 5 perc (végső láncosszabbítás). A klónozáshoz szükséges hosszabb DNS darabokat *Pfu* polimeráz (Promega) segítségével amplifikáltuk, a gyártó protokolljának megfelelően. Az egyes primerek nukleotid sorrendje a **mellékletben** található.

PCR szekvenáláshoz, szekvenálás

A PCR reakcióhoz 2 µl BigDye oldat (Life Technologies), 4 µl BigDye Sequencing Buffer 5X, 3.2 µl primer [1 µM], 1 µl templát (PCR termék vagy 100-150 ng plazmid) lett összemérve, és vízzel 20 µl végtérfogatra kiegészítve. Ezt követte a PCR reakció, 35 ciklusban: 95°C 30 sec, 60°C 4 perc. A reakcióelegyet a primerek feleslegétől, ill. a be nem épült nukleotidoktól a DyeEx 2.0 Spin Kit-tel (Qiagen) tisztítottuk meg, a gyártó utasításainak megfelelően. A tisztított mintából összemértünk 5 µl-t 15 µl formamiddal, 95°C-on 2 percig denaturáltuk, majd szekvenáltuk ABI310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) segítségével.

Mutagenesis PCR

Az 50 µl össztérfogatú reakció összetétele a következő volt: 5 µl 10X *Pfu* puffer, 1 µl (mutáns szensz) primer [2 µM], 1 µl (mutáns antiszensz) primer [2 µM], 1 µl dNTP mix [10 mM], ~ 100 ng plazmid templát, vízzel kiegészítve; majd hozzáadtunk 1 µl *Pfu*-t [2.5 u/µl] (Thermo Scientific). Az alkalmazott PCR program a következő volt: 95°C 3 perc; 18 ciklusban: 95°C 30 sec, 60°C 1 perc, 68°C 14 perc; 72°C 5 perc. A lehűtött reakcióhoz hozzáadtunk 1 µl DpnI-et [10 u/µl] és 37°C-on 1-2 órát emésztettük,

majd az elegyből 1 μ l-t kompetens baktériumokba transzformáltunk. A primerek nukleotid sorrendje a **mellékletben** található.

4.2.4. *Sleeping Beauty* transzpozonos vektorok klónozása

EGFP marker gént tartalmazó alapkonstrukció

A *Sleeping Beauty* transzpozon konstrukció az Izsvák Zsuzsannától és Ivics Zoltántól kapott pT2/BH vektor volt, amibe korábban egy CMV promóter hajtotta GFP-ABCG2 fehérjét, ill. poliA helyet is tartalmazó kazettát klónoztunk a HindIII/EcoRI helyekre. Ennek egy részét (a poliA helyet megtartva) HindIII/PmlI emésztéssel eltávolítottuk, és a helyére klónoztuk a CAG promóter által meghajtott EGFP kazettát. Ez utóbbit egy – dr. Német Katalin csoportjától – kapott vektorból emésztettünk ki HindIII/HincII emésztéssel, és klónoztuk a HindIII/PmlI emésztett *Sleeping Beauty* vektorba. A létrehozott SB_CAG_EGFP vektort alkalmaztuk már korábbi munkánk során [236], mint ahogy a még korábban létrehozott SB_CMV_EGFP, SB_CMV_GFP2, és SB_CAG_GFP2 vektorokat is ([237], ill. nem publikált adat).

Mirtron expressziós vektorok

A mirtronokat eredeti genomi környezetükből expresszáló vektorok létrehozásához a SB_CAG_EGFP vektorba, az EGFP szekvencia mögött levő BsaBI restrikciós helyre tompa végű ligálással klónoztuk a genomból amplifikált, a mirtront két határoló exonjával tartalmazó (exon-intron-exon=ie) DNS darabokat. A PCR-ekhez felhasznált genomi DNS-ek a HUES9 humán embrionális őssejtvonalból, ill. a Dr. Vértessy Beáta csoportjától kapott *Drosophila* S2 sejtekből lettek izolálva.

A heterológ környezetből történő expresszióhoz először mutagenézis PCR-rel bevittük a PvuII restrikciós helyet az EGFP-be [238]. Mivel a PvuII hely eleve jelen volt a vektorban, ezért a PvuII helyet tartalmazó EGFP-t szubklónoztuk a pCEP4 vektorba (Thermo Scientific; köszönet érte Dr. Fátyol Károlynak). Ezután ezt a vektort emésztettük meg PvuII restrikciós enzimmal, beleillesztettük tompa végű ligálással a PCR termékeket, vagy az előre összehibridizált oligonukleotidokat, majd visszaklónoztuk a mesterséges intront már tartalmazó EGFP-t az eredeti *Sleeping*

Beauty transzpozon vektorba [239]. A mirtron és splicing mutáns mirtron oligonukleotidok nukleotid sorrendje a **mellékletben** található.

4.2.5. shRNS-t kifejező vektor és luciferáz szenzorok klónozása

A mir-1233 3'-karjának shRNS formáját a psiSTRIKE vektor (Promega; köszönet érte Dr. Német Katalinnak) segítségével expresszáltuk. Az oligonukleotidok a gyártó utasításainak megfelelően lettek megtervezve, majd ezek hibridizálása után szintén a gyártó utasításainak megfelelően lettek beklónozva a vektorba. Az shRNS oligonukleotidok szekvenciája a **mellékletben** található.

A luciferáz esszéhez az adott miRNS (pre-miRNS kar) komplementer antiszensz szekvenciáját kétszer tartalmazó szenzor, és az attól 3-4 nukleotidban (minden második nukleotid a *seed* régióban) különböző mutáns szenzor hibridizált oligókat a psiCHECK2 vektorba (Promega) klónoztuk: a gyártó utasításának megfelelően, a Renilla luciferáz 3' UTR régiójába, az XhoI/NotI restrikciós helyek használatával. A szenzor és mutáns szenzor oligonukleotidok nukleotid sorrendje a **mellékletben** található.

4.3. Sejttenyésztés, transzfekció és sejtvonalak létrehozása

A kísérletekhez használt sejtvonalakat (HEK-293, MCF-7, MDCKII, HeLa) 10% hőinaktivált FBS szérummal (*fetal bovine serum*), 1% L-glutaminnal és 1% penicillin/streptomycin antibiotikummal kiegészített DMEM tápoldatban (*Dulbecco's modified Eagle's medium*), 37°C-on 5% CO₂ inkubátorban tartottuk fenn. A Robert Blelloch laboratóriumától kapott vad típusú és DGCR8 deficiens egér embrionális fibroblaszt sejtek (MEF; [240]) szintén az előzőeknek megfelelően voltak fenntartva, kivéve, hogy a médium nem tartalmazott antibiotikumot. A humán embrionális őssejtek fenntartása mitomycin-C-vel kezelt egér embrionális *feeder* sejteken, HUES médiumban (15% ko szérum replacement, 80% KoDMEM, 1 mM l-glutamin, 0.1 mM beta-mercaptoethanol, 1% nem esszenciális aminosav, 4 ng/mL humán fibroblaszt növekedési faktor; [236]) történt.

A legjobb transzfekciós hatékonyság elérése érdekében a különböző sejtvonalakat különböző transzfekciós reagensekkel transzfektáltuk, a gyártók protokolljának megfelelően: FuGENE[®] 6-al (Promega) a HEK-293 és HUES9; FuGENE[®] HD-vel (Promega) a HeLa, az MDCKII és az MCF7, míg Lipofectamine[®] 2000-el (Invitrogen)

a MEF sejteket. Az siRNS-eket minden esetben Lipofectamine® 2000-el juttattuk be a sejtekbe. Az EGFP fehérje expresszióját IX51 fluoreszcens mikroszkóp (Olympus) segítségével ellenőriztük (köszönet érte Dr. Német Katalinnak).

A különféle EGFP, ill. EGFP_m_mirtron/miRNS/intron expressziós kazettákat stabilan kifejező sejt vonalakat a *Sleeping Beauty* transzpozonos rendszer segítségével hoztuk létre (lásd még **5.2. fejezet**, ill. [236; 239]). A transzpozon és transzpozáz 10:1 arányú kotranszekcióját a transzekciós reagenst gyártó cég utasításainak megfelelően végeztük. Az ezt követő 8. napon, ill. a 17. napon lettek a sejtek EGFP pozitivitás alapján leválogatva Dr. Várady György segítségével, egy FACS Aria High Speed Cell Sorter-rel (Beckton-Dickinson).

4.4. Luciferáz esszé

A bemutatott luciferáz esszékhez 24-lyukú lemezre kirakott sejteket kotranszfectáltunk az adott mirtront/miRNS-t expresszáló plazmival (300 ng) és az adott szenzor vagy mutáns szenzor konstrukcióval (15 ng), a gyártó utasításainak megfelelően.

A transzekciós hatékonyságot kb. 24 óránál, fluoreszcens mikroszkóppal ellenőriztük. A luciferáz aktivitást a transzekciót követő 48 óránál, 'Dual-Luciferase Reporter Assay System Kit' (Promega) és 2030 Multilabel Reader luminométer (PerkinElmer) segítségével mértük, a gyártó utasításainak megfelelően, a passzív lízis módszerét alkalmazva. Minden kísérleti felállás három párhuzamos transzekcióval lett mérve, illetve a független kísérletek száma (minden esetben minimum 2) az ábraalírásokban fel van tüntetve.

A nyers *Renilla* adatokat először a szintén a psiCHECK2 plazmidon kódolt firefly luciferáz adatokra normalizáltuk (ez a transzekciós kontroll). Ezen kívül – a specifikus hatás mérése érdekében – egy adott mirtronnak/miRNS-nek a neki megfelelő szenzoron mért hatását a mutáns szenzorra vonatkoztattuk (2. kontroll), majd ezt az értéket az adott szenzor/mutáns szenzor-párra nem specifikus kontroll („nem felismerő” miRNS) jelenlétében mért szenzor/mutáns szenzor adatra vonatkoztattuk (3. kontroll).

4.5. RNS izolálás és kis RNS Northern blot

A dolgozatban bemutatott kísérletekhez az RNS izolálásokat Trizol[®] reagenssel (Invitrogen) végeztük, a gyártó protokolljának megfelelően. Az RNS-eket 50 µl nukleáz-mentes desztillált vízben vettük fel.

A kis RNS Northern blot előtt mindig közvetlenül ellenőriztük az izolált RNS-ek minőségét 1%-os agaróz gélen történő gélelektroforézissel. A kis RNS Northern blot technikát Várallyay Éva és Havelda Zoltán publikációja [241], és útmutatása alapján végeztük. Röviden: az ábrán feltüntetett mennyiségű totál RNS-t (20 vagy 30 µg) 12%-os denaturáló poliakrilamid gélen megfuttattuk (20-25 perc 200 V, majd 1-2 óra 400 V), egy éjszakán át blottoltuk, majd Stratagene UV Stratalinker 1800 segítségével keresztköttük Hybond N+ (Amersham) membránra. Ezután – előhibridizálást követően – ³²P-jelölt LNA (Exiqon; miRNS-ekre), vagy DNS (U6 endogén kontroll) próbával hibridizáltunk. A próbák szekvenciája a **mellékletben** található. Molekulasúly markerként radioaktívan jelölt Decade Marker-t (Ambion) alkalmaztunk, a membránok radioaktív jeleit Carestream Kodak BIOMAX MS (Sigma) film segítségével, az általános gyakorlatnak megfelelően detektáltuk.

4.6. Kis RNS reverz transzkripció és kvantitatív RT-PCR

A kis RNS-ek totál RNS-ekből történő cDNS-sé átírása (reverz transzkripció) előtt DNáz-zal kezeltük az RNS mintákat. 20 µl osztérfogatban összmértünk: 5 µg totál RNS-t, 2 µl (4 unit) DNáz-t (NEB), 2 µl 10X DNáz puffert, 1 µl (20 unit) RNáz inhibitor, nukleáz-mentes vizet. Az elegyet 37°C-on egy órát inkubáltuk, majd a 75°C-on 10 percig tartó hőinaktiválást követően a mintát jégen lehűtöttük.

A reverz transzkripcióhoz a Life Technologies 'miRNA Reverse Transcription Kit'-jét használtuk. Egy reakcióhoz a következő komponenseket mértük össze (de tipikusan több reakcióra való *mastermix*-et készítettünk): 0.15 µl 100 mM dNTP Mix, 1.5 µl 10X puffer, 1.16 µl H₂O, 0.19 µl RNáz inhibitor (20 U/µl) és 1 µl reverz transzkriptáz (50 U/µl). Finoman összekevertük, nem vortexeltük. Hozzáadtunk 5 µl DNáz kezelt totál RNS-t [2 ng/µl], 3 µl endogén kontroll specifikus RT primert és 3 µl target specifikus RT primert. (A kis RNS specifikus stem-loop RT primereket a gyártó által, vagy általunk tervezett 'TaqMan[®] MicroRNA Assay' (Life Technologies) tartalmazta.) A

minták reverz transzkripcióját PCR készülékben, az alábbi program szerint végeztük: 16°C 30 perc, 42°C 30 perc, 85°C 5 perc.

A kvantitatív PCR-hez a 'TaqMan[®] Universal Master Mix II with UNG' reakcióelegyet (Life Technologies), és a gyártó által, vagy általunk tervezett, adott targetre specifikus 'TaqMan[®] MicroRNA Assay'-t (Life Technologies) használtuk. A cDNS mintákat ötszörösére hígítottuk (15 µl cDNS + 60 µl H₂O). A kvantitatív PCR-hez 1 mintára vonatkoztatva összemértünk: 10 µl 2X Master Mix-et, 1 µl 20X próbát és 9 µl hígított cDNS-t. Minden mintából három technikai párhuzamost mértünk össze a megbízható mérés és értékelés érdekében. StepOne[™] vagy StepOnePlus[™] *real-time* PCR platformon (Life Technologies) az alábbi programot használva mértük a mintákat: 50°C 2 perc, 95°C 10 perc, 40 ciklusban: 95°C 15 sec és 60°C 1 perc. Az adatokat StepOne version 2.1. szoftverrel elemeztük. A méréseket mindig legalább kettő biológiai párhuzamos kísérlettel végeztük.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Prediktált humán és *Drosophila* mirtronok vizsgálata emlős sejtvonalakban

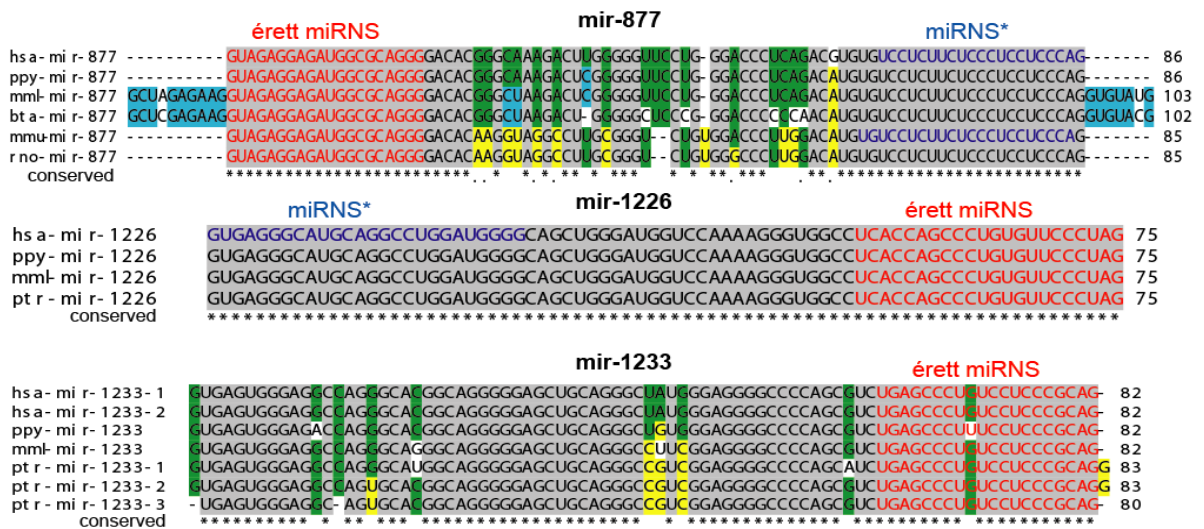
5.1.1. A vizsgálandó szekvenciák kiválasztása

Prediktált humán mirtronok

Annak a vizsgálatára, hogy a mirtron útvonal létezik-e emlősökben, három, feltételezetten mirtron eredetű mikroRNS szekvenciát választottunk ki [227]. A bioinformatikai módszerek, illetve mélyszekvenálási adatok alapján rendelkezésre álló prediktált humán mirtron szekvenciák közül olyanokat igyekeztünk megvizsgálni, amik a splicing predikcióink alapján jó eséllyel ki tudnak vágódni a határoló exonjaik közül. Ezen kívül szempontként szerepelt, hogy 5'- és 3'-karos mirtront is válasszunk, illetve evolúciósan feltehetően eltérő eredetű, kevésbé és jobban konzervált szekvenciákat is megvizsgáljunk.

Az első kiválasztott szekvencia az 5'-karosnak prediktált humán mir-877 volt, ami az ABCF1 (*ATP-binding cassette, sub-family F, member 1*) gén egyik alternatív (86 bp-os) intronját alkotja. Ez az egyik legősibbnnek tűnő emlős mirtron szekvencia, bioinformatikai analízisek és mélyszekvenálási adatok alapján ez található meg a legtöbb emlős fajban (szarvasmarha, egér, patkány, főemlősök). A loop régiótól eltekintve erős konzerváltságot mutat a különböző fajokban mind a prediktált érett miRNS, mind a miRNS* szekvencia szintjén (**13. ábra**).

A második kiválasztott szekvencia, a 3'-karos humán mir-1226, már csak főemlősökben található meg, s evolúciós szempontból nézve valószínűleg újabban keletkezett szekvenciának tekinthető. A humán mir-1226 a DHX30 (*DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box helicase 30*) gén egyik alternatív, 75 bázispáros intronját alkotja. A mir-1226 szekvencia az egész pre-miRNS szintjén konzervált a különböző főemlős fajokban (**13. ábra**).



13. ábra. Három prediktált humán mirtron szekvenciája és evolúciós konzerváltságuk.

A prediktált domináns érett miRNS szekvencia piros, míg az esetlegesen prediktált miRNS* kék színnel van jelezve. Az illesztett szekvenciák alatt található csillagok a fajok között konzervált nukleotidokat jelzik. Az adott pozícióban elhelyezkedő azonos nukleotidok ugyanazzal a háttérszínnel vannak jelezve. hsa – *Homo sapiens* (ember), ppy – *Pongo pygmaeus* (borneói orangután), mml – *Macaca mulatta* (rhesusmajom vagy bunder), bta– *Bos taurus* (szarvasmarha), mmu – *Mus musculus* (házi vagy laboratóriumi egér), rno – *Rattus norvegicus* (vándorpatkány), ptr – *Pan troglodytes* (közönséges csimpánz).

A harmadik jelölt a 82 nukleotid hosszúságú mir-1233. Szintén 3'-karosnak prediktálták és csak főemlősökben található meg. Emberben és csimpánzban duplikációk következtek be, erre utal a mir-1233-1, a mir-1233-2 illetve a mir-1233-3 jelölés. A humán mir-1233 a *GOLGA8A* (*golgin A8 family, member A*) gén egyik alternatív intronját alkotja.

Kontroll mikroRNS-ek

A három prediktált humán mirtronon kívül más mikroRNS-eket is kiválasztottunk, hogy a későbbi vizsgálatokhoz kontrollként szolgáljanak.

Először is egy „mirtron kontrollt” szándékoztunk alkalmazni, amihez egy korábban kísérletesen is validált mirtront kerestünk. Mivel a mirtron útvonal csak alacsonyabbrendűekben volt bizonyítva, így olyan korábban leírt kísérletesen validált mirtront kerestünk, ami a fajok közötti különbségek ellenére – a splicing predikciók

alapján – a legnagyobb valószínűséggel képes kifejeződni emlős sejtekben is. A legjobb jelölt a *Drosophila* mir-1003 volt.

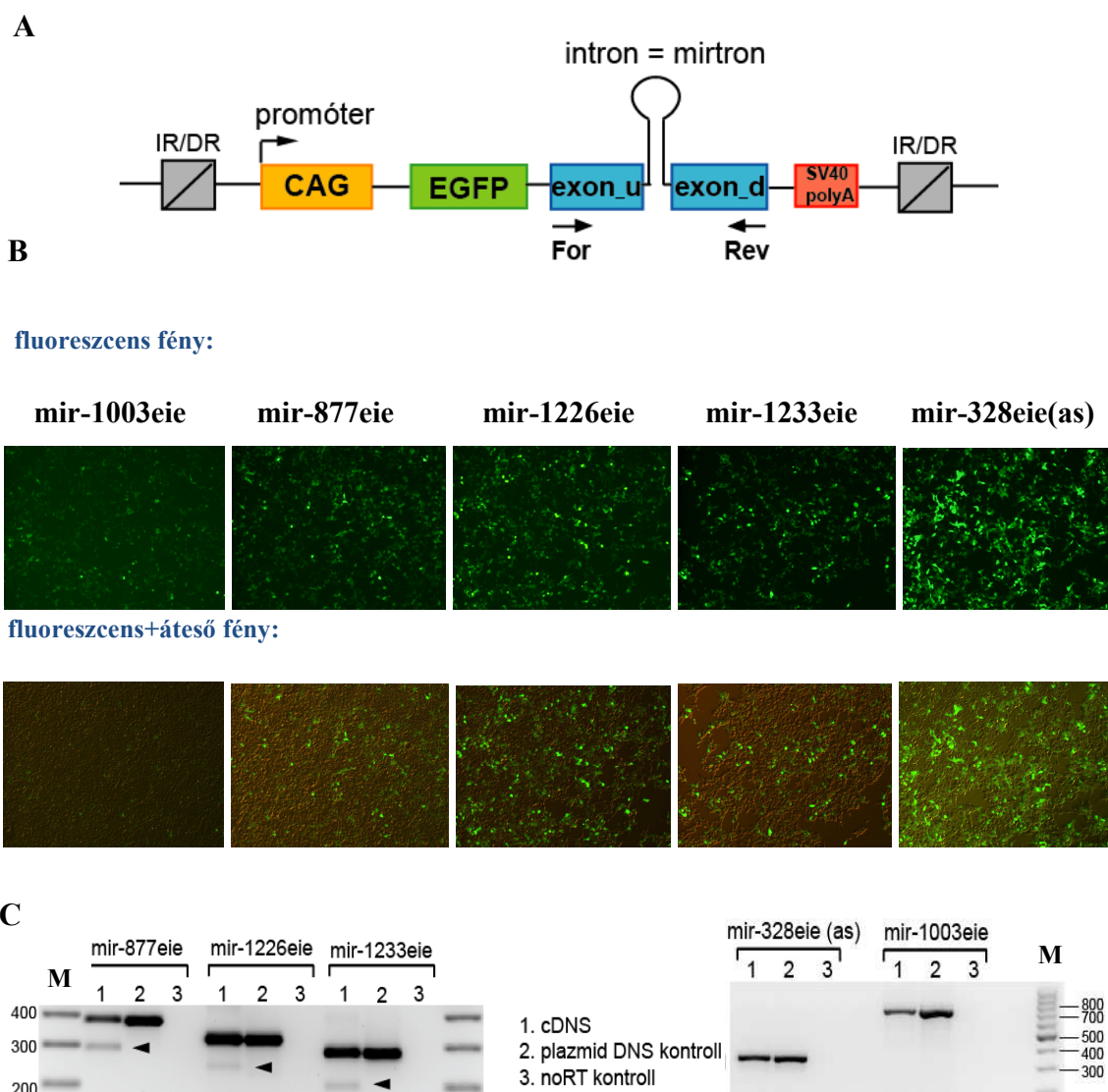
További miRNS kontrollok lettek kiválasztva a különböző módszerek optimalizálásához, illetve a mikroRNS funkcionális vizsgálatokhoz: a humán mir-328-at az eredeti genomi környezetben, míg a szintén humán mir-33b-t a heterológ környezetben történő vizsgálatokhoz alkalmaztuk. A mir-328 az ELMO3 (*engulfment and cell motility 3*) 112 bp-os rövid intronjával antiszenz irányba átfedő kanonikus miRNS [242], míg a mir-33b a SREBF1 (*sterol regulatory element binding transcription factor 1*) gén egy 475 bp-os intronjában elhelyezkedő kanonikus miRNS [243; 244].

A kiválasztott szekvenciák adott szekvencia környezetekből történő splicing predikciói a **mellékletben** találhatóak.

5.1.2. Prediktált mirtronok kifejeződésének vizsgálata eredeti genomi környezetből

A kiválasztott feltételezett humán mirtronokat (mir-877, mir-1226 és mir-1233) először eredeti genomi környezetükből kifejezve vizsgáltuk meg. Ehhez egy *Sleeping Beauty* transzpozonos vektorba klónoztuk őket az EGFP szekvencia mögé, az őket 5' és 3' irányban határoló exonokkal együtt (**14A ábra**). Az eredeti CAG promóterrel meghajtott EGFP vektort – más transzpozonos vektorokkal együtt – egy korábbi munkám során hoztam létre (lásd „Anyagok és módszerek” fejezet, ill. [236]). A három vizsgálandó szekvencia mellett hasonló klónozási stratégiával készültek a kontroll konstrukciók is: a mir-1003 *Drosophila* mirtron, illetve a humán mir-328 kanonikus miRNS is az EGFP szekvencia mögé, a 3' UTR régióba lett klónozva a határoló genomi környezetükkel együtt.

A konstrukciók transzfekcióját követően a transzfekció sikeressége (transzfekciós hatékonyság) az EGFP fehérjének köszönhetően könnyen követhető fluoreszcens mikroszkóp vagy áramlási citométer segítségével. A konstrukciókat emlős (HEK-293) sejtekbe transzfektálva minden esetben – bár eltérő intenzitással – megfigyelhető az EGFP expresszió (**14B ábra**).



14. ábra. A prediktált humán mirtronok és kontrollok kifejezése eredeti szekvencia környezetből.

(A) Az alkalmazott expressziós vektorok sematikus ábrázolása. Az 'IR/DR' (inverted repeat/direct repeat) a transzpozon szekvencia fordított /direkt ismétlődő motívumát jelzi; 'exon_u' az 5' irányban elhelyezkedő (*upstream*), míg 'exon_d' a 3' irányban (*downstream*) határoló exont jelenti. 'For' és 'Rev' a klónozáshoz és RT-PCR-hez használt *forward* és *reverse* primerek tapadási helyét jelzi; 'eie' – az EGFP mögé klónozott exon-intron-exon genomi szekvenciára utal. (B) Fluoreszcens mikroszkópos felvételek a különböző konstrukciók tranzienstanszfekcióját követően (48h). mir-1003eie – validált *Drosophila* mirtron kontroll; mir-877eie, mir-1226eie, mir-1233eie – prediktált humán mirtronok; mir-328eie(as) – kanonikus miRNS kontroll. (C) Splicing detektálása RT-PCR-rel. A fekete nyilak mutatják az intron kivágódását jelző rövidebb PCR termékeket. 'M' molekulatömeg markert jelöl, bázispár egységben.

Annak eldöntésére, hogy az adott konstrukcióból történik-e intron, azaz mirtron kivágódás, RT-PCR-t alkalmaztunk (**14C ábra**). A három prediktált humán mirtron mindegyikénél történt intron kivágódás (splicing), de egyik esetben sem volt tökéletesen hatékony. A mir-328 kanonikus miRNS kontroll esetén az RT-PCR eredményeként nem vártunk splicing-ot jelző rövidebb PRC terméket, mivel a mir-328 expressziójához antiszensz irányban kellett beklónozni az exon-intron-exon genomi DNS darabot. A mir-1003 *Drosophila* mirtron esetében a biztató predikciók ellenére sajnos nem tudtunk splicing-ot kimutatni. Az intronok kivágódásának eredményeként kapott rövidebb PCR termékeket minden esetben megszekszenáltuk, aminek alapján elmondhatjuk, hogy a prediktált mirtronok esetében pontos volt a splicing.

5.1.3. Funkcionális teszt: géncsökkentést gátló képesség vizsgálata

A legelterjedtebb módszer annak a vizsgálatára, hogy egy feltételezett miRNS előformából keletkezik-e géncsökkentésre alkalmas, érett miRNS, a luciferáz esszé. Ehhez a vizsgálathoz a *Renilla* és firefly luciferázt is tartalmazó psiCHECK2 vektort alkalmaztunk. A szenzor konstrukcióban a *Renilla* luciferáz 3' UTR régiójába klónoztuk a prediktált érett miRNS reverz komplementer szekvenciáját. Ennek következtében, a szekvencia komplementaritáson keresztül tud szabályozni az adott érett miRNS. A szenzor konstrukciónak mindig elkészítettük a mutáns változatát is: ez a miRNS 'seed' régiójával komplementer részben 3 pontmutációt tartalmaz, így akadályozva meg a géncsökkentő hatást.

A mérést mindig „háromas kontroll” mellett végeztük és értékeltük. A transzfekeció kontrollja a *Renilla* luciferázzal egy plazmidon kódolt firefly luciferáz volt. Ezen kívül – a nem specifikus hatások elkerülésének érdekében – a megfelelő szenzoron mért csökkentést egyrészt a mutáns szenzorra (2. kontroll), másrészt az adott szenzor/mutáns szenzor párra nem specifikus, ún. „nem-felismerő” miRNS mellett mért hatásra is vonatkoztattuk (3. kontroll).

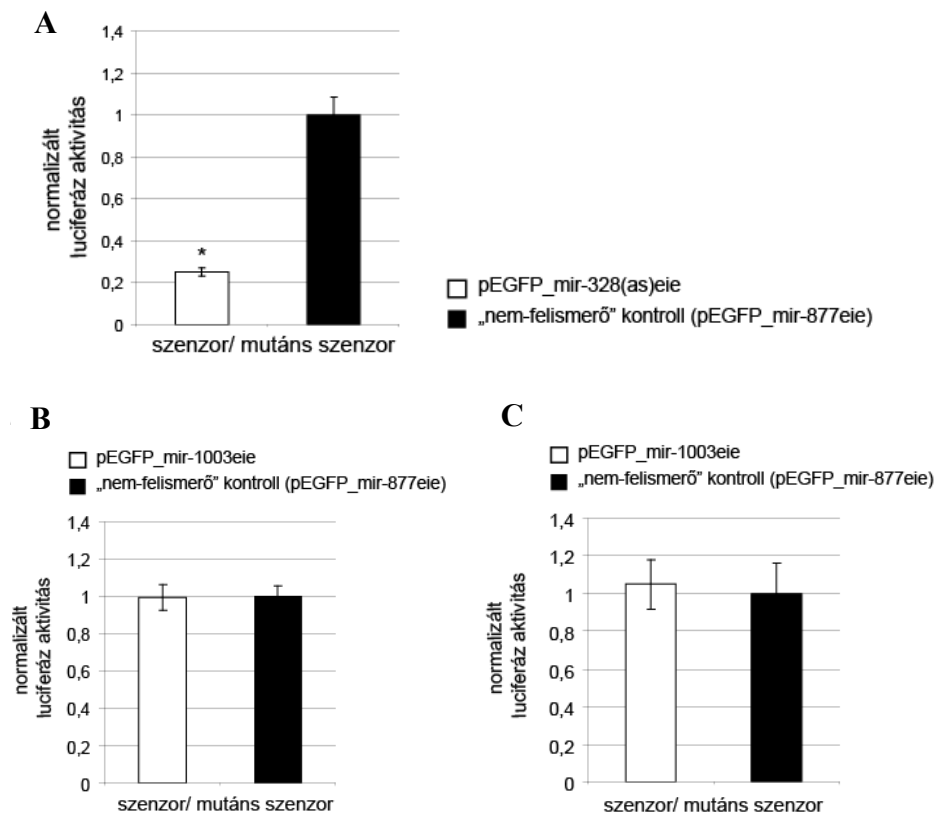
Mivel a predikciók és mélyszekvenálási adatok helyenként ellentmondásosak voltak arra vonatkozóan, hogy az adott mirtronikus miRNS előforma melyik karjából képződik a domináns érett miRNS, így mindhárom vizsgálandó szekvencia esetén mindkét karra specifikus szenzorpárokkal teszteltük a géncsökkentő funkciót. A luciferáz esszék eredményét ábrázoló grafikonokon folytonos vonallal vannak jelezve –

a mirbase adatbázis alapján – a domináns karra vonatkozó adatok, míg szaggatott vonallal a prediktált miR* adatai.

A kontroll mikroRNS-ek génexpressziót gátló hatása

Mivel kutatócsoportunkban a kis RNS-ek kutatása és a hozzá kapcsolódó technikák – köztük a luciferáz esszé is – újdonságnak számított, így ezt a módszert a korábban már leírt, bizonyítottan géncsökkentő hatással bíró mir-328 miRNS-sel és megfelelő szenzoraival optimalizáltuk. A **15A ábrán** látható a mir-328 géncsökkentő hatása: a „nem-felismerő” kontrollhoz viszonyítva ~80%-os specifikus repressziót mutatott HEK-293 sejtekben.

A mirtronikus kontrollnak szánt mir-1003 *Drosophila* mirtron esetében a splicing nem volt kimutatható RT-PCR-el, ennek ellenére megvizsgáltuk, hogy képes-e ebből a szekvenciából – esetleg más módon – érett miRNS keletkezni.



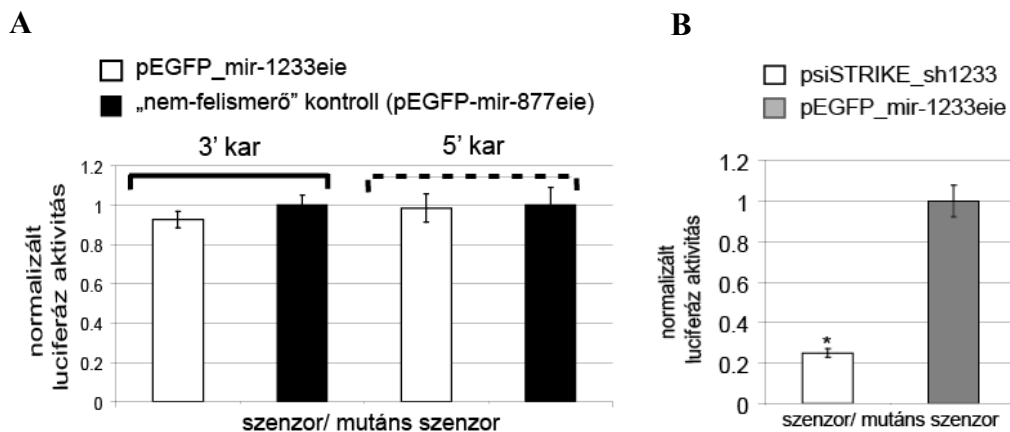
15. ábra. Luciferáz esszé: miRNS-ek génexpressziót gátló hatásának vizsgálata.

(A) A mir-328 géncsökkentő képessége. (B-C) A mir-1003 *Drosophila* mirtron géncsökkentő hatása HEK-293 (B) és HeLa (C) sejtekben. Minden mérés legalább két független kísérletben, három párhuzamos mintával lett megerősítve. Az ábrán egy reprezentatív mérés látható, a hibásávok a standard deviációt (SD) jelzik. *p < 0.001.

Kísérleteinkben a mir-1003 nem mutatott géncsökkentő hatást sem HEK-293 (**15B ábra**), sem HeLa (**15C ábra**) sejtekben a neki megfelelő szenzoron. Ennek következtében sajnos nem tudtuk használni a további kísérleteinkhez.

Prediktált humán mirtronok funkcionális tesztje

A humán mir-1233 géncsökkentő hatását szintén luciferáz esszében, tranziens transzekció után vizsgáltuk HEK-293, illetve HeLa sejtek. Annak ellenére, hogy RT-PCR-el kimutatható volt a mirtronikus intron splicing-ja, sem az 5'- sem a 3'-kar esetében nem kaptunk szignifikáns géncsökkentő hatást (**16A ábra**). Annak kizárására, hogy a hatás hiánya mögött esetlegesen valamilyen technikai probléma állhat, a prediktált érett miR-1233 szekvenciát (3'-kar) shRNS-ként is expresszáztattuk psiSTRIKE vektor segítségével (**16B ábra**). Ebben az esetben szignifikáns géncsökkentő hatást (~80%-os represszió) tapasztaltunk a megfelelő szenzoron a luciferáz esszében.

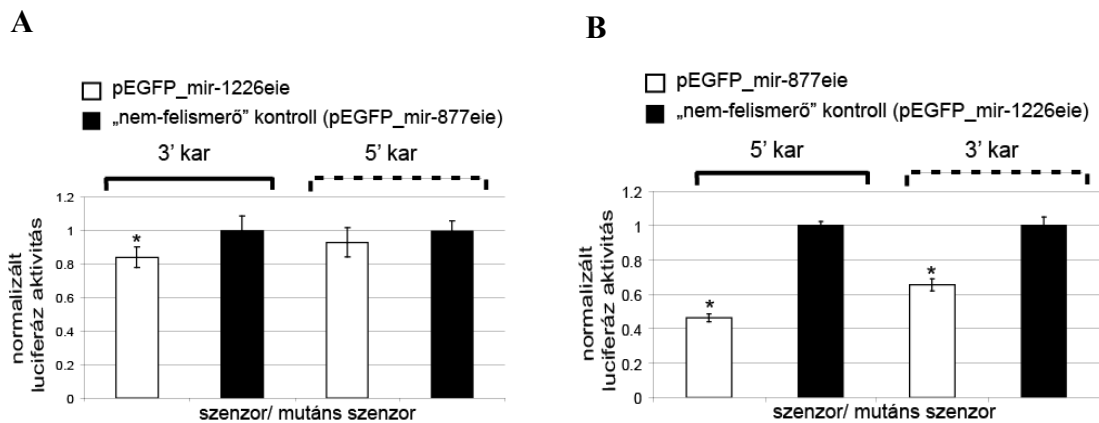


16. ábra. Luciferáz esszé: a humán mir-1233 géncsökkentő hatása.

(A) A humán mir-1233 szekvenciájából nem keletkezik géncsökkentő kis RNS. A prediktált domináns karra vonatkozó vizsgálatok folytonos vonallal, a miR*-ra vonatkozók pedig szaggatott vonallal vannak jelezve. (B) Az shRNS-ként expresszáztattuk humán miR-1233 géncsökkentő hatást mutat. Minden mérés legalább három független kísérletben, három párhuzamos mintával lett megerősítve. Az ábrán egy reprezentatív mérés látható, a hibásávok a standard deviációt (SD) jelzik. * $p < 0.001$.

A mir-1226eie konstrukciót kotranszfektálva a megfelelő szenzorokkal az 5'-kar esetében nem kaptunk génexpressziós gátlást, a 3'-karnak megfelelő szenzoron viszont igen. Ez összhangban van a korábbi predikciókkal, ami szerint a pre-miRNS 3'-karjából származik a funkcionális érett kis RNS. A géncsökkentés mértéke nem nagy (~20%), de szignifikánsan eltér a „nem-felismerő” miRNS kontrolltól (**17A ábra**).

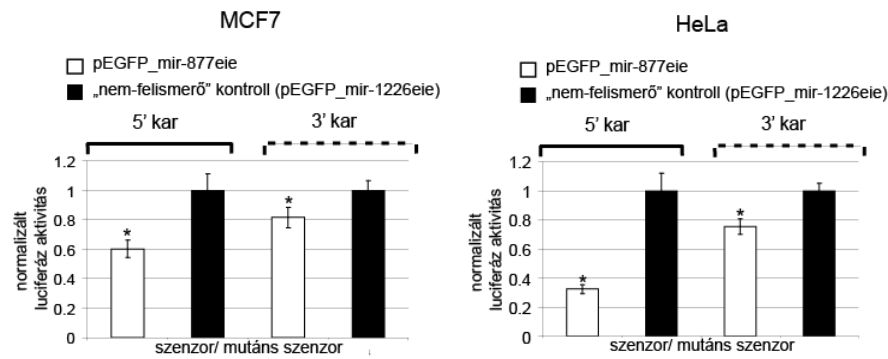
A mir-877 szekvencia esetében a pre-miRNS domináns karjának az 5'-kar volt megjelölve. Luciferáz esszében tesztelve a mir-877eie konstrukciót meglepő módon azt tapasztaltuk, hogy mind az 5'-kar, mind a 3'-kar esetében kimutatható volt a génexpresszió gátlása (~60% illetve ~40% repressziót tapasztaltunk; **17B ábra**).



17. ábra. A humán mir-1226eie (A) és mir-877eie (B) szekvenciák géncsökkentő hatása HEK-293 sejtekben.

A prediktált domináns karra specifikus vizsgálatok folytonos vonallal, a miR*-ra specifikusak pedig szaggatott vonallal vannak jelezve. A kísérleti/ábrázolási részleteket lásd a 16. ábra aláírásában; *p < 0.05.

A továbbiakban azt vizsgáltuk meg, hogy sejtspecifikus, egyedi jelenség-e az, hogy a mir-877eie szekvencia mindkét karjából képes funkcionális, génexpresszió gátlására alkalmas kis RNS élni. Ehhez két további, a HEK-293 sejtvonaltól eltérő eredetű emlős sejtvonalat használtunk. Mind az MCF7, mind a HeLa sejtvonal esetében azt tapasztaltuk, hogy a pre-mir-877 mindkét karjából funkcionális miRNS képződik (**18. ábra**).



18. ábra. A mir-877eie hatása a génkifejeződésre különböző sejtvonalakban.

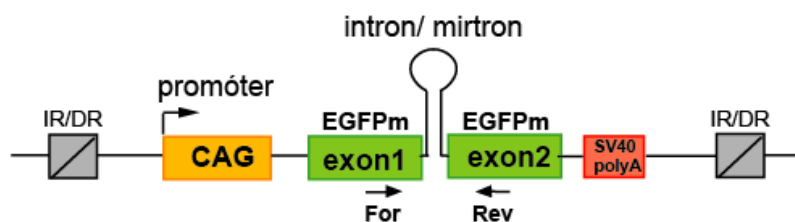
A prediktált domináns karra specifikus vizsgálatok folytonos vonallal, a miR*-re specifikusak pedig szaggatott vonallal vannak jelezve. A kísérleti/ábrázolási részleteket lásd a 16. ábra aláírásában; *p < 0.025.

A géncsendesítés mértéke különböző volt a különféle sejtvonalakban, de az a tendencia állandónak bizonyult, hogy az 5'-kARBól származó kis RNS mindig jelentősebb génextpressziós gátlást mutatott, mint a 3'-kARBól származó.

Az endogén környezetből történő vizsgálatok összegzéseként azt mondhatjuk, hogy míg a *Drosophila* mir-1003 nem, a három prediktált humán mirtron viszont képes volt kivágódni a határoló exonjai közül emlős sejtekben. Géncsendesítésre alkalmas miRNS azonban csak a mir-1226 és mir-877 szekvenciákból képződött.

5.1.4. Prediktált mirtronok heterológ szekvencia környezetben történő vizsgálata

Következő lépésként azt szeretnénk volna megvizsgálni, hogy a humán mirtronok a határoló exonoktól függetlenül is képesek-e megfelelően processzálódni. Ehhez az általunk kiválasztott három prediktált mirtron szekvenciát heterológ környezetbe klónoztuk: az EGFP-t kódoló szekvenciát két exonra osztottuk és közéjük ékeltük intronként a mirtronokat (**19. ábra**). Ez az expressziós rendszer azért előnyös, mert a marker gén (EGFP) kifejeződése szorosan kapcsolódik a miRNS expressziójával. Normál EGFP fehérje csak az intron megfelelő kivágódásával tud keletkezni, ami egyben a mirtron processzálódásának első lépése is.



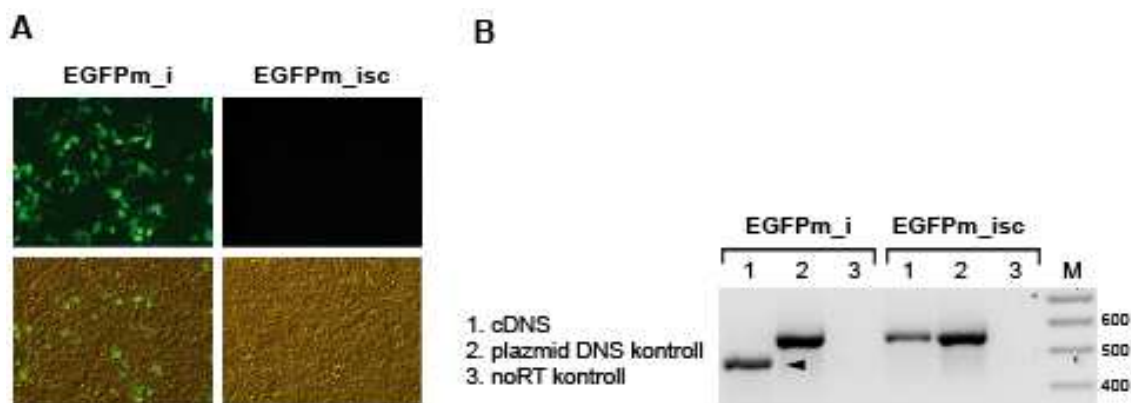
19. ábra. Mirtronok heterológ környezetből történő expressziójához létrehozott vektorok vázlatos ábrázolása.

Az 'IR/DR' a transzpozon szekvencia fordított /direkt ismétlődő motívumát jelzi; 'EGFPm' mutagenezissel hasítási hely bevitele céljából módosított EGFP szekvencia; 'exon1' az 5' irányban elhelyezkedő (*upstream*), míg 'exon2' a 3' irányban (*downstream*) határoló exont jelenti. 'For' és 'Rev' a szekvenáláshoz, illetve az RT-PCR-hez használt *forward* és *reverse* primerek tapadási helyét jelzi.

Lacy-Hulbert és mtsai közleményét [238] alapul véve az EGFP cDNS – mutagenezissel történő restrikciós hely bevitelét követően (EGFPm) – két helyen is megszakítható. A 3' (*downstream*) hely az 5' (*upstream*) irányban elhelyezkedő helyhez képest alkalmasabbnak tűnt a mirtronok expressziójára a splicing predikciók alapján (lásd **melléklet**), így ezt a helyet használtuk a továbbiakban a klónozáshoz.

Expresszió és splicing

A módosított EGFP szekvencia (EGFPm) megfelelő expressziójára és a splicing ellenőrzésére először a egér IgCe gén 82 bázispár hosszúságú harmadik intronját (EGFPm_i), illetve annak 5' splice hely mutáns verzióját (EGFPm_{isc}) klónoztuk az EGFPm cDNS-ébe [238]. Tökéletes intron kivágódás esetén az EGFP fehérje expressziója figyelhető meg, míg a splicing mutáns intron esetében nem történik meg az intron kivágódása, így nem tud normál EGFP fehérje képződni (**20. ábra**).

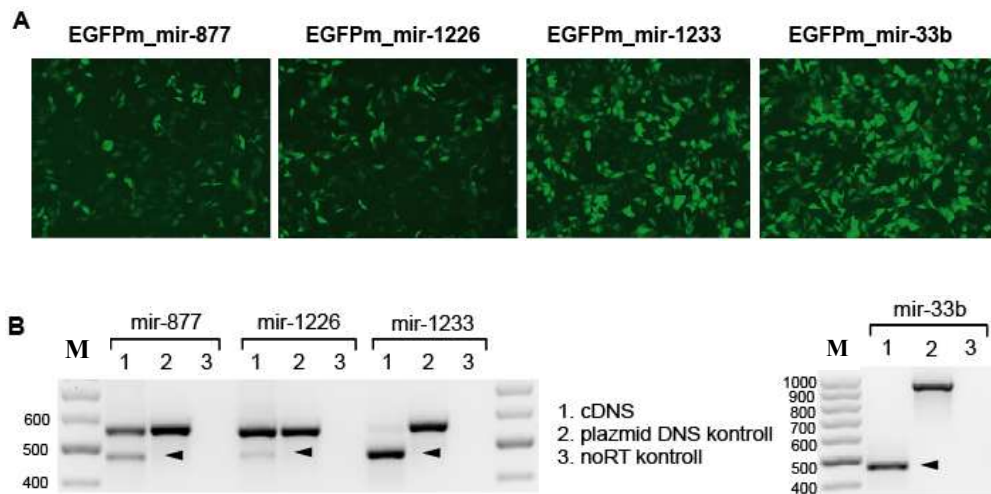


20. ábra. Egér intront (EGFPm_i), illetve annak splicing mutáns verzióját (EGFPm_{isc}) tartalmazó módosított EGFP szekvencia expressziója.

(A) Fluoreszcens mikroszkópos felvételek (felső képek: csak fluoreszcens megvilágítás, alsó képek: fluoreszcens + áteső fény). (B) Splicing detektálása RT-PCR-el. A fekete nyíl mutatja az intron kivágódását jelző rövidebb PCR terméket. 'M'-molekulatömeg marker; bázispár egység.

Ezek után a *Drosophila* mir-1003 mirtront, a humán mir-33b kanonikus miRNS kontrollt és a három, korábban már vizsgált prediktált humán mirtront klónoztuk a módosított EGFP szekvenciába. A mir-33b egy olyan kanonikus miRNS, ami a mirtronokhoz hasonlóan egy gén intronjában foglal helyet [243; 244], de ez az intron egy pre-miRNS-nél nagyobb méretű (475bp), így az intron nem fed át teljes egészében a pre-mir-33b-vel. A létrehozott mir-1003, mir-877, mir-1226, mir-1233 és mir-33b expresszáló plazmidokat (EGFPm_{mir-1003}, EGFPm_{mir-877}, EGFPm_{mir-1226}, EGFPm_{mir-1233}, EGFPm_{mir-33b}) HeLa sejtekben fejeztük ki.

Az EGFPm_{mir-1003} konstrukció transzfekcióját követően nem kaptunk EGFP expressziót, és RT-PCR-el sem volt kimutatható splicing (nem mutatott adat). Az összes többi konstrukció transzfekcióját követően mindig kaptunk EGFP expressziót jelző zöld sejteket, ami az intronok megfelelő kivágódását feltételezte (**21A ábra**). A splicing jelenségét RT-PCR-el is megerősítettük. A splicing-ot jelző rövidebb PCR termékek megjelenése minden esetben megfigyelhető, de a kivágódás hatékonysága eltérő mértékű (**21B ábra**). A pontos splicing a PCR termékek szekvenálásával lett minden esetben ellenőrizve.

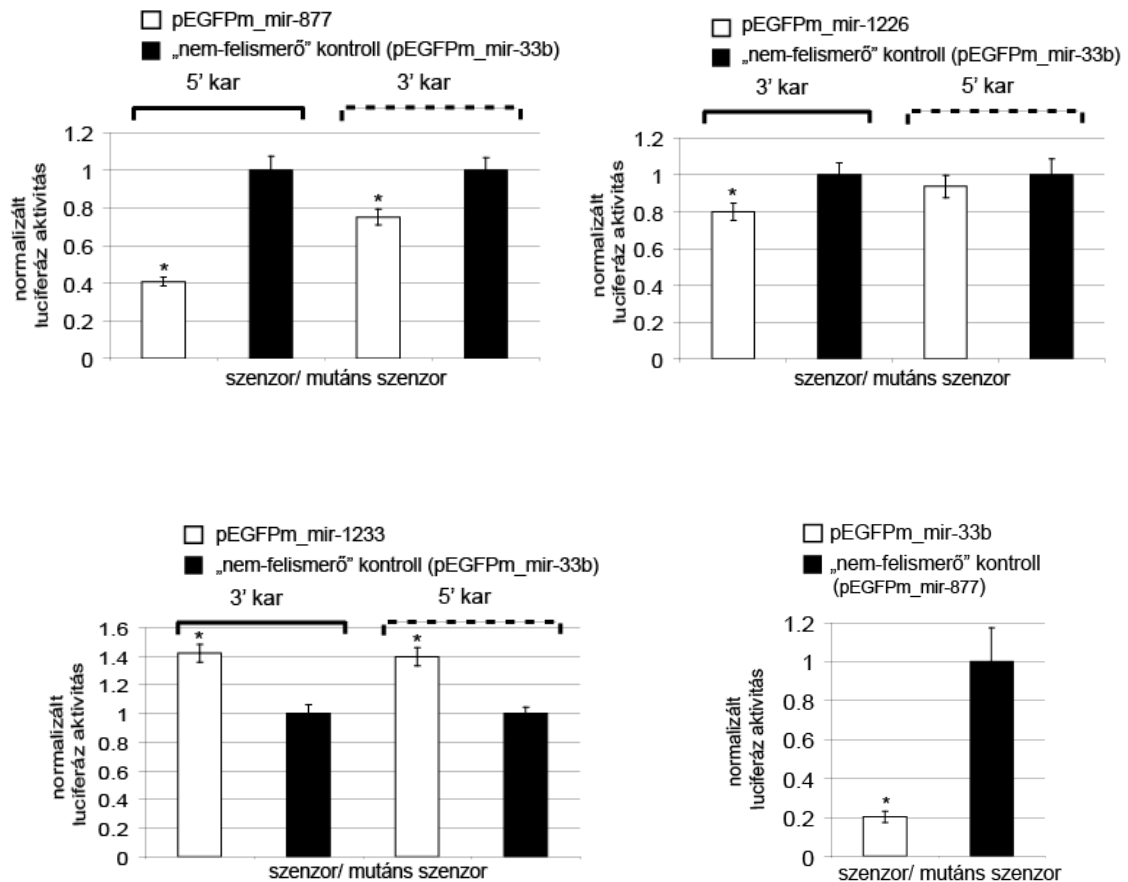


21. ábra. Mirtron és miRNS expresszió heterológ (EGFP) környezetből.

(A) Fluoreszcens mikroszkópos felvételek. (B) Splicing detektálása RT-PCR-el. A fekete nyilak mutatják az intron kivágódását jelző rövidebb PCR termékeket. 'M'-molekulatömeg marker; bázispár egység.

Funkcionális tesztek

Miután meggyőződünk arról, hogy a heterológ környezetből expresszált prediktált mirtronok ki tudnak vágódni a határoló exonjaik közül, luciferáz esszében teszteltük, hogy a splicing után keletkezik-e belőlük géncsendesítésre alkalmas érett miRNS. HeLa sejtekben tranziensen expresszáva a megfelelő vektorokat, a mir-877 és mir-1226 esetében nagyon hasonló eredményeket kaptunk az endogén környezetből mértékhez: a mir-1226 3'-karja esetén egy gyenge repressziót tapasztaltunk, míg a mir-877 mindkét karjából génkifejeződést gátló érett miRNS keletkezett. A mir-33b kanonikus miRNS kontroll expressziójakor is tapasztaltunk géncsendesítő hatást, ami igen jelentős, kb. 80%-os volt. Ezzel szemben a mir-1233 expressziójakor a génkifejeződés gátlása helyett növekedést tapasztaltunk (22. ábra).



22. ábra. Heterológ környezetből kifejezett prediktált mirtronok és a mir-33b kanonikus miRNS géncsökkentő hatása.

A kísérleti/ábrázolási részleteket lásd a 15. ábra aláírásában; * $p < 0.025$.

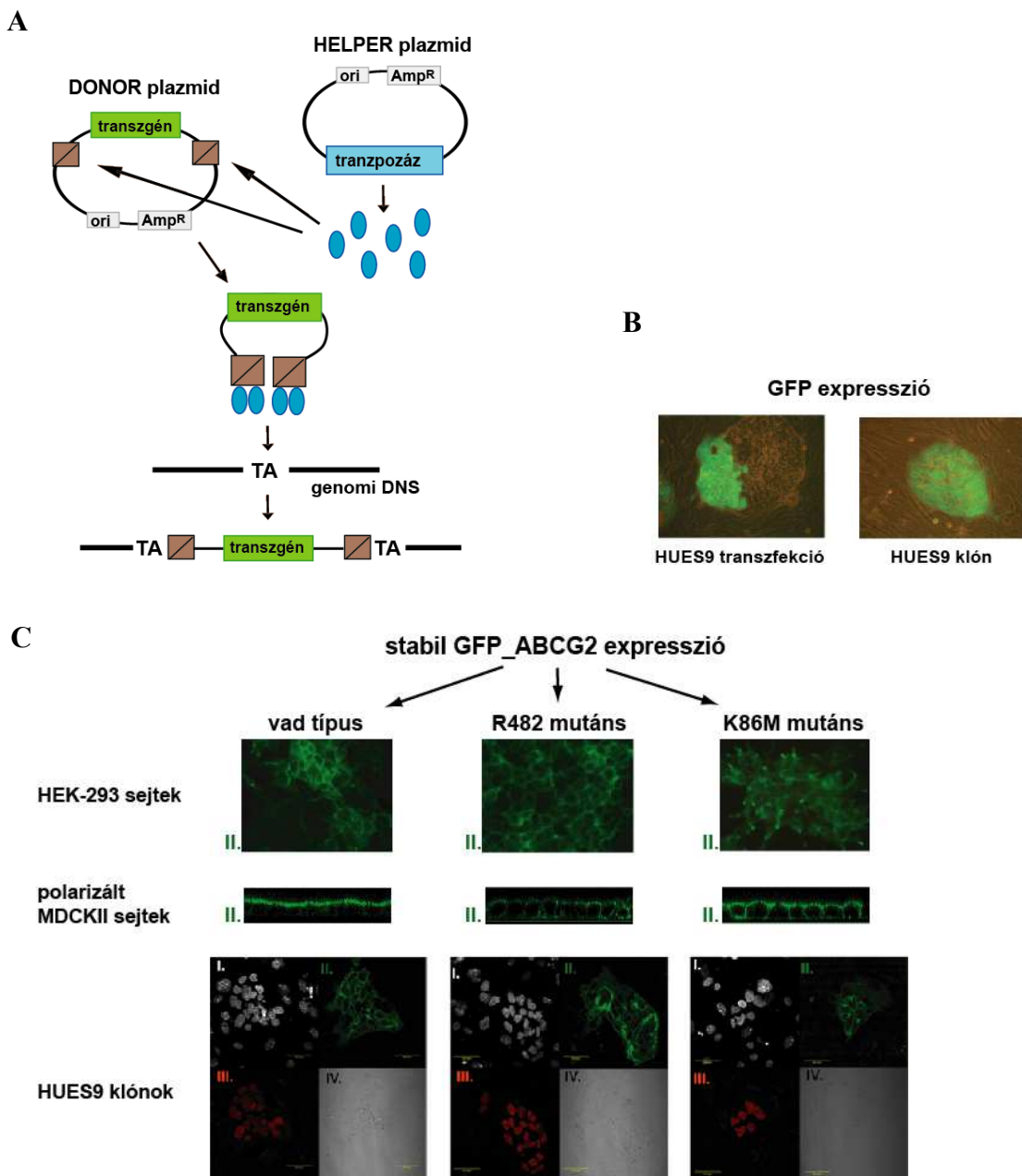
Az eddigi eredmények alapján elmondhatjuk, hogy az általunk kiválasztott három prediktált mirtron szekvencia közül - bár eltérő hatékonysággal, de - mindegyik képes kivágódni mind az endogén, mind heterológ szekvencia környezetekből. Vizsgálataink azt is mutatják, hogy a mir-877 és mir-1226 szekvenciákból a határoló exonok szekvenciájától függetlenül géncsökkentésre alkalmas miRNS keletkezik. A mir-877 speciálisnak tűnik olyan szempontból, hogy a pre-miRNS mindkét karjából szimultán keletkezik a RISC komplexbe beépülő, géncsökkentést gátló miRNS.

5.2. Stabil mikroRNS expresszió létrehozása a *Sleeping Beauty* transzpozon alapú génbeviteli rendszer segítségével

Egy adott mikroRNS által szabályozott cél RNS, vagy cél RNS-ek meghatározása még napjainkban is nehéz feladat. Bioinformatikai predikciók segíthetik a potenciális targetek megtalálását, de minden esetben elengedhetetlen feltétel a kísérletes igazolás. Ha egy miRNS a sejt számára alapvetően fontos folyamatban résztvevő gént szabályoz, akkor azt várhatjuk, hogy az adott miRNS overexpressziója látványos fenotípust, szélsőséges esetben akár letalitást is eredményez. Egy ilyen esetleges szabályozási funkció feltárására, illetve további alkalmazások céljából a prediktált mirtronokat (és kontroll miRNS-eket) stabilan expresszáló sejtvonalatokat hoztunk létre. Ehhez a *Sleeping Beauty* transzpozon alapú génbeviteli rendszert alkalmaztuk.

Ezzel a rendszerrel az adott transzgént stabilan expresszáló sejtvonalatokat úgy hozzuk létre, hogy a transzgént tartalmazó transzpozonos vektort kotranszfectáljuk a transzpozáztt kódoló vektorral. A transzfectió után a tranziensen kifejeződő transzpozáz a transzpozon (IR/DR) szekvenciáihoz köt, majd kivágja a transzpozont a plazmidból (az IR/DR szekvenciákat és az általuk határolt transzgént), és az ún. „cut and paste” mechanizmussal beilleszti a gazdasejt genomjába (**23A ábra**).

Ezt a génbeviteli eljárást korábban sikeresen alkalmaztuk különféle transzgének különböző eredetű emlős sejtekben történő kifejeztetésére, stabil sejtvonalak létrehozására (**23B és 23C ábra**; [236; 237], ill. nem publikált adatok).



23. ábra. Stabil transzgén expresszió létrehozása a *Sleeping Beauty* transzpozonos rendszer segítségével (fluoreszcens és konfokális mikroszkópia).

(A) A *Sleeping Beauty* transzpozonos rendszer vázlatos működése. 'ori': bakteriális replikációs origó; 'Amp^R': ampicillin rezisztencia gén; 'TA': dinukleotid célszekvencia, ami a transzpozíció során duplikálódik. (B*) Humán embrionális őssejtek (HUES9 sejtvonala) kotranszekciója EGFP-t tartalmazó transzpozonos vektorral és transzpozázssal (balra), majd sejtvonala alapítása GFP alapú sejtleválogatást követően (jobbra). (C*) Az ABCG2 multidrog transzporternek (vad típus), ill. mutánsainak GFP címkézett formájában történő stabil expressziója különböző sejtvonalakban. 'I' – DAPI (magfestés); 'II' – GFP (lokalizáció a sejtmembránban); 'III' – oct4 (őssejtmarker, magi lokalizáció); 'IV' – áteső fény.

*Megjegyzés: A HUES9 sejtek fenntartása és a mikroszkópos felvételek nem saját kezűleg készültek, köszönet érte Dr. Apáti Ágotának és Erdei Zsuzsának.

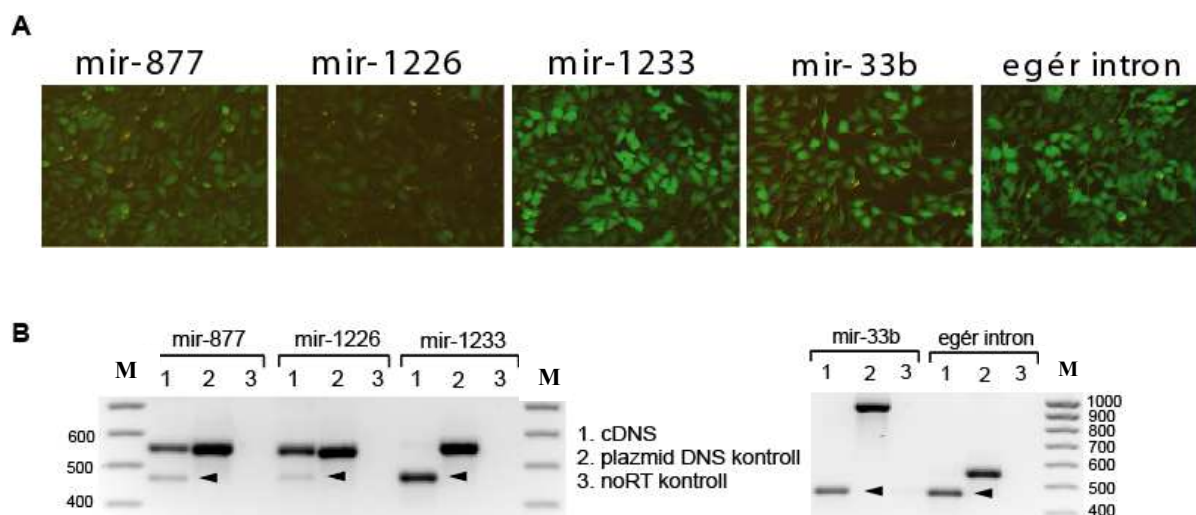
A humán mirtronokkal kapcsolatos munkához három, a prediktált humán mirtronokat expresszáló, és két kontroll HeLa sejtvonalat hoztunk létre. Az öt sejtvonal létrehozásához a heterológ környezetből expresszáló vektorokat használtuk, mivel ebben az esetben az EGFP marker gén expressziója – amit a sejtek „leválogatáshoz” használtunk – szorosan korrelál a benne intronként elhelyezett miRNS-ek expressziójával. Az EGFPm_mir-877-et, EGFPm_mir-1226-ot és EGFPm_mir-1233-at stabilan kifejező HeLa sejteken kívül létrehoztunk az egér intront tartalmazó EGFPm_i-t és a EGFPm_mir-33b-t stabilan expresszáló sejtvonalakat.

A transzfecciót követően először a 8. napon lettek leválogatva az EGFP pozitív sejtek (*sort*), amikor már nem történik a tranziens plazmidokról expresszió. Ilyenkor az EGFP már csak a genomba beépült kópiákról fejeződik ki. A második *sort* a transzfecciót követő 17. napon történt. A sejtvonalak tisztasága áramlási citométer (FACS) segítségével lett ellenőrizve. A *sort* és FACS során mért EGFP expressziós adatokat az **1. táblázat** tartalmazza, egy reprezentatív áramlási citometriás mérés (IV.FACS) adatai a **mellékletben** találhatóak.

sejtvonalak	EGFP %					
	<u>I.sort</u> (8.nap)	I.FACS (14.nap)	<u>II.sort</u> (17.nap)	II.FACS (23.nap)	III.FACS (41.nap)	IV.FACS (56.nap)
mir-877	40.8	91.9	91.6	99.5	99.5	99.3
mir- 1226	25	91.9	91.4	99.4	99.6	99.4
mir- 1233	51.6	92.6	91.8	99.5	99.5	99.5
mir- 33b	55.1	88.6	87.7	99.1	98.9	98.5
egér intron	66.5	89.6	88.5	99.5	99.5	99.4

1. táblázat. Sejtvonalak létrehozása során mért áramlási citometriás adatok (sort, FACS): EGFP-t expresszáló sejtek aránya a sejtpopulációban.

A *Sleeping Beauty* transzpozonos rendszer segítségével mind az öt expressziós vektort stabilan kifejező sejtvonalat sikerült létrehozni (**24A ábra**). Az intronok kivágódását RT-PCR-el ellenőriztük (**24B ábra**), az érett miRNS-ek keletkezését pedig később qRT-PCR-rel ellenőriztük (lásd **5.4.3. fejezet**).



24. ábra. Intronikus miRNS expresszió stabil sejtvonalakból.

(A) Az intron kivágódására utaló EGFP expresszió megfigyelhető az összes létrehozott sejtvonalban. (B) Az intron kivágódás bizonyítása RT-PCR-el. A fekete nyilak mutatják az intron kivágódását jelző rövidebb PCR termékeket. 'M'-molekulatömeg marker; bázispár egység.

Összességében elmondhatjuk, hogy a különböző sejtvonalak morfológiájukat, illetve növekedési sebességüket tekintve – normál sejtfenntartási körülmények között – nem mutattak eltérést. Az EGFP expresszió mértékében megfigyelhető különbség az eltérő hatékonyságú splicing-ra utal. A stabil sejtvonalakban luciferáz esszével is validáltuk a funkcionális miRNS-ek érését (nem mutatott adat).

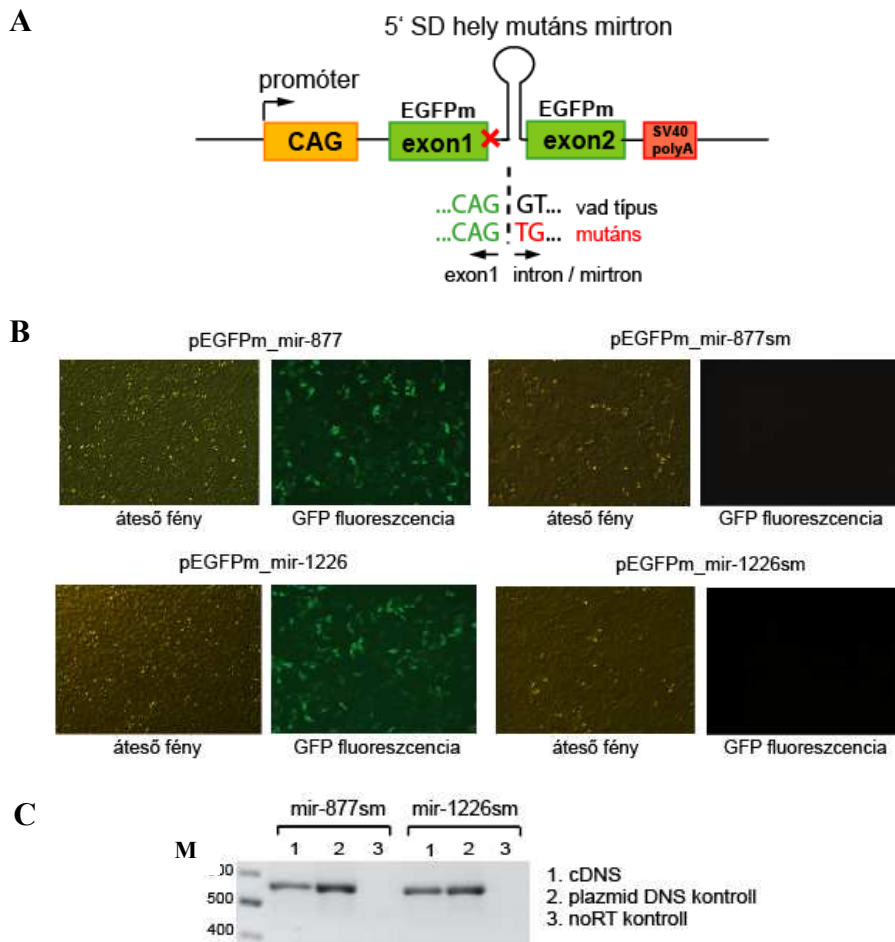
5.3. A humán mirtron biogenezis vizsgálata

Az előzőekben bizonyítottuk, hogy vannak olyan prediktált humán mirtronikus szekvenciák (mir-877, mir-1226), amik a határoló exonok szekvenciájától függetlenül ki tudnak vágódni, és géncsendesítésre képes kis RNS-ek keletkeznek belőlük. Ezután azt szeretnénk volna igazolni, hogy ezek a mikroRNS-ek valóban a mirtron, és nem a kanonikus miRNS útvonalon keresztül érnek, tehát valóban létezik a mirtron útvonal emlősökben. Ehhez egyrészt az érés splicing függését, másrészt a Drosha/DGCR8 komplextől való függetlenségét kellett igazolni.

5.3.1. Humán mirtron szekvenciákból történő miRNS érés splicing függésének vizsgálata

A mirtron eredetű miRNS keletkezés splicing függésének vizsgálatához olyan mir-877 és mir-1226 konstrukciókat készítettünk, amelyekben az 5' splice donor (SD) hely mutáns: az intronikus konszenzus 5' GT dinukleotid szekvenciát TG-re cseréltük, hogy ezzel megakadályozzuk az intron kivágódását (**25A ábra**).

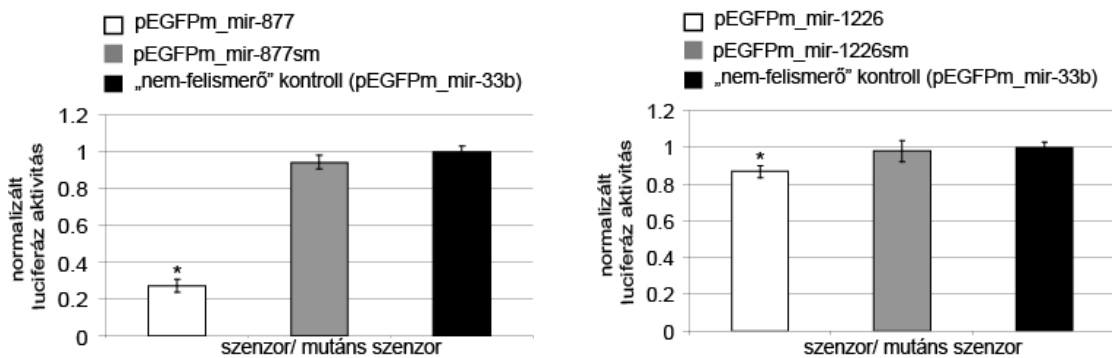
Az 5' splice hely mutáns mirtronokat (mir-877sm és mir-1226sm) tartalmazó konstrukciókat HeLa sejtekbe transzfektálva nem kaptunk EGFP pozitív sejteket, ami arra utalt, hogy a bevitt mutáció megakadályozta az intron kivágódását és ezzel az EGFP fehérje képződését. Az EGFP kódoló szekvenciájában maradt intront RT-PCR-el is kimutattuk (**25B és 25C ábra**).



25. ábra. Az 5' splice hely mutáns mirtronok kifejezése HeLa sejtekben.

(A) Az 5' splice hely mutáns mirtronokat kifejező konstrukciók vázlatos rajza. (B) Vad típusú és splicing mutáns konstrukciókról történő EGFP expresszió összehasonlítása (fluoreszcens mikroszkópos felvételek). (C) Splicing detektálása RT-PCR-el. 'M'-molekulatömeg marker; bázispár egység.

A splicing mutáns konstrukciókat ezután luciferáz esszében vizsgáltuk. Abban az esetben, ha a mir-877 és mir-1226 valódi mirtronok, az 5' splice hely mutációjának meg kell akadályoznia az érett miRNS képződését. Eredményeink azt mutatják, hogy a mutáns konstrukciók esetében a „nem-felismerő” miRNS kontrollal azonos jelszinteket kapunk (**26. ábra**). Ez azt jelenti, hogy mind a mir-877, mind a mir-1226 esetében – a vad típusú konstrukciókkal ellentétben – a splicing mutáns plazmidokról nem képződik géncsökkentő hatással bíró miRNS.



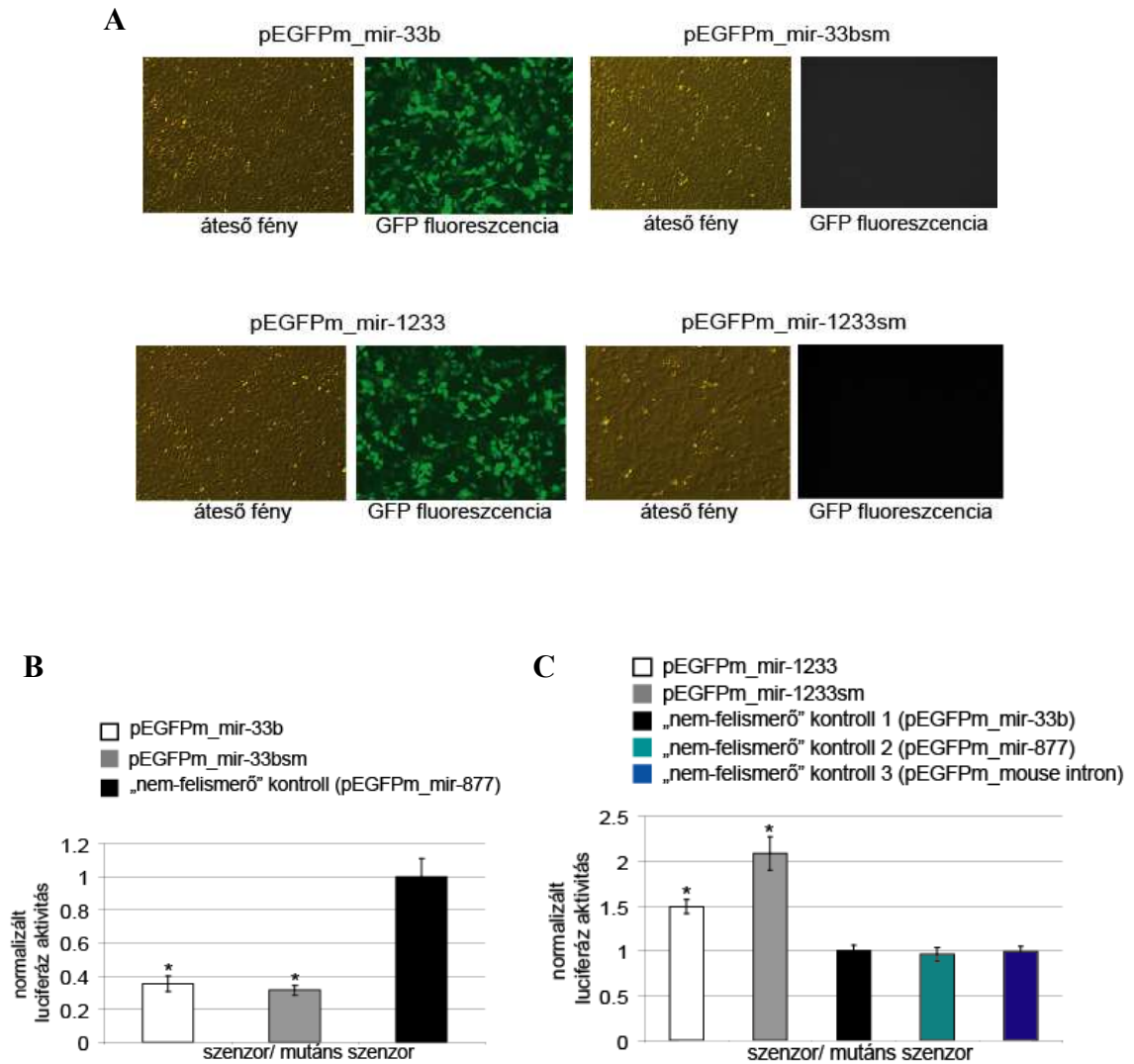
26. ábra. A splicing mutáns mir-877sm és mir-1226sm konstrukciókról nem képződik géncsökkentésre alkalmas miRNS.

A kísérleti/ábrázolási részleteket lásd a 16. ábra aláírásában; * $p < 0.05$.

A mir-877sm és mir-1226sm vektorok mintájára elkészítettük a mir-33b-t és mir-1223-at tartalmazó intronok 5' splice donor hely mutáns verzióját is. A mir-33bsm konstrukció a kanonikus miRNS érési útvonal kontrolljaként szolgált, míg a mir-1223sm esetében arra voltunk kíváncsiak, hogy a pEGFPm_mir-1223 expressziójakor a luciferáz aktivitásban tapasztalt növekedés eltűnik-e a splicing mutáció következtében.

HeLa sejtekbe transzfektálva a mir-33bsm és mir-1223sm vektorokat azt tapasztaltuk, hogy egyik mutáns konstrukcióról sem történt EGFP expresszió (**27A ábra**). Luciferáz esszében összehasonlítva a mir-33bsm konstrukciót a vad típusú párjával hasonló mértékű repressziót kaptunk, tehát a splicing mutáció nem volt képes meggátolni a funkcionális, érett miRNS-ek képződését (**27B ábra**). A mir-1223 esetében pedig azt mutatták az adatok, hogy a splicing mutáció nem szüntette meg a korábban megfigyelt pozitív hatást a szenzoron, sőt, az még kifejezettebb lett. Ez a

luciferáz aktivitásban bekövetkezett növekedés akkor is megfigyelhető volt, amikor – elkerülendő az esetlegesen rossz kontrollhoz való viszonyítást – különböző miRNS-eket, illetve miRNS-t egyáltalán nem expresszáló „nem-felismerő” kontrollokhoz viszonyítottuk az eredményeket (27C ábra).



27. ábra. A splicing mutáns mir-33bsm és mir-1233sm konstrukciók vizsgálata.

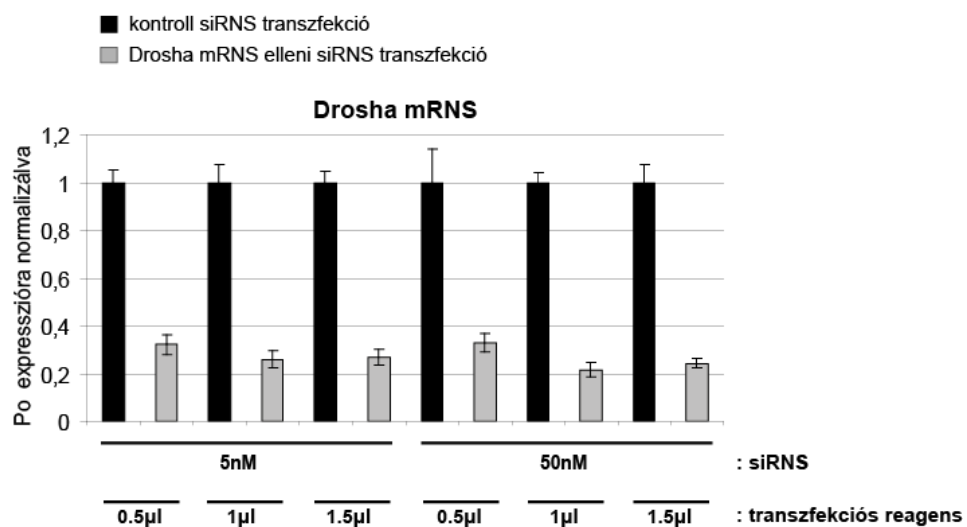
(A) Fluoreszcens mikroszkópos felvételek: GFP expresszió vad típusú és splicing mutáns konstrukciók expresszálását követően. A mir-33bsm (B) és mir-1233sm (C) konstrukciók géncsendesítése a vad típusú, illetve „nem-felismerő” kontrollokhoz viszonyítva. A kísérleti/ábrázolási részleteket lásd a 15. ábra aláírásában; *p < 0.001.

5.3.2. A humán mirtron biogenezis Drosha/DGCR8 komplextől való függetlenségének igazolása

Az előzőekben igazoltuk, hogy van olyan géncsendesítő funkcióval bíró, prediktáltan mirtron eredetű humán miRNS (miR-877 és miR-1226), aminek az érése a mirtronokra jellemző módon valóban splicing függő. Ezek után azt szeretnénk volna bizonyítani, hogy ez az érés – a kanonikus miRNS éréstől eltérően – független a Drosha/DGCR8 komplex működésétől.

A Drosha fehérje expressziójának gátlása siRNS-sel

Első megközelítésként Drosha deficiens sejtekben terveztük megvizsgálni a prediktált mirtron szekvenciák processzáldását. Ehhez a Drosha fehérje expresszióját tranziens siRNS transzfekcióval kívántuk meggátolni. Először optimalizálni próbáltuk a kísérleti körülményeket: különböző transzfekciós reagensek (FuGENE[®] HD és 6, Lipofectamine[®] 2000) és különböző siRNS koncentrációk (5nM, 50nM, 100nM) használatával, ill. ezek különböző arányú kombinációjával. A legnagyobb mértékű mRNS csökkenést HeLa sejtvonalakban, Lipofectamine[®] 2000 transzfekciós reagenst alkalmazva értük el. A mir-33b-t overexpresszáló HeLa sejtvonalonban ~70-80%-os csökkenés volt mérhető a Drosha mRNS szintjében 48 órával a transzfekciót követően (28. ábra).



28. ábra. Drosha mRNS ellen tervezett siRNS transzfekciók hatása a Drosha mRNS szintjére a kontroll siRNS-hez viszonyítva.

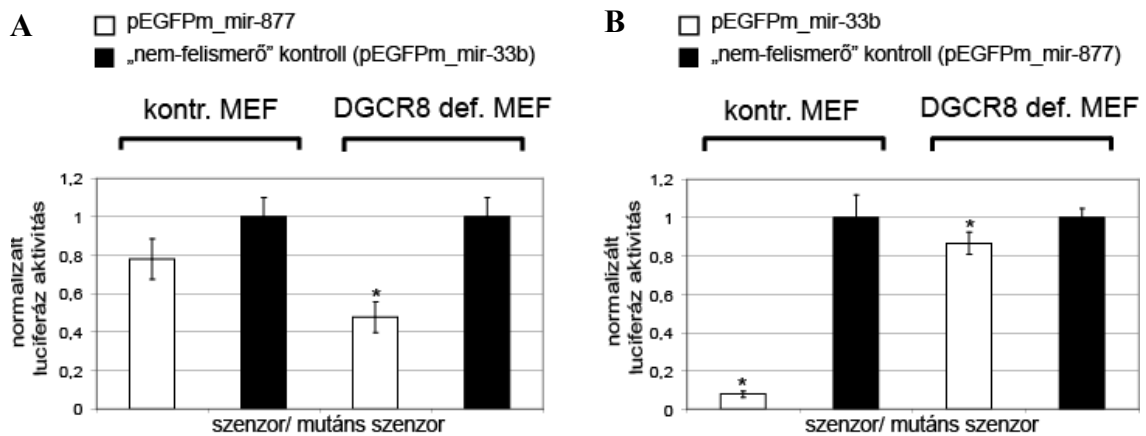
A hibasávok a standard deviációt mutatják.

Mivel a Drosha mRNA szintjének csökkenése ellenére a miR-33b szintjében nem láttunk csökkenést a kontroll siRNA-sel történő transzfekcióhoz viszonyítva, így további optimalizációs kísérleteket folytattunk: más sejtvonalakat (HEK-293, MCF7), különböző siRNA koncentrációkat, illetve többszörös „felül-transzfektlást” (2-3 naponként újra transzfektlás siRNA-sel) alkalmaztunk. Mindezek során qRT-PCR-el detektáltuk a Drosha mRNA, illetve a kanonikus endogén pri-miR-21/miR-21, és a tranziensen vagy stabilan overexpresszált miR-33b szinteket. Eredményként mindig azt kaptuk, hogy bár a Drosha mRNA elleni siRNA-sel transzfektlált sejtekben csökkent a Drosha mRNA szintje a kontroll siRNA-sel történő transzfekcióhoz képest (~30%–80%), mégsem láttunk különbséget a kanonikus útvonalon érő érett miRNA-szintjében. A Drosha elleni siRNA-sel, illetve kontroll siRNA-sel transzfektlált sejtekben luciferáz esszéit is végeztünk, de a miR-33b géncsendesítő hatásában sem tudtunk változást kimutatni.

A pozitív kontrolljaink alapján azt láttuk (nem volt csökkenés a vizsgált kanonikus érett miRNA-szintjében), hogy a Drosha funkció megmaradt az mRNA szintben bekövetkezett jelentős csökkenés ellenére. Ezért úgy döntöttünk, hogy más megközelítéssel próbáljuk bizonyítani, hogy létezik a Drosha/DGCR8 komplex aktivitásától független emlős mirtron útvonal.

miR-877 expresszió vizsgálata DGCR8 deficiens MEF sejtekben

Ezt követően Robert Blelloch laboratóriumától kapott DGCR8 deficiens egér embrionális fibroblaszt (MEF) sejtekben próbáltuk kísérletesen igazolni, hogy a mirtronikus miRNA biogenezis nem csak gerinctelenekben létezik, hanem magasabbrendűekben (emlősökben) is. Ehhez a miR-877 érését vizsgáltuk vad típusú (kontroll) és DGCR8 deficiens MEF sejtekben. A miR-877 szekvenciából a DGCR8 deficiens sejtekben géncsendesítésre alkalmas miRNA érett, ami a Drosha/DGCR8 komplextől független képződést jelzi. A gátló hatás a vad típusú MEF sejtekben mérthez képest még kifejezettebb volt (**29A ábra**). A miR-33b kanonikus miRNA esetében viszont a vad típusú MEF-ben mért igen jelentős génrepresszálo hatás (~90%) szinte a „nem-felismerő” kontroll szintjére csökkent a DGCR8 deficiens sejtekben. A kanonikus miRNA útvonalon képződő miRNA-szintjében valóban ezt várjuk, mivel náluk a processzálozás első lépése igényli a Drosha/DGCR8 komplex működését (**29B ábra**).



29. ábra. A humán mir-877 és mir-33b szekvenciák géncsökkentő hatása vad típusú, illetve DGCR8 deficiens MEF sejtekben.

A kísérleti/ábrázolási részleteket lásd a 16. ábra aláírásában; * $p < 0.05$.

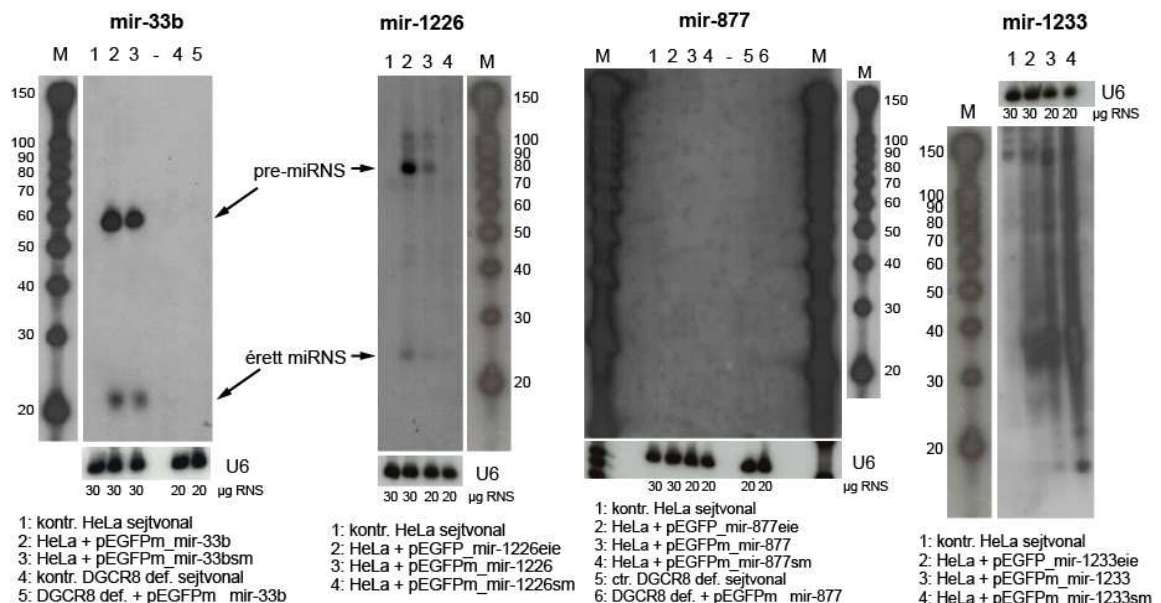
Az eddigi eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy létezik olyan prediktált humán mirtron szekvencia, ami ki tud vágódni a határoló exonjai közül, képes géncsökkentésre alkalmas érett miRNS keletkezni belőle, és az érési folyamat splicing függő, de a Drosha/DGCR8 komplex működésétől független. Ez azt jelenti, hogy a mirtron miRNS biogenezis útvonal létezik emlősökben/emberben. Utolsó lépésként – végső bizonyítékként a humán mirtronok létezésére – mirtronokból származó érett kis RNS-ek direkt detektálását tűztük ki célul.

5.4. Humán mirtron eredetű érett mikroRNS-ek direkt módon történő kimutatása

5.4.1. Northern blot technika

Mivel tradicionálisan talán a Northern blot technika az egyik leginkább elfogadott (kis) RNS detektálási mód, ezért a kiválasztott humán mirtronokból származó érett kis RNS-ek kimutatására először ezt a technikát kívántuk alkalmazni. Tekintettel arra, hogy a kis RNS elválasztás/Northern blot technika nem volt használatos a laboratóriumunkban, így a technika megfelelő alkalmazására a mir-33b kanonikus miRNS kimutatása szolgált kontrollként. A különféle konstrukciók transziens transzfekcióját követően totál RNS-t izoláltunk, majd a mintákból denaturáló gélelektroforézissel történő elválasztás után, radioaktívan jelölt DNS próbával próbáltuk meg a kimutatni az érett miRNS-eket. Mivel a detektálás ilyen módon sikertelennek bizonyult, így megpróbáltuk a sokkal érzékenyebb LNA (*locked nucleic acid*) próbákat alkalmazni a hibridizáláshoz [241; 245]. Ezzel a próbával a mir-33b pre-miRNS

formáját és az érett miRNS-t is sikerült kimutatni mind a vad típusú, mind a splicing mutáns konstrukciók expresszálasát követően. A DGCR8 deficiens sejtekben történő mir-33b expressziót követően nem volt kimutatható mir-33b érés, ami megfelel az elvárásoknak, mivel ez egy kanonikus miRNS (**30. ábra**). A mir-33b-n kívül csak a mir-1226 pre-miRNS formáját és az érett miR-1226-ot tudtuk egyértelműen kimutatni ezzel a technikával. A mir-1226 splicing mutáns konstrukciók transzfektálása esetén – a vártak megfelelően – nem volt sem pre-miRNS, sem érett miRNS detektálható. DGCR8 deficiens sejtekben történő vizsgálatokat sajnos technikai okokból nem tudtuk folytatni (a kapott sejtek véges számú osztódásra voltak képesek és korlátozott mennyiséget kaptunk). A mir-877 esetében nem tudtuk detektálni sem a pre-miRNS, sem az érett kis RNS formát a különféle konstrukciók HeLa, ill. DGCR8 deficiens sejtekben történő expresszióját követően. A mir-1233 esetében pedig nem kaptunk egyértelmű eredményt. Egyrészt – a „szigorú” mosások ellenére – nagymértékű aspecifikus háttérrel kaptunk, másrészt a diszkrétnek tűnő csíkok nem várt mérettartományokra estek. 150 nt környékén az alap sejtvonalban is látható egy aspecifikus csík, illetve a mir-1233 bármilyen konstrukcióból való expresszálasa esetén ~30-40 nukleotidos mérettartományban látható a háttérből kitűnő, erősebb jel. Ami még említésre méltó, hogy a GFPm_1233 konstrukció esetében 20 nukleotid környéki mérettartományban látszik két diszkrét csík (a halványabb ~21-22nt, az erősebb ~17-18nt), ami még kifejezettebb a GFPm_1233sm konstrukció expressziójakor.

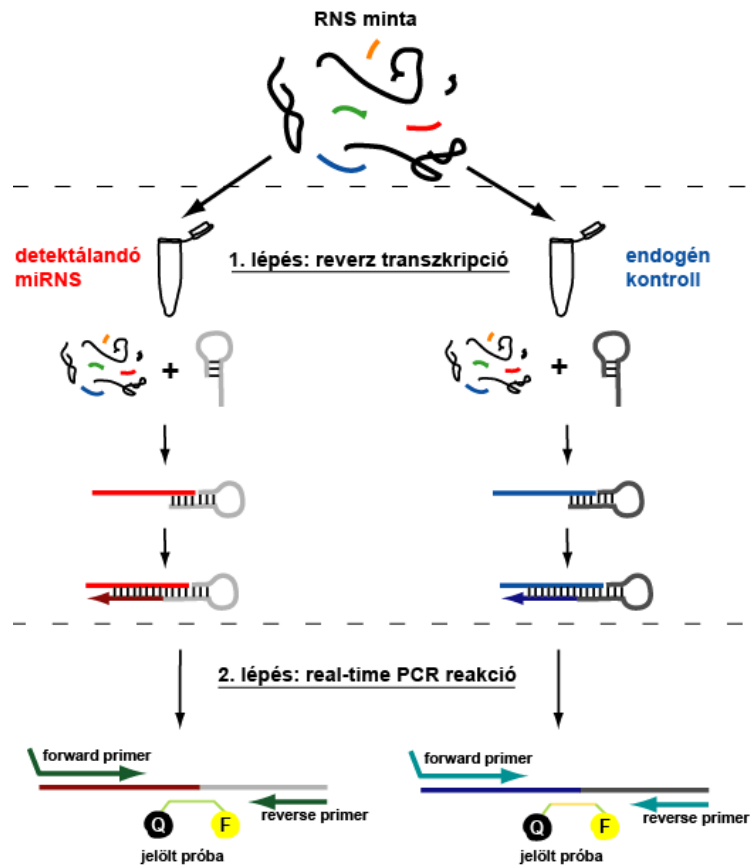


30. ábra. mikroRNS-ek kimutatása Northern blot technikával.

Mivel a Northern blot technikával csak a miR-1226 volt kimutatható, ezért egy másik, elméletileg érzékenyebb módszerhez, a kvantitatív RT-PCR-hez (qRT-PCR) folyamodtunk az általunk vizsgált mirtronokból származó érett miRNS-ek kimutatására.

5.4.2. Kvantitatív stem-loop RT-PCR optimalizáció

Tekintettel arra, hogy a miRNS-ek real-time PCR-rel történő kimutatása jelentősen eltér a „hagyományos” mRNA kimutatás metodikájától (31. ábra), először néhány paramétert optimalizáltunk a megbízható és reprodukálható eredmények érdekében.



31. ábra. Érett miRNS kvantitatív stem-loop RT-PCR-el történő detektálásának sematikus ábrázolása.

'F': fluorofór (donor => fluoreszcens jel); 'Q': quencher (akceptor => kioltó).

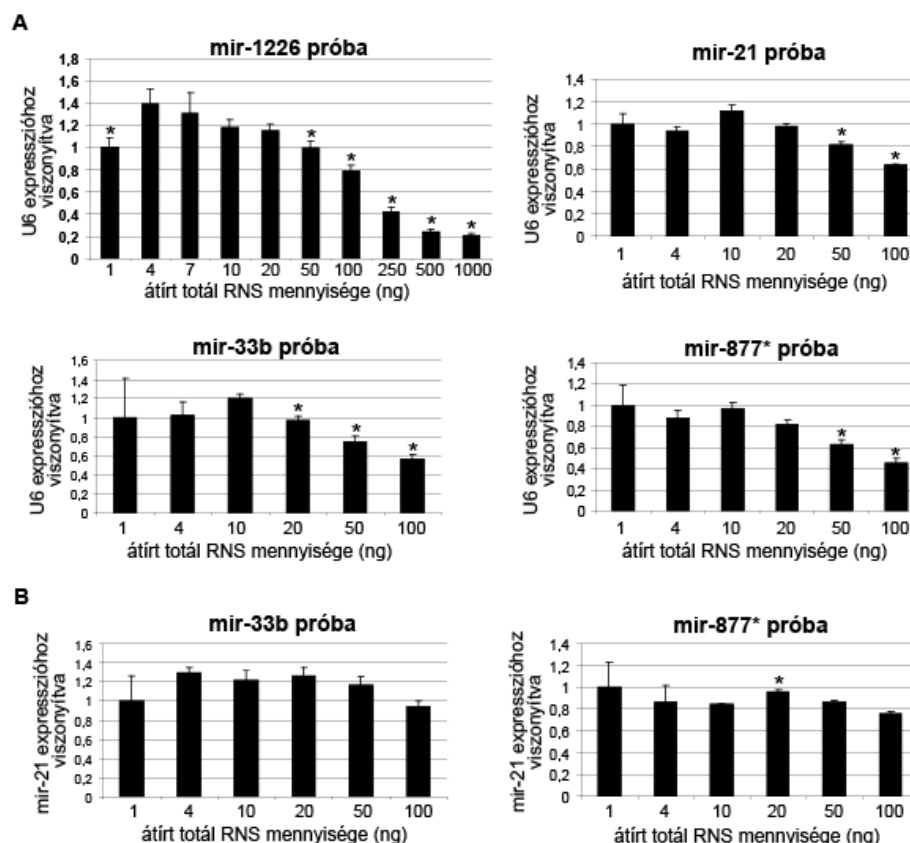
(Schamberger, kézirat benyújtva, ábrája alapján.)

5.4.2.1. A reverz transzkripciót érintő elővizsgálatok

A reverz transzkripcióval kapcsolatban két fő kérdésünk merült fel. Az egyik, hogy mennyi legyen az átírásra kerülő totál RNS mennyisége (a gyártói protokoll az 1-10ng-os tartományt adta meg), a másik, hogy lehet-e egy reakcióban átírni a megfelelő, specifikus hajtú szerkezetű primerekkel az endogén kontrollt és a mérendő cél miRNS-t. A gyártói protokoll szerint külön kell átírni őket, de a mérések pontossága érdekében szeretnénk volna egy templátbemérésből, együtt átírni őket cDNS-sé.

Az átírandó totál RNS mennyiségének meghatározása

A reverz transzkripció számára templátként szolgáló totál RNS mennyiségét különböző miRNS próbákat vizsgálva, illetve különböző endogén kontrollokra vonatkoztatva próbáltuk optimalizálni. U6 (kis sejtmagi RNS) endogén kontrollként való alkalmazása esetén a cDNS átírásra általánosan a 10 ng totál RNS mennyiség tűnt a legoptimálisabbnak (**32A ábra**). Az 1-20 ng tartományban a mért miRNS mennyisége általában hasonlóknak tekinthető, de a bemért totál RNS mennyiség 20 ng fölé történő növelése (vagy 1ng alá csökkentése) már torzíthatja az eredményeket. Az előbbi alul-, az utóbbi pedig felülbecsli az érett miRNS mennyiségét (nem mutatott adat). Ennek hátterében az endogén kontroll és a target miRNS eltérő amplifikációs hatékonysága állhat, ami egy szűkebb tartományban még arányosan változik, és alkalmas a „relatív mennyiségi meghatározás” (*relative quantification*) módszer alkalmazására, de az alatta és fölötte levő tartományokban már nem. Ezt a feltételezést alátámasztani látszik, hogy ha más endogén kontrollt, pl. a mir-21-et alkalmaztuk, akkor ez a hatás nem volt olyan markáns (**32B ábra**).

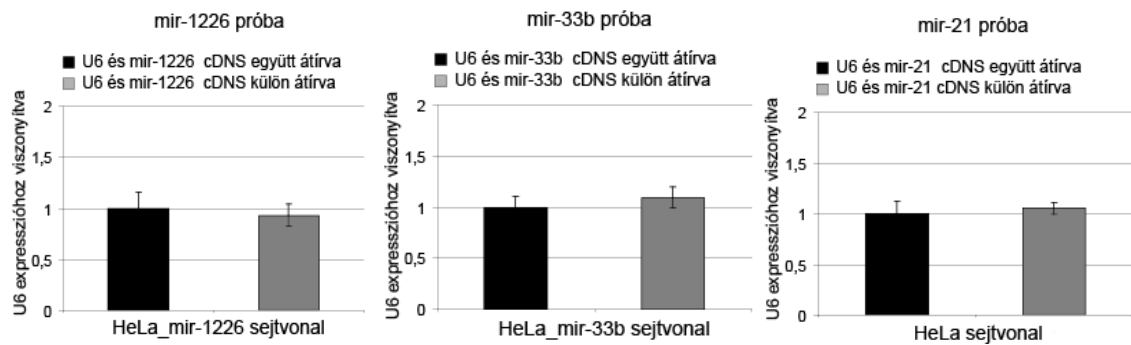


32. ábra. Érett miRNS detektálása különböző mennyiségű átírt totál RNS mintából.

A vizsgálatok során endogén kontrollnak az U6 snRNS-t (A), vagy az endogén miR-21 miRNS-t (B) használtuk. A mérésekhez mindig olyan miRNS-t stabilan overexpresszáló sejtvonalból származott a minta, amire az adott próba specifikus. A hibasávok a standard hibát (SEM) jelzik; a statisztikai próba a 10 ng-os mintához képest lett számolva; * $p < 0.05$.

Az endogén kontroll és a cél miRNS egy reakcióelegyben írható át cDNS-sé

Következő lépésként megvizsgáltuk, hogy az endogén kontroll és a mérni kívánt target átírható-e egy reverz transzkripció elegyben, nem zavarja-e az átírást pl. a két különböző, specifikus hajtú struktúrájú primer. Az U6 endogént kontroll mellett átírt három különböző targetet vizsgálva arra jutottunk, hogy nincs különbség a cél miRNS-ek detektálásában, akár külön, akár egy reakcióban írjuk át őket az endogén kontrollal (33. ábra).



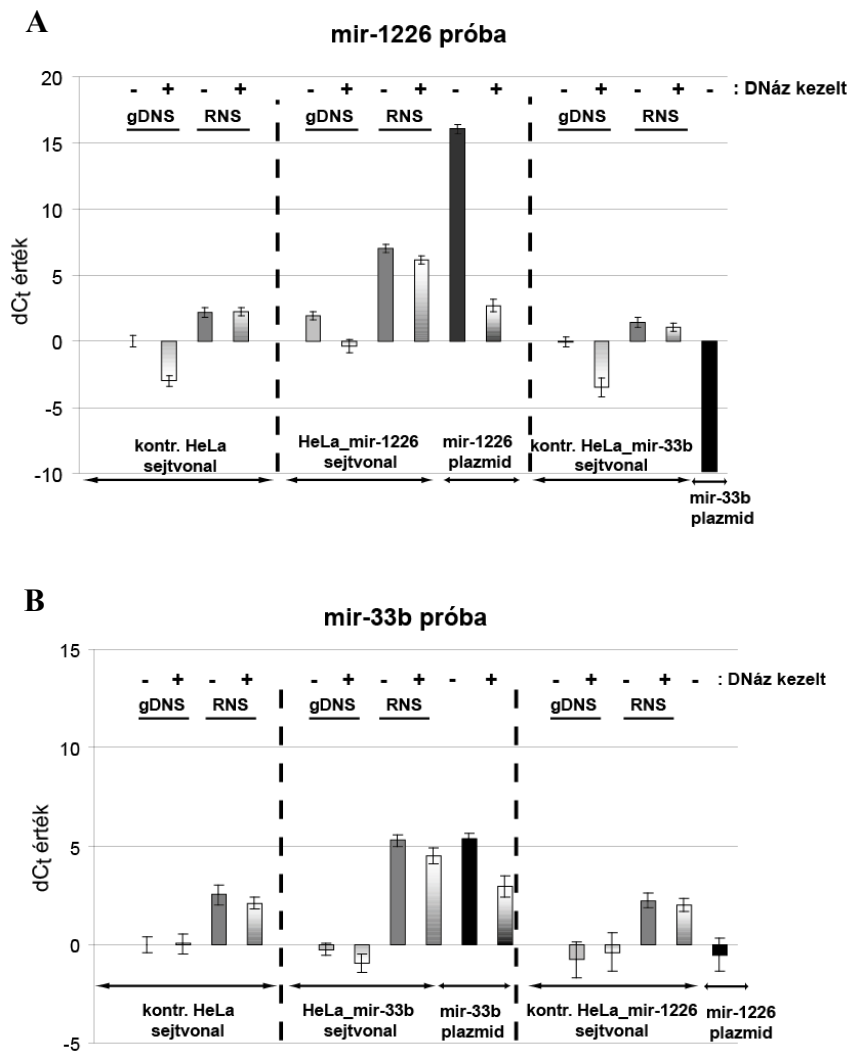
33. ábra. A cél miRNS és az endogén kontroll átírható cDNS-sé közös RT reakcióban.

A hibasávok a standard deviációt mutatják.

A kontroll és target egy reakcióban történő átírása azért is célszerű, mivel tapasztalataink alapján az eltérő típusú/minőségű PCR csövek befolyásolhatják a reverz transzkripció hatékonyságát. A továbbiakban a qRT-PCR méréseinkben mindig az U6-ot alkalmaztuk endogén kontrollként, a reverz transzkripciót 10 ng totál RNS templátból végeztük, és együtt írtuk át cDNS-sé a kontrollt a cél miRNS-sel.

5.4.2.2. A DNS szennyezés hatásának vizsgálata az érett mikroRNS kimutatására

Elővizsgálataink során felmerült annak a lehetősége, hogy a DNS szennyeződés befolyásolhatja a kvantitatív stem-loop RT-PCR méréseket: tranziens transzfekcióból származó RNS mintákból a splicing mutáns mir-1226 konstrukció esetében is magas érett miRNS szinteket mértünk. Ennek a problémának a vizsgálatára összeállítottunk egy kísérletsorozatot, amelyben azt határoztuk meg, hogy egy adott érett miRNS-t detektáló próbával milyen Ct értékeket kapunk genomiális DNS (gDNS), RNS, illetve plazmid DNS mintákból. Az egyes mintákat DNáz kezelés nélkül, ill. DNáz kezelés után is megvizsgáltuk. A genomiális DNS-ek és RNS-ek a korábban alapított mir-1226 és mir-33b overexpresszáló sejtvonalaikból, ill. normál HeLa sejtvonalaikból származtak. Az adott próbát teszteltük egyrészt a neki megfelelő miRNS-t (vagy pre-miRNS-t kódoló szekvenciát) tartalmazó mintákra, másrészt „keresztbe teszteltük” egy másik miRNS-t, vagy annak pre-miRNS szekvenciáját tartalmazó mintában a specifitás vizsgálatának céljából (34. ábra).



34. ábra. Érett miRNS detektálása RNS és DNS templátokból.

(A) a mir-1226 próba specifitásának vizsgálata (B) a mir-33b próba specifitásának vizsgálata. A hibasávok a standard deviációt mutatják.

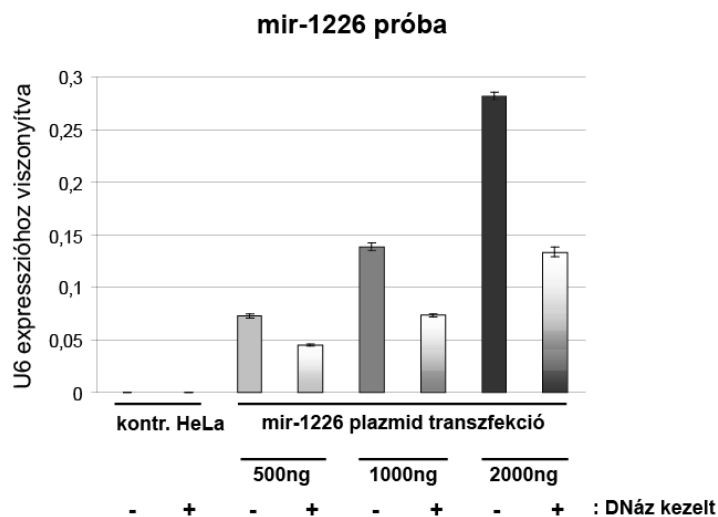
Az adatokat összefoglalva általánosságban elmondhatjuk, hogy a genomiális DNS-ekből mért dCt értékek alatta vannak az RNS-ekből mérteknek. Kivételt képez a HeLa_mir-1226 sejtvonala genomi DNS-e (nem DNázolt minta), ahol az RNS háttérrel kb. azonos Ct értékeket kaptunk.

Az is látható, hogy egy adott érett miRNS-t tartalmazó RNS mintából a neki megfelelő próbával mindig nagyobb jelet kaptunk a kontroll RNS-ekhez viszonyítva. Ez megfelel az elvárásoknak, hiszen itt valóban várjuk az érett miRNS detektálását.

A legmeglepőbb eredmények a plazmid DNS alapú mérésekből származtak: mind a két próba esetében jelentős fals pozitív jeleket kaptunk, bár ezek mértéke eltérő volt. A mir-33b esetében a mir-33b expresszálo sejtvonalból származó, „releváns” RNS-ből mért szinttel kb. azonos értéket kaptunk, míg a mir-1226 esetén jóval a releváns RNS-t meghaladó mennyiségben detektáltuk az érett miRNS-t. A nem releváns RNS háttérhez viszonyítva 14 Ct különbséget kaptunk (ez ~16384X-es látszólagos többletet jelent), míg a releváns RNS mintához viszonyítva (ahol valóban jelen van az érett miR-1226) 9 Ct különbséget kaptunk (ez ~512X több látszólagos miRNS-es mennyiséget jelent).

A plazmidok DNáz kezelése minden esetben a nem releváns RNS-ből kapott jel szintjére csökkentette a detektálást, illetve megfigyelhető, hogy a plazmidok adta fals pozitív jel szekvencia specifikus, csak a próba által detektálendő érett miRNS-t kódoló plazmid templát esetén jelentkezik. Ezek a kísérletek azt mutatják, hogy a DNS képes szekvencia specifikus módon templátul szolgálni a stem-loop kvantitatív RT-PCR számára, annak ellenére, hogy nyilvánvalóan nem található benne érett miRNS.

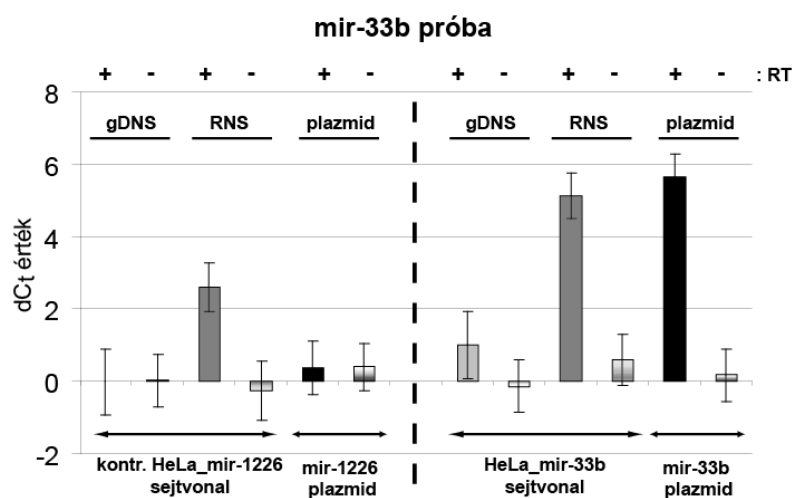
Azt, hogy a fenti jelenség valójában zavarhatja-e a méréseket, tranziens transzfekciót követően izolált totál RNS-ek DNázzal kezelt és nem kezelt mintáiból történő mérésekkel próbáltuk megbecsülni (35. ábra). Az eredmények azt mutatták, hogy a tranziens transzfekciót követő RNS izolálás során valóban detektálható mennyiségű plazmid DNS marad a totál RNS mintákban.



35. ábra. A tranziens transzfekció után készített totál RNS izolátumban a plazmid DNS fals pozitív hatása kimutatható a miRNS-ek detektálásakor.

A hibasávok a standard deviációt mutatják.

Annak eldöntésére, hogy a plazmid DNS-ről történő fals miRNS detektálás már a reverz transzkripció során realizálódik, vagy csak a real-time PCR reakció során valósul meg, reverz transzkripción átesett és nem átírt (no RT) mintákból végeztünk méréseket. Mint azt a **36. ábra** mutatja, a fals detektálás már a reverz transzkripció szintjén realizálódik. Ha a mir-33b előformáját kódoló plazmidot templátként használjuk cDNS átíráshoz, akkor – a **34B ábrához** hasonlóan – a releváns RNS-ből mért szintű miR-33b detektálást kapunk a mir-33b specifikus próbával.



36. ábra. Real-time PCR mérések reverz transzkripció (RT) nélküli ill. reverz transzkripción átesett mintákból.

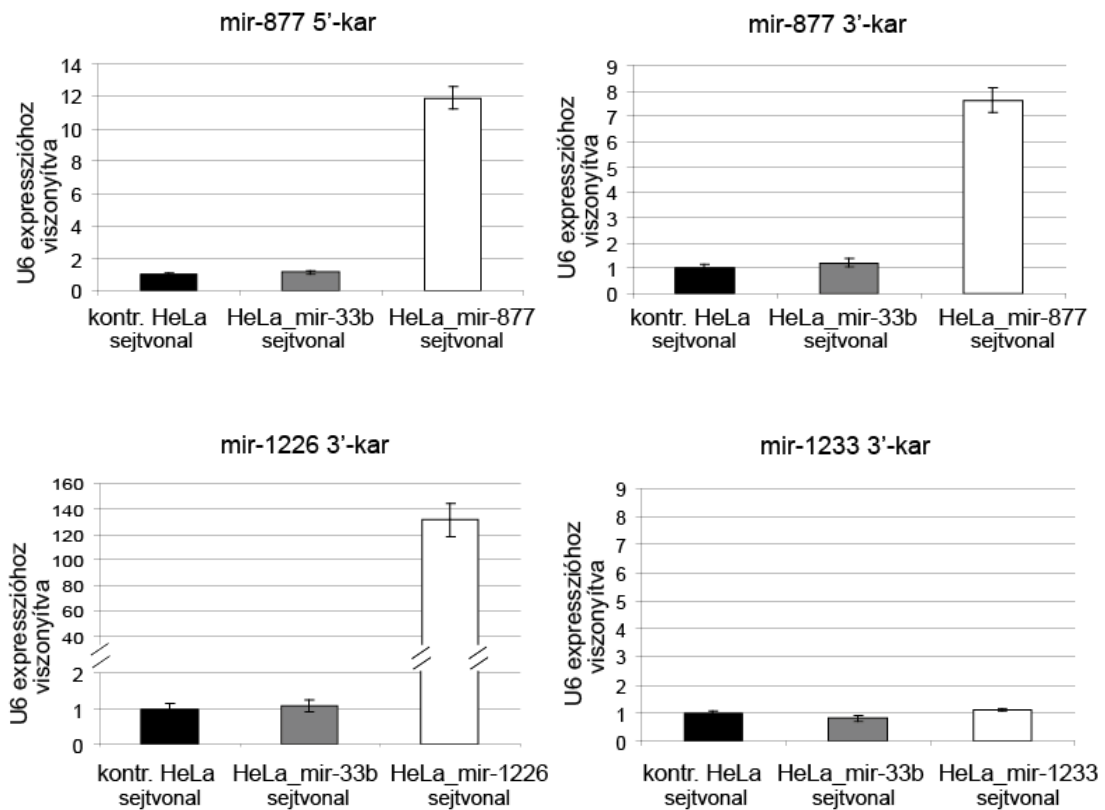
A hibasávok a standard deviációt mutatják.

Az eredményeinkre való tekintettel a kvantitatív RT-PCR-el történő miRNS detektálási protokollunkba beépítettük a totál RNS minták DNáz-zal történő kezelését a reverz transzkripció lépés előtt.

5.4.3. Érett mikroRNS-ek kimutatása kvantitatív RT-PCR-el

A fenti eredményeink következtében a mirtron eredetű érett miRNS-ek jelenlétét nem tranziens transzfekcióból származó mintákból mértük, hanem a korábban létrehozott sejtvonalakból izoláltunk totál RNS-t.

Az általunk kiválasztott három prediktált mirtront stabilan expresszáló sejtvonalat vizsgálva várakozásainknak megfelelően azt kaptuk, hogy a mir-1226 3'-karjából, illetve a mir-877 mindkét karjából származó érett miRNS kimutatható. A korábbi eredményekkel összhangban, a mir-1233 esetében a 3'-karra specifikus próbával viszont nem volt érett miRNS kimutatható (37. ábra).



37. ábra. Mirtron eredetű érett miRNS-ek detektálása kvantitatív RT-PCR-el.

A hibásávok a standard deviációt mutatják.

Az, hogy ezzel a technikával a mir-1226 esetében egy nagyságrenddel több érett miRNS-t mértünk a mir-877-ből származó érett miRNS-ek mennyiségéhez képest, megmagyarázhatja azt, hogy miért volt kimutatható a pre-mir-1226 és miR-1226 a Northern blot technikával, míg a mir-877-nek semmilyen formáját sem sikerült a hibridizációs technikával detektálni.

6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

6.1. A humán mirtron biogenezis vizsgálata

Munkám során három prediktált humán mirtron szekvenciát választottunk ki (mir-877, mir-1226, mir-1233), majd elsőként eredeti genomi exonikus környezetükben vizsgáltuk őket. Mindhárom szekvencia képes volt kivágódni a határoló exonjai közül, bár a splicing hatékonysága mindegyik esetben alacsony volt. Funkcionális vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy csak a mir-877 és mir-1226 szekvenciákból képződött géncsendesítésre képes kis RNS, a mir-1233-ból nem. Érdeemes megjegyezni, hogy az előbbi két szekvenciában az érett miRNS-ek potenciális származási helyei, a pre-miRNS karok erősen konzerváltak (a mir-1226-ban esetében a *loop* régió is), míg ez a mir-1233-ról nem mondható el.

Következő lépésként ugyanezen szekvenciákat heterológ környezetbe helyezve kívántuk megvizsgálni, hogy megállapítsuk, a genomi határoló exonok tartalmazznak-e olyan információt, amivel befolyásolják a mirtron eredetű miRNS-ek érését. Ehhez az EGFP fehérje kódoló régióját két exonra osztottuk, és közülük intronként fejeztük ki a prediktált mirtron szekvenciákat. A mir-877 és mir-1226 esetében hasonló eredményeket kaptunk mind a splicing-ot, mind a funkciót tekintve a genomi környezetekből mértekhez. Ezzel szemben a mir-1233 splicing-ja a heterológ környezetből sokkal jobb hatékonysággal működött, ami összhangban volt a splicing predikciókkal (lásd **melléklet**). Funkcionális esszében vizsgálva ezt a szekvenciát szintén változást tapasztaltunk az eredeti exoni környezethez képest, de meglepő módon nem repressziót, hanem a luciferáz aktivitásának növekedését tapasztaltuk. Ezt nem szüntette meg az 5' splice hely mutációja sem, sőt a hatás még kifejezettebbé vált. Mindezek mellett Northern blot és qRT-PCR technikával nem volt egyértelműen azonosítható a klasszikus miRNS-ek mérettartományban a mir-1233-ból származó érett kis RNS. Northern blottal heterogén termékek akkumulációja volt megfigyelhető, amik további, mélyebbre ható vizsgálatok nélkül (klónozás/szekvenálás) nem értelmezhetőek egyértelműen. Mindezek alapján nyilvánvalóvá vált, hogy a humán mir-1233 semmiképpen sem egy konvencionális mirtron.

A mir-877 és mir-1226 szekvenciák azonban – a *Drosophila* mirtronokhoz hasonlóan – a határoló exonoktól függetlenül képesek voltak kivágódni és funkcionális érett miRNS-ek keletkeztek belőlük. A későbbi kísérletek során is a mirtron biogenezisre

jellemző módon viselkedtek: splicing mutáns verzióik nem voltak képesek érett, funkcionális miRNS-ek létrehozására, ami a mirtron biogenezis egyik alapvető feltétele.

A mirtron útvonalon történő érés másik kritériuma, hogy a miRNS keletkezése független a Drosha/DGCR8 komplex működésétől. Ennek vizsgálatára első megközelítésünk, a Drosha fehérje siRNS által történő kiütése nem járt sikerrel. A kanonikus miRNS érési útvonalon keletkező pozitív kontrolljaink (miR-33b, miR-21) processzálni tudtak, így nem volt értelme a prediktált mirtronokat ebben a rendszerben vizsgálni. A sikertelenségnek az lehetett az oka, hogy bár a Drosha mRNA szintjében jelentős csökkenést értünk el (~70-80%), a maradék mRNA-ról valószínűleg elég fehérje szintetizálódott ahhoz, hogy a megfelelő mennyiségű aktív Drosha/DGCR8 komplex processzálja a kanonikus útvonalon érő miRNS-eket. A prediktált emlős mirtronokat vizsgáló, a miénkkal egyidejű két tanulmány közül az egyik szintén leírta ezt a problémát, ők ezért transzdomináns negatív Drosha overexpressziót alkalmaztak a kísérleteikben [246]. Mi a DGCR8/Drosha aktivitástól való függetlenséget DGCR8 deficiens egér embrionális fibroblaszt sejtekben vizsgáltuk. Ennek során a mir-877 példáján sikerült bebizonyítanunk, hogy létezik emlősökben is a mirtron biogenezis útvonal: a mir-877-ből képes volt ezekben a sejtekben is funkcionális érett miRNS keletkezni. A vad típusú sejtekhez képest a DGCR8 mutáns sejtekben a mir-33b kontroll esetén szinte teljesen megszűnt a represszió, míg a mir-877 esetében még erősödött is a csendesítő hatás. Ez azzal magyarázható, hogy a mutáns sejtvonalon sok endogén, kanonikus miRNS nem tud megérni, így mintegy „felszabadul” az RNS interferencia apparátusa.

A mirtron biogenezis igazolásának utolsó lépéseként mirtron eredetű érett miRNS-ek Northern blotlalt történő direkt kimutatását tűztük ki célul. Sajnos ez csak a mir-1226 esetében sikerült, így egy másik direkt módszerhez, az elméletileg érzékenyebb kvantitatív stem-loop RT-PCR-hez folyamodtunk. Ezzel a módszerrel (optimalizációs vizsgálatok után) sikerült direkt módon detektálni az összes, funkcionális esszében hatást mutató mirtron eredetű kis RNS-t.

Az általunk vizsgált *Drosophila* mir-1003 mirtron a jó splicing predikciók ellenére sem tudott kivágódni emlős sejtekben az eredeti genomi, illetve a heterogén exonikus környezetekből, s luciferáz esszében sem mutatott aktivitást. Ennek oka egyelőre ismeretlen, esetleg valamilyen fajspecifikus faktor/-ok hiánya lehet a háttérben.

6.2. Az emlős mirtronok jellemzői

Az általunk vizsgált három prediktált humán mirtron szekvenciából csak kettő bizonyult valódi mirtronnak, ami alátámasztja a mélyszekvenálási adatok és bioinformatikai predikciók kísérletes validálásának fontosságát. Azt is érdemes megjegyezni, hogy az eredményeink alapján a mirtron splicing hatékonysága, az érett miRNS abundanciája és a géncsendesítő képesség között nincsen egyenes arányú összefüggés: a mir-877-nek egy kicsit hatékonyabb a splicingja, a miR-1226 mégis sokkal nagyobb mennyiségben található a sejtekben, ugyanakkor luciferáz esszében a miR-877-5p mutatja a legjelentősebb repressziót.

A mir-1226 szekvencia eredetileg 3'-karos mirtronnak lett prediktálva, s ez valóban be is igazolódott vizsgálataink során. Ezzel szemben a mir-877 5'-karos mirtronnak lett leírva, s a későbbi mélyszekvenálási adatok is a miR-877-5p dominanciáját mutatták: három nagyságrenddel nagyobb mennyiségben volt kimutatható a miR-877-3p-hez képest. Kísérleteink során azonban azt láttuk, hogy – az általunk vizsgált mindhárom sejtvonalban – a mir-877 mindkét karjából funkcionális miRNS érik, s a miR-877-3p jelentős, a miR-877-5p-vel összemérhető géncsendesítő hatást mutat. Arra, hogy egy prekurzor miRNS mindkét karjából érhet funkcionális miRNS, van példa az irodalomban. Ilyen esetekben azonban valószínűleg nem az történik, hogy egy adott pre-miRNS-ből mindkét szál hasznosul, hanem az, hogy a duplexből hol az egyik, hol a másik szál épül be a RISC komplexbe [10]. A mir-877 esetében azt a jelenséget, hogy bizonyos valószínűséggel a 3'-kar adja az érett miRNS-t az is magyarázhatja, hogy az 5'-kARBól származó érett miRNS 5' végének kötött a szekvenciája: az az intron splice donor helyével azonos, GT-vel kezdődik. Bár az emlős miRNS-ekre nem jellemző az érett miRNS 5' pozíciójában levő nukleotid szigorú kötöttsége (*5' bias*), a G általában nem tartozik a preferált nukleotidok közé [78; 79; 87; 227]. A mirtronok ezen szekvenciális megkötöttsége is magyarázhatja, hogy az *5' bias*-ra érzékenyebb *Drosophila*-ban miért a 3'-karos mirtronok a jellemzőek. Érdemes talán itt is megjegyezni, hogy a miRNS duplexekből történő szál kiválasztódásról emlősökben még mindig nagyon keveset tudunk. Egy, a témában frissen megjelent publikáció például az AGO3 specifikus, aktív szerepét mutatja be a let-7 esetében ebben a folyamatban [247].

A fentiekén kívül említést érdemel még, hogy az emlős mirtronok pre-miRNS struktúrája általában nem mutatja a pre-miRNS-ekre jellemző 3' 2 nt-os túlnyúló

szerkezetet, ami az Exportin-5 általi transzport feltétele. Ezt a kérdést feloldhatják az arra vonatkozó adatok, hogy bizonyos, a „kanonikus” végződéstől eltérő hajtúket is képes kötni az Exportin-5 [248], de mint azt egy friss publikáció sugallja, akár más faktorok is részt vehetnek a mirtron eredetű pre-miRNS-ek sejtplazmába történő transzportjában [249].

6.3. Az emlős mirtron szekvenciák lehetséges szabályozó szerepe

Mivel a humán mirtronok kísérletes vizsgálatát érintő első publikációk csak 2012-ben jelentek meg, így lehetséges targetjeikről egyelőre nem tudunk túl sokat. Az általunk vizsgált mirtronokat stabilan termelő sejtvonalakat létrehozva úgy tűnt, hogy az overexpresszió nem érintett semmilyen alapvető, vitális funkciót, normál fenntartási körülmények között nem találtunk különbséget a parentális sejtvonalhoz képest. Az irodalmi adatokat átvizsgálva azt találtuk, hogy az általunk vizsgált mir-1226-nak egy korábbi tanulmány (kanonikus miRNS-ként) tumor szuppresszor funkciót tulajdonított [250]. A mir-1233-nak pedig, annak ellenére, hogy a legújabb predikciók szerint a „bizonyított”-ból a „jelölt” mirtron kategóriába sorolták át [251], korábban már leírták szerepét leukémiában [252], ill. veserák biomarkerként is említésre került [253].

Mélyszekvenálással kapott adatok alapján úgy tűnik, hogy bizonyos mirtron eredetű miRNS-ek a többi szövethez képest dúsulást mutatnak az agyban [233]. Ilyen például a mir-877 is, melynek a target predikciójával próbálkozott egy friss tanulmány is [249]. Luciferáz esszével sikerült több potenciális targetet azonosítaniuk, de dopaminerg neuronokban overexpresszálva a mir-877-et csak az egyik potenciális cél RNS-nek csökkent a mennyisége. Fehérje szinten azonban ez utóbbi target esetében sem tudtak kimutatni semmilyen csökkenést. A továbbiakban a prediktált emlős mirtron szekvenciák közül a mir-1236 és mir-702 miRNS-ekhez lett még konkrét funkció rendelve [254; 255].

A mirtronok jelentőségét mutatja, hogy a velük foglalkozó publikációk száma az elmúlt két évben megduplázódott. A prediktált emlős mirtron szekvenciák behatóbb tanulmányozása során került leírásra például egy a splicingtól független, de Drosha függő új miRNS biogenezis, a „*simtron*” útvonal is [246; 256]. Egy másik publikáció pedig a már meglévő egér és humán kis RNS adatok újraanalizálásával, célzott szűrők alkalmazásával csak a humán genomon több száz új konvencionális és *tailed* mirtront azonosított [251]. Ezek mennyisége így mára már eléri az annotált humán miRNS-ek

mennyiségének kb. 25-30%-át (**2. táblázat**). A konvencionális mirtronok mellett nagy számban azonosítottak *5'-tailed* mirtronokat és egy másik tanulmánnyal együtt [257] leírták az első néhány emlős *3'-tailed* mirtront szekvenciát is [251].

	konvencionális	5'-tailed	3'-tailed
Humán lókuszok			
ismert	10	42	2
átsorolt	0	14	5
új, annotált	9	152	6
az összes „bizonyított” mirtron	19	208	13
mirtron jelöltek	19	212	10
Egér lókuszok			
ismert	9	12	0
átsorolt	0	10	1
új, annotált	13	189	3
az összes „bizonyított” mirtron	22	211	4
mirtron jelöltek	18	209	6

2. táblázat. Emlős mirtron lókuszok száma.

A miRBase-ben található ismert, átsorolt, ill. új mirtronok katalógusa.

(Ladewig, Genome Res, 2012, ábrája alapján.)

A mirtronok speciális tulajdonságaiknak köszönhetően ígéretes eszközei lehetnek a génterápiás alkalmazásoknak is [256; 258; 259]. Jelenlegi munkám során részben én is ennek az új felhasználási területnek a kidolgozásán munkálkodom. Izgalmas kérdés még a mirtron eredetű miRNS-ek AGO fehérjékkel történő asszociációjának, ill. a különböző *tailed* mirtronok emlősökben történő processzálódásának vizsgálata. Nem utolsósorban egy érdekes, megfontolandó új gondolat a mirtronok szabályozó funkciójával kapcsolatban, hogy a *trans* szabályozás mellett lehet esetleg *cis* szabályozó funkciójuk is: a splicing szabályozásán keresztül hatással lehetnek az őket tartalmazó gazda mRNS-re [251]. Ezen kérdések behatóbb vizsgálata további kísérletes munkáknak szolgáltathat alapot.

6.4. Kvantitatív stem-loop RT-PCR optimalizálása érett miRNS-ek kimutatására

Munkám során találkoztam a kis RNS-ek kimutatására széles körben alkalmazott kvantitatív stem-loop RT-PCR technikával. Mivel a gyártó által biztosított protokoll nem mindenhol adott egyértelmű utalást, ill. az előkísérletek során nem tűnt teljes mértékben reprodukálhatónak és megbízhatónak az általam használt technika, így optimalizációs kísérleteket végeztünk. Először is többféle totál és kis RNS izolálási technikát is összehasonlítottunk (nem mutatott adat), ennek alapján a későbbi kísérletekhez a legjobbnak tűnő, Trizol[®] reagenssel történő totál RNS izolálást választottuk. Ezen kívül ellenőriztük, hogy a különböző, általunk mérni kívánt targetekre az amplifikációs hatékonyságok megfelelőek-e: tehát valóban alkalmazható a széles körben használt relatív mennyiségi összehasonlítás módszer (*relative quantification*) az adatok értékelésénél (nem mutatott adat). A továbbiakban megbecsültük különböző endogén kontroll-target párokat alkalmazva, hogy mi a reverz transzkripcióba bemérendő optimális totál RNS mennyisége. Kísérleteinkhez 10 ng totál RNS bemérést használtunk U6 endogén kontroll alkalmazása mellett. A mérések pontossága és a költséghatékonyság érdekében kimértük, hogy az endogén kontroll és a target egyszerre, egy reverz transzkripció elegendőben is átírható: tehát a két reakció (a kétféle stem-loop primer) nem zavarja egymást. Fontos azonban megjegyezni, hogy a stem-loop primerek hosszú távú együtt tárolása fals pozitív eredményekhez vezethet. A target és endogén kontroll egyszerre történő átírása cDNS-sé azért is hasznos, mert kiküszöböl például olyan problémákat, hogy a különböző típusú/minőségű PCR csövekben eltérő hatékonysággal íródik át a miRNS cDNS-sé.

Az optimalizációs kísérleteink legmeglepőbb eredménye az volt, hogy a DNS – szekvencia specifikus módon – templátként tud szolgálni a reverz transzkripció során. Ez azt jelenti, hogy egy adott miRNS prekursor formáját tartalmazó DNS az adott miRNS-re specifikus hajtú primer segítségével át tud íródni a reverz transzkripció folyamán, ami ezután a real-time PCR során detektálásra kerül. Kísérleteink azt mutatják, hogy a DNS szennyezés akkor zavarja leginkább a méréseket, amikor plazmidról kifejezve, tranziens transzekciót követően történik a miRNS-ek mérése. A fenti eredmények alapján összeállítottunk egy megbízható, „finomított” protokollt kis RNS-ek kvantitatív RT-PCR-rel történő mérésére, amelynek egyik fontos eleme az RNS DNáz-zal történő kezelése a reverz transzkripciót megelőzően.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A mikroRNS-ek (miRNS) kb. 20-24 nukleotid hosszúságú nem kódoló kis RNS-ek, melyek fontos szerepet töltenek be a génexpresszió, ezen keresztül pedig szinte az összes sejtben belüli folyamat szabályozásában. A legtöbb miRNS molekula az ún. kanonikus érési útvonalon keletkezik, de az utóbbi években számos alternatív miRNS biogenezis útvonal is felfedezésre került. Az egyik legjelentősebb közülük a mirtron útvonal, melyet eredetileg gerinctelenekben fedeztek fel. Az ezen az úton érő miRNS-ek kisméretű intronokban helyezkednek el, és gyakorlatilag az intron egésze megfeleltethető a kanonikus miRNS érés során keletkező ún. pre-miRNS előalaknak. Ez teszi lehetővé, hogy az érés kezdeti lépése eltérjen a kanonikus útvonalétól: az elsődleges transzkriptumból nem a Drosha/DGCR8 komplex vágja ki a pre-miRNS előalakot, hanem a sejt *splicing* apparátusa. Bioinformatikai predikciók és mélyszekvenálási adatok alapján valószínűsítették mirtronok létezését emlősökben is.

Munkám keretében azt szerettem volna megvizsgálni, hogy ez a speciális, mirtronikus miRNS keletkezési útvonal valóban létezik-e emberben. Ehhez három prediktált humán mirtront (mir-877, mir-1226, mir-1233) választottunk ki, majd eredeti genomi, ill. heterológ környezetben vizsgáltuk az elsődleges átiratból történő kivágódásukat, az érett miRNS expressziót és a géncsendesítő hatást.

Eredményeink azt mutatták, hogy vannak olyan prediktált humán mirtronok, amelyekből géncsendesítésre alkalmas kis RNS-ek keletkeznek, és az érés független a határoló exonok szekvenciájától. Kimutattuk továbbá, hogy az általunk vizsgált mindhárom sejtvonalon a mir-877 mindkét „karjából” egy időben funkcionális miRNS érik. A mirtron útvonalon történő processzációkat kétféleképpen bizonyítottuk: *splicing* mutáns konstrukciók segítségével vizsgáltuk az érés *splicing*-tól való függetlenségét, a Drosha/DGCR8 komplextől való függetlenséget pedig DGCR8 mutáns sejtvonalon teszteltük. Az érett, mirtron eredetű miRNS-ek kimutatására *Northern blot* és kvantitatív real-time PCR technikákat alkalmaztunk. Az utóbbi módszer megfelelő, reprodukálható alkalmazásához optimalizációs vizsgálatokat is végeztünk.

Összegzésként elmondhatjuk, hogy – bár nem minden jelölt bizonyult valódi mirtronnak – a mirtron útvonal létezik emberben. Érdeemes kiemelni továbbá, hogy a miRNS-ek mindkét „karját” fontos lenne megvizsgálni a miRNS-ek biológiai funkciójának tanulmányozásakor, ill. az érett miRNS-ek kvantitatív stem-loop real-time PCR-rel történő pontos méréséhez fontos az esszék körültekintő optimalizálása.

8. SUMMARY

MicroRNAs (miRNA) are small non-coding RNAs influencing most cellular processes due to their important role in gene expression regulation. Most of these 20-24 nucleotide long molecules are formed via a canonical pathway, but there are also emerging data on various alternative miRNA maturation routes. The most prominent of them is the mirtron pathway, which was first described in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. miRNAs of mirtron origin are localized in short introns where the whole intron is essentially equivalent to the so called pre-miRNA form of the canonical maturation process. This allows that the first step of the mirtron processing is different from the canonical one: the pre-miRNA is cleaved out from the primary transcript by the splicing machinery instead of the Drosha/DGCR8 complex.

Since bioinformatic predictions and small RNA data analyses have suggested the existence of mirtrons in mammals, we decided to examine several predicted human mirtron sequences (mir-877, mir-1226 and mir-1233) to prove the existence of mirtron biogenesis in human. We investigated their processing and gene silencing capacity from their endogenous or a heterologous coding context.

We demonstrated that functional human mirtrons can be produced and this is a coding context-independent process. Furthermore, we showed that mir-877 can liberate functional mature miRNAs from both of its 5'- and 3'-arms simultaneously in various cell types examined. We have proven the existence of the human mirtron biogenesis pathway in two different ways: we investigated the splicing dependency using splicing mutant forms of mirtrons while the independence of Drosha/DGCR8 complex was proven in a DGCR8 deficient cell line. For the detection of mature miRNAs we applied *Northern blot* analysis and quantitative real-time PCR. However, for reproducible measurements, we had to optimize the latter technique.

Taken together, we have proven the existence of the human mirtron biogenesis pathway. However, the experimental validation of predicted mirtron sequences is strongly recommended, since some of them seem to be processed via other miRNA maturation pathway. In addition, we suggest the functional testing of both arms of miRNAs while investigating biological function, as well as the thorough optimization of a particular assay when using stem-loop real-time PCR for mature miRNA detection.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Sarkadi Baláznak, hogy lehetővé tette az ELTE BDI Klasszikus és Molekuláris Genetika Doktori Programjában való részvételemet, és hogy az Intézetünket ért viszontagságok közepette is mindvégig biztosítani tudta munkámhoz a megfelelő háttérrel.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Orbán Tamásnak, aki bevezetett a molekuláris biológiai munkák rejtelseibe, és akihez nem csak szakmai kérdésekkel fordulhattam, a kezdetektől fogva mind szakmai, mind baráti tanácsaival támogatta munkámat.

Köszönet illeti Dr. Német Katalint a tőle kapott segítségért, plazmidokért és sejtvonalakért, amiket mindig készségesen bocsátott rendelkezésemre.

Dr. Robert Blelloch-ot szintén köszönet illeti a tőle kapott sejtvonalakért, ill. Dr. Vértessy Beátát és a csoportjában dolgozó Dr. Horváth Andrást is a *Drosophila* S2 sejtekért és a tenyésztésükben való segítségért.

Szeretném megköszönni Dr. Várallyay Évának és Dr. Havelda Zoltánnak a Northern blot-tal kapcsolatos segítségüket, a hasznos tanácsokat és anyagokat, amiket kaptam.

Szeretném továbbá megköszönni Dr. Várady Györgynek a sejtvonalak létrehozásában nyújtott segítségét, és hogy mindig készségesen megvitatta velem a felmerülő szakmai kérdéseket.

Köszönet illeti kedves kollégáimat, Türk Dórit, Nagy Zsuzsit, Sándor Sárít és Kolacsek Orsit a baráti légkörért, amit teremtettek, a sok szép közös pillanatért, vidámságért, s nemkülönben a sok biztatásért és támogatásért, amit Tőlük kaptam.

Ezúton szeretném megköszönni egész Családomnak is, hogy nagy türelemmel és szeretettel támogattak az elmúlt „időhiányos” évek folyamán.

Nem utolsó sorban nagyon köszönöm páromnak, Dr. Fátyol Károlynak, hogy mellettem volt nem csak a jó pillanatokban, szakmai tudásával segített és szeretetével biztatott a legnehezebb, küzdelmes időszakokban is.

Legvégül szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik esetleg nem kerültek név szerint említésre, mégis szakmailag vagy barátként támogattak – az intézetünkön belül vagy kívül – az elmúlt években.

A kutatás az alábbi támogatásokkal valósult meg: TÁMOP 4.2.4.A/1-11-1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program, az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával, ill. a KMR_12-1-2012-0112 pályázat.

10. PUBLIKÁCIÓS LISTA

10.1. Az értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények

Schamberger A and Orbán TI: 3' isomiR species and DNA contamination influence reliable quantification of microRNAs by stem-loop quantitative PCR (kézirat benyújtva)

Schamberger A and Orbán TI: Experimental validation of predicted mammalian microRNAs of mirtron origin. *Methods Mol Biol: Structural and Functional RNA Mapping* (könyvfejezet; elfogadva)

Schamberger A, Sarkadi B, Orban TI: Human mirtrons can express functional microRNAs simultaneously from both arms in a flanking exon-independent manner. *RNA Biology*. 2012, 9(9):1177-85.
IF : 4,93

Orbán TI, Apáti A, Németh A, Varga N, Krizsik V, Schamberger A, Szebényi K, Erdei Z, Várady G, Karászi E, Homolya L, Német K, Gócza E, Miskey C, Mátés L, Ivics Z, Izsvák Z, Sarkadi B: Applying a “double-feature” promoter to identify cardiomyocytes differentiated from human embryonic stem cells following transposon-based gene delivery. *Stem Cells*. 2009, 27(5):1077-87.
IF: 7,75

10.2. Az értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó tudományos közlemények

Kolacsek O, Krizsik V, Schamberger A, Erdei Z, Apáti Á, Várady G, Mátés L, Izsvák Z, Ivics Z, Sarkadi B, Orbán TI: Reliable transgene-independent method for determining Sleeping Beauty transposon copy numbers. *Mobile DNA*. 2011, 2(1):5.
IF (prediktált): 2,64

Sarkadi B, Orbán TI, Szakács G, Várady G, Schamberger A, Erdei Z, Szebényi K, Homolya L, Apáti A: Evaluation of ABCG2 expression in human embryonic stem cells: crossing the same river twice? *Stem Cells*. 2010, 28(1):174-6.
IF: 7,87

Apáti A, Orbán TI, Varga N, Németh A, Schamberger A, Krizsik V, Erdélyi-Belle B, Homolya L, Várady G, Padányi R, Karászi É, Kemna EWM, Német K, Sarkadi B: High level functional expression of the ABCG2 multidrug transporter in undifferentiated human embryonic stem cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 2008, 1778(12): 2700-9.
IF: 4,18

Szendrői A, Schamberger A, Bakonyi T, Hornyák A, Rusvai M: Molecular comparison of the fibre proteins of bovine adenovirus subtype A and subtype B. *Virus Res*. 2003, 94(1): 59-63.
IF: 1,72

11. IRODALOMJEGYZÉK

1. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
2. Simons, R.W., and Kleckner, N. (1983). Translational control of IS10 transposition. *Cell* 34, 683-691.
3. Ecker, J.R., and Davis, R.W. (1986). Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 5372-5376.
4. Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *The Plant cell* 2, 279-289.
5. Romano, N., and Macino, G. (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular microbiology* 6, 3343-3353.
6. Ratcliff, F., Harrison, B.D., and Baulcombe, D.C. (1997). A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* 276, 1558-1560.
7. Ketting, R.F. (2011). The many faces of RNAi. *Developmental cell* 20, 148-161.
8. Carthew, R.W., and Sontheimer, E.J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136, 642-655.
9. Naqvi, A.R., Islam, M.N., Choudhury, N.R., and Haq, Q.M. (2009). The fascinating world of RNA interference. *Int J Biol Sci* 5, 97-117.
10. Czech, B., and Hannon, G.J. (2011). Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nature reviews Genetics* 12, 19-31.
11. Aalto, A.P., and Pasquinelli, A.E. (2012). Small non-coding RNAs mount a silent revolution in gene expression. *Current opinion in cell biology* 24, 333-340.
12. Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.
13. Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855-862.
14. Krol, J., Loedige, I., and Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 11, 597-610.

15. Ghildiyal, M., and Zamore, P.D. (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet* 10, 94-108.
16. Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215-233.
17. Miller, B.H., and Wahlestedt, C. (2010). MicroRNA dysregulation in psychiatric disease. *Brain Res* 1338, 89-99.
18. Xu, B., Karayiorgou, M., and Gogos, J.A. (2010). MicroRNAs in psychiatric and neurodevelopmental disorders. *Brain Res* 1338, 78-88.
19. Edwards, J.K., Pasqualini, R., Arap, W., and Calin, G.A. (2010). MicroRNAs and ultraconserved genes as diagnostic markers and therapeutic targets in cancer and cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Transl Res* 3, 271-279.
20. Alevizos, I., and Illei, G.G. (2010). MicroRNAs as biomarkers in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 6, 391-398.
21. Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., *et al.* (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435, 834-838.
22. de Planell-Saguer, M., and Rodicio, M.C. (2011). Analytical aspects of microRNA in diagnostics: a review. *Anal Chim Acta* 699, 134-152.
23. Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., and Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome research* 14, 1902-1910.
24. Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.
25. Ul Hussain, M. (2012). Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action. *Cell Tissue Res* 349, 405-413.
26. Kim, V.N., and Nam, J.W. (2006). Genomics of microRNA. *Trends in genetics : TIG* 22, 165-173.
27. Siomi, H., and Siomi, M.C. (2010). Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Molecular cell* 38, 323-332.
28. Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal* 23, 4051-4060.
29. Cai, X., Hagedorn, C.H., and Cullen, B.R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna* 10, 1957-1966.

30. Denli, A.M., Tops, B.B., Plasterk, R.H., Ketting, R.F., and Hannon, G.J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* *432*, 231-235.
31. Gregory, R.I., Yan, K.P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* *432*, 235-240.
32. Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Kim, Y.K., Jin, H., and Kim, V.N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & development* *18*, 3016-3027.
33. Landthaler, M., Yalcin, A., and Tuschl, T. (2004). The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Current biology : CB* *14*, 2162-2167.
34. Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Nam, J.W., Heo, I., Rhee, J.K., Sohn, S.Y., Cho, Y., Zhang, B.T., and Kim, V.N. (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* *125*, 887-901.
35. Basyuk, E., Suavet, F., Doglio, A., Bordonne, R., and Bertrand, E. (2003). Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucleic Acids Res* *31*, 6593-6597.
36. Auyeung, V.C., Ulitsky, I., McGeary, S.E., and Bartel, D.P. (2013). Beyond secondary structure: primary-sequence determinants license pri-miRNA hairpins for processing. *Cell* *152*, 844-858.
37. Ballarino, M., Pagano, F., Girardi, E., Morlando, M., Cacchiarelli, D., Marchioni, M., Proudfoot, N.J., and Bozzoni, I. (2009). Coupled RNA processing and transcription of intergenic primary microRNAs. *Molecular and cellular biology* *29*, 5632-5638.
38. Kim, Y.K., and Kim, V.N. (2007). Processing of intronic microRNAs. *EMBO J* *26*, 775-783.
39. Morlando, M., Ballarino, M., Gromak, N., Pagano, F., Bozzoni, I., and Proudfoot, N.J. (2008). Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally. *Nature structural & molecular biology* *15*, 902-909.
40. Kataoka, N., Fujita, M., and Ohno, M. (2009). Functional association of the Microprocessor complex with the spliceosome. *Molecular and cellular biology* *29*, 3243-3254.
41. Janas, M.M., Khaled, M., Schubert, S., Bernstein, J.G., Golan, D., Veguilla, R.A., Fisher, D.E., Shomron, N., Levy, C., and Novina, C.D. (2011). Feed-Forward Microprocessing and Splicing Activities at a MicroRNA-Containing Intron. *PLoS Genet* *7*, e1002330.

42. Mattioli, C., Pianigiani, G., and Pagani, F. (2013). A competitive regulatory mechanism discriminates between juxtaposed splice sites and pri-miRNA structures. *Nucleic acids research*.
43. Melamed, Z., Levy, A., Ashwal-Fluss, R., Lev-Maor, G., Mekahel, K., Atias, N., Gilad, S., Sharan, R., Levy, C., Kadener, S., *et al.* (2013). Alternative splicing regulates biogenesis of miRNAs located across exon-intron junctions. *Molecular cell* *50*, 869-881.
44. Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development* *17*, 3011-3016.
45. Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., and Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* *303*, 95-98.
46. Bohnsack, M.T., Czaplinski, K., and Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna* *10*, 185-191.
47. Okada, C., Yamashita, E., Lee, S.J., Shibata, S., Katahira, J., Nakagawa, A., Yoneda, Y., and Tsukihara, T. (2009). A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science* *326*, 1275-1279.
48. Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* *409*, 363-366.
49. Grishok, A., Pasquinelli, A.E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D.L., Fire, A., Ruvkun, G., and Mello, C.C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* *106*, 23-34.
50. Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Balint, E., Tuschl, T., and Zamore, P.D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA. *Science* *293*, 834-838.
51. Ketting, R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J., and Plasterk, R.H. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* *15*, 2654-2659.
52. Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., and Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* *436*, 740-744.
53. Haase, A.D., Jaskiewicz, L., Zhang, H., Laine, S., Sack, R., Gatignol, A., and Filipowicz, W. (2005). TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO reports* *6*, 961-967.
54. Lee, Y., Hur, I., Park, S.Y., Kim, Y.K., Suh, M.R., and Kim, V.N. (2006). The role of PACT in the RNA silencing pathway. *The EMBO journal* *25*, 522-532.

55. Lee, H.Y., Zhou, K., Smith, A.M., Noland, C.L., and Doudna, J.A. (2013). Differential roles of human Dicer-binding proteins TRBP and PACT in small RNA processing. *Nucleic acids research* *41*, 6568-6576.
56. Saito, K., Ishizuka, A., Siomi, H., and Siomi, M.C. (2005). Processing of pre-microRNAs by the Dicer-1-Loquacious complex in *Drosophila* cells. *PLoS biology* *3*, e235.
57. Jiang, F., Ye, X., Liu, X., Fincher, L., McKearin, D., and Liu, Q. (2005). Dicer-1 and R3D1-L catalyze microRNA maturation in *Drosophila*. *Genes & development* *19*, 1674-1679.
58. Forstemann, K., Tomari, Y., Du, T., Vagin, V.V., Denli, A.M., Bratu, D.P., Klattenhoff, C., Theurkauf, W.E., and Zamore, P.D. (2005). Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. *PLoS biology* *3*, e236.
59. Park, J.K., Liu, X., Strauss, T.J., McKearin, D.M., and Liu, Q. (2007). The miRNA pathway intrinsically controls self-renewal of *Drosophila* germline stem cells. *Current biology : CB* *17*, 533-538.
60. Zhou, R., Czech, B., Brennecke, J., Sachidanandam, R., Wohlschlegel, J.A., Perrimon, N., and Hannon, G.J. (2009). Processing of *Drosophila* endo-siRNAs depends on a specific Loquacious isoform. *Rna* *15*, 1886-1895.
61. Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., van Dongen, S., Bateman, A., and Enright, A.J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic acids research* *34*, D140-144.
62. Lee, L.W., Zhang, S., Etheridge, A., Ma, L., Martin, D., Galas, D., and Wang, K. (2010). Complexity of the microRNA repertoire revealed by next-generation sequencing. *RNA* *16*, 2170-2180.
63. Westholm, J.O., Ladewig, E., Okamura, K., Robine, N., and Lai, E.C. (2012). Common and distinct patterns of terminal modifications to mirtrons and canonical microRNAs. *RNA* *18*, 177-192.
64. Neilsen, C.T., Goodall, G.J., and Bracken, C.P. (2012). IsomiRs--the overlooked repertoire in the dynamic microRNAome. *Trends Genet* *28*, 544-549.
65. Li, S.C., Liao, Y.L., Ho, M.R., Tsai, K.W., Lai, C.H., and Lin, W.C. (2012). miRNA arm selection and isomiR distribution in gastric cancer. *BMC Genomics* *13 Suppl 1*, S13.
66. Jinek, M., and Doudna, J.A. (2009). A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* *457*, 405-412.
67. Kwak, P.B., and Tomari, Y. (2012). The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nature structural & molecular biology* *19*, 145-151.

68. Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* *123*, 631-640.
69. Maniataki, E., and Mourelatos, Z. (2005). A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes & development* *19*, 2979-2990.
70. Yoda, M., Kawamata, T., Paroo, Z., Ye, X., Iwasaki, S., Liu, Q., and Tomari, Y. (2010). ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nature structural & molecular biology* *17*, 17-23.
71. Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* *115*, 209-216.
72. Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* *115*, 199-208.
73. Forstemann, K., Horwich, M.D., Wee, L., Tomari, Y., and Zamore, P.D. (2007). *Drosophila* microRNAs are sorted into functionally distinct argonaute complexes after production by dicer-1. *Cell* *130*, 287-297.
74. Czech, B., Zhou, R., Erlich, Y., Brennecke, J., Binari, R., Villalta, C., Gordon, A., Perrimon, N., and Hannon, G.J. (2009). Hierarchical rules for Argonaute loading in *Drosophila*. *Mol Cell* *36*, 445-456.
75. Okamura, K., Liu, N., and Lai, E.C. (2009). Distinct mechanisms for microRNA strand selection by *Drosophila* Argonautes. *Molecular cell* *36*, 431-444.
76. Ghildiyal, M., Xu, J., Seitz, H., Weng, Z., and Zamore, P.D. (2010). Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs partitions microRNA* strands into the RNA interference pathway. *Rna* *16*, 43-56.
77. Burroughs, A.M., Ando, Y., de Hoon, M.J., Tomaru, Y., Suzuki, H., Hayashizaki, Y., and Daub, C.O. (2011). Deep-sequencing of human Argonaute-associated small RNAs provides insight into miRNA sorting and reveals Argonaute association with RNA fragments of diverse origin. *RNA Biol* *8*, 158-177.
78. Dueck, A., Ziegler, C., Eichner, A., Berezikov, E., and Meister, G. (2012). microRNAs associated with the different human Argonaute proteins. *Nucleic acids research* *40*, 9850-9862.
79. Wang, D., Zhang, Z., O'Loughlin, E., Lee, T., Houel, S., O'Carroll, D., Tarakhovskiy, A., Ahn, N.G., and Yi, R. (2012). Quantitative functions of Argonaute proteins in mammalian development. *Genes & development* *26*, 693-704.
80. Modzelewski, A.J., Holmes, R.J., Hilz, S., Grimson, A., and Cohen, P.E. (2012). AGO4 regulates entry into meiosis and influences silencing of sex chromosomes in the male mouse germline. *Developmental cell* *23*, 251-264.

81. Meister, G. (2013). Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nature reviews Genetics* *14*, 447-459.
82. Wang, B., Li, S., Qi, H.H., Chowdhury, D., Shi, Y., and Novina, C.D. (2009). Distinct passenger strand and mRNA cleavage activities of human Argonaute proteins. *Nature structural & molecular biology* *16*, 1259-1266.
83. Meister, G., Landthaler, M., Peters, L., Chen, P.Y., Urlaub, H., Luhrmann, R., and Tuschl, T. (2005). Identification of novel argonaute-associated proteins. *Current biology : CB* *15*, 2149-2155.
84. Robb, G.B., and Rana, T.M. (2007). RNA helicase A interacts with RISC in human cells and functions in RISC loading. *Molecular cell* *26*, 523-537.
85. Gu, S., Jin, L., Zhang, F., Huang, Y., Grimm, D., Rossi, J.J., and Kay, M.A. (2011). Thermodynamic stability of small hairpin RNAs highly influences the loading process of different mammalian Argonautes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 9208-9213.
86. Petri, S., Dueck, A., Lehmann, G., Putz, N., Rudel, S., Kremmer, E., and Meister, G. (2011). Increased siRNA duplex stability correlates with reduced off-target and elevated on-target effects. *Rna* *17*, 737-749.
87. Frank, F., Sonenberg, N., and Nagar, B. (2010). Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature* *465*, 818-822.
88. Liu, Y., Ye, X., Jiang, F., Liang, C., Chen, D., Peng, J., Kinch, L.N., Grishin, N.V., and Liu, Q. (2009). C3PO, an endoribonuclease that promotes RNAi by facilitating RISC activation. *Science* *325*, 750-753.
89. Ye, X., Huang, N., Liu, Y., Paroo, Z., Huerta, C., Li, P., Chen, S., Liu, Q., and Zhang, H. (2011). Structure of C3PO and mechanism of human RISC activation. *Nature structural & molecular biology* *18*, 650-657.
90. Johnston, M., Geoffroy, M.C., Sobala, A., Hay, R., and Hutvagner, G. (2010). HSP90 protein stabilizes unloaded argonaute complexes and microscopic P-bodies in human cells. *Molecular biology of the cell* *21*, 1462-1469.
91. Iki, T., Yoshikawa, M., Nishikiori, M., Jaudal, M.C., Matsumoto-Yokoyama, E., Mitsuhara, I., Meshi, T., and Ishikawa, M. (2010). In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90. *Molecular cell* *39*, 282-291.
92. Iwasaki, S., Kobayashi, M., Yoda, M., Sakaguchi, Y., Katsuma, S., Suzuki, T., and Tomari, Y. (2010). Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Molecular cell* *39*, 292-299.

93. Frohn, A., Eberl, H.C., Stohr, J., Glasmacher, E., Rudel, S., Heissmeyer, V., Mann, M., and Meister, G. (2012). Dicer-dependent and -independent Argonaute2 protein interaction networks in mammalian cells. *Molecular & cellular proteomics : MCP* *11*, 1442-1456.
94. De, N., Young, L., Lau, P.W., Meisner, N.C., Morrissey, D.V., and MacRae, I.J. (2013). Highly complementary target RNAs promote release of guide RNAs from human Argonaute2. *Molecular cell* *50*, 344-355.
95. Friedman, R.C., Farh, K.K., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research* *19*, 92-105.
96. Yekta, S., Shih, I.H., and Bartel, D.P. (2004). MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* *304*, 594-596.
97. Rigoutsos, I. (2009). New tricks for animal microRNAs: targeting of amino acid coding regions at conserved and nonconserved sites. *Cancer research* *69*, 3245-3248.
98. Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K.D., and Carrington, J.C. (2002). Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science* *297*, 2053-2056.
99. Beitzinger, M., Peters, L., Zhu, J.Y., Kremmer, E., and Meister, G. (2007). Identification of human microRNA targets from isolated argonaute protein complexes. *RNA Biol* *4*, 76-84.
100. Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *403*, 901-906.
101. Slack, F.J., Basson, M., Liu, Z., Ambros, V., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. (2000). The lin-41 RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Molecular cell* *5*, 659-669.
102. Shin, C., Nam, J.W., Farh, K.K., Chiang, H.R., Shkumatava, A., and Bartel, D.P. (2010). Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing. *Molecular cell* *38*, 789-802.
103. Tay, Y., Zhang, J., Thomson, A.M., Lim, B., and Rigoutsos, I. (2008). MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* *455*, 1124-1128.
104. Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet* *12*, 99-110.
105. Pasquinelli, A.E. (2012). MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet* *13*, 271-282.

106. Eulalio, A., Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2008). Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 132, 9-14.
107. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9, 102-114.
108. Wu, L., and Belasco, J.G. (2008). Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs. *Molecular cell* 29, 1-7.
109. Djuranovic, S., Nahvi, A., and Green, R. (2011). A parsimonious model for gene regulation by miRNAs. *Science* 331, 550-553.
110. Selbach, M., Schwanhauser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., and Rajewsky, N. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 455, 58-63.
111. Baek, D., Villen, J., Shin, C., Camargo, F.D., Gygi, S.P., and Bartel, D.P. (2008). The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 455, 64-71.
112. Hendrickson, D.G., Hogan, D.J., McCullough, H.L., Myers, J.W., Herschlag, D., Ferrell, J.E., and Brown, P.O. (2009). Concordant regulation of translation and mRNA abundance for hundreds of targets of a human microRNA. *PLoS biology* 7, e1000238.
113. Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S., and Bartel, D.P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466, 835-840.
114. Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P., and Izaurralde, E. (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes & development* 20, 1885-1898.
115. Giraldez, A.J., Mishima, Y., Rihel, J., Grocock, R.J., Van Dongen, S., Inoue, K., Enright, A.J., and Schier, A.F. (2006). Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* 312, 75-79.
116. Wu, L., Fan, J., and Belasco, J.G. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 4034-4039.
117. Braun, J.E., Huntzinger, E., Fauser, M., and Izaurralde, E. (2011). GW182 proteins directly recruit cytoplasmic deadenylase complexes to miRNA targets. *Molecular cell* 44, 120-133.
118. Chekulaeva, M., Mathys, H., Zipprich, J.T., Attig, J., Colic, M., Parker, R., and Filipowicz, W. (2011). miRNA repression involves GW182-mediated recruitment of CCR4-NOT through conserved W-containing motifs. *Nature structural & molecular biology* 18, 1218-1226.

119. Fabian, M.R., Cieplak, M.K., Frank, F., Morita, M., Green, J., Srikumar, T., Nagar, B., Yamamoto, T., Raught, B., Duchaine, T.F., *et al.* (2011). miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4-NOT. *Nature structural & molecular biology* *18*, 1211-1217.
120. Humphreys, D.T., Westman, B.J., Martin, D.I., and Preiss, T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 16961-16966.
121. Maroney, P.A., Yu, Y., Fisher, J., and Nilsen, T.W. (2006). Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nature structural & molecular biology* *13*, 1102-1107.
122. Nottrott, S., Simard, M.J., and Richter, J.D. (2006). Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nature structural & molecular biology* *13*, 1108-1114.
123. Olsen, P.H., and Ambros, V. (1999). The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Developmental biology* *216*, 671-680.
124. Petersen, C.P., Bordeleau, M.E., Pelletier, J., and Sharp, P.A. (2006). Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Molecular cell* *21*, 533-542.
125. Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., Artus, C.G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E., and Filipowicz, W. (2005). Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* *309*, 1573-1576.
126. Seggerson, K., Tang, L., and Moss, E.G. (2002). Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Developmental biology* *243*, 215-225.
127. Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J.A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* *318*, 1931-1934.
128. Orom, U.A., Nielsen, F.C., and Lund, A.H. (2008). MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell* *30*, 460-471.
129. Jackson, R.J., Hellen, C.U., and Pestova, T.V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature reviews Molecular cell biology* *11*, 113-127.
130. Mortensen, R.D., Serra, M., Steitz, J.A., and Vasudevan, S. (2011). Posttranscriptional activation of gene expression in *Xenopus laevis* oocytes by microRNA-protein complexes (microRNPs). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 8281-8286.

131. Li, X., Cassidy, J.J., Reinke, C.A., Fischboeck, S., and Carthew, R.W. (2009). A microRNA imparts robustness against environmental fluctuation during development. *Cell* *137*, 273-282.
132. Wu, L., and Belasco, J.G. (2005). Micro-RNA regulation of the mammalian *lin-28* gene during neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells. *Molecular and cellular biology* *25*, 9198-9208.
133. Davis, B.N., and Hata, A. (2009). Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. *Cell Commun Signal* *7*, 18.
134. Kim, J., Inoue, K., Ishii, J., Vanti, W.B., Voronov, S.V., Murchison, E., Hannon, G., and Abeliovich, A. (2007). A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science* *317*, 1220-1224.
135. Johnston, R.J., Jr., Chang, S., Etchberger, J.F., Ortiz, C.O., and Hobert, O. (2005). MicroRNAs acting in a double-negative feedback loop to control a neuronal cell fate decision. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 12449-12454.
136. Ramalingam, P., Palanichamy, J.K., Singh, A., Das, P., Bhagat, M., Kassab, M.A., Sinha, S., and Chattopadhyay, P. (2014). Biogenesis of intronic miRNAs located in clusters by independent transcription and alternative splicing. *Rna* *20*, 76-87.
137. Guil, S., and Caceres, J.F. (2007). The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miR-18a. *Nature structural & molecular biology* *14*, 591-596.
138. Thomson, J.M., Newman, M., Parker, J.S., Morin-Kensicki, E.M., Wright, T., and Hammond, S.M. (2006). Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes & development* *20*, 2202-2207.
139. Han, J., Pedersen, J.S., Kwon, S.C., Belair, C.D., Kim, Y.K., Yeom, K.H., Yang, W.Y., Haussler, D., Blelloch, R., and Kim, V.N. (2009). Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8. *Cell* *136*, 75-84.
140. Triboulet, R., Chang, H.M., Lapierre, R.J., and Gregory, R.I. (2009). Post-transcriptional control of DGCR8 expression by the Microprocessor. *Rna* *15*, 1005-1011.
141. Melo, S.A., Ropero, S., Moutinho, C., Aaltonen, L.A., Yamamoto, H., Calin, G.A., Rossi, S., Fernandez, A.F., Carneiro, F., Oliveira, C., *et al.* (2009). A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function. *Nature genetics* *41*, 365-370.
142. Paroo, Z., Ye, X., Chen, S., and Liu, Q. (2009). Phosphorylation of the human microRNA-generating complex mediates MAPK/Erk signaling. *Cell* *139*, 112-122.

143. Forman, J.J., Legesse-Miller, A., and Collier, H.A. (2008). A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 14879-14884.
144. Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., and Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology* *11*, 228-234.
145. Viswanathan, S.R., and Daley, G.Q. (2010). Lin28: A microRNA regulator with a macro role. *Cell* *140*, 445-449.
146. Rybak, A., Fuchs, H., Smirnova, L., Brandt, C., Pohl, E.E., Nitsch, R., and Wulczyn, F.G. (2008). A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nature cell biology* *10*, 987-993.
147. Hagan, J.P., Piskounova, E., and Gregory, R.I. (2009). Lin28 recruits the TUTase Zcchc11 to inhibit let-7 maturation in mouse embryonic stem cells. *Nature structural & molecular biology* *16*, 1021-1025.
148. Heo, I., Joo, C., Cho, J., Ha, M., Han, J., and Kim, V.N. (2008). Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA. *Molecular cell* *32*, 276-284.
149. Heo, I., Joo, C., Kim, Y.K., Ha, M., Yoon, M.J., Cho, J., Yeom, K.H., Han, J., and Kim, V.N. (2009). TUT4 in concert with Lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation. *Cell* *138*, 696-708.
150. Jones, M.R., Quinton, L.J., Blahna, M.T., Neilson, J.R., Fu, S., Ivanov, A.R., Wolf, D.A., and Mizgerd, J.P. (2009). Zcchc11-dependent uridylation of microRNA directs cytokine expression. *Nature cell biology* *11*, 1157-1163.
151. Viswanathan, S.R., Daley, G.Q., and Gregory, R.I. (2008). Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science* *320*, 97-100.
152. Fukuda, T., Yamagata, K., Fujiyama, S., Matsumoto, T., Koshida, I., Yoshimura, K., Mihara, M., Naitou, M., Endoh, H., Nakamura, T., *et al.* (2007). DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs. *Nature cell biology* *9*, 604-611.
153. Suzuki, H.I., Yamagata, K., Sugimoto, K., Iwamoto, T., Kato, S., and Miyazono, K. (2009). Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* *460*, 529-533.
154. Gruber, J.J., Zatechka, D.S., Sabin, L.R., Yong, J., Lum, J.J., Kong, M., Zong, W.X., Zhang, Z., Lau, C.K., Rawlings, J., *et al.* (2009). Ars2 links the nuclear cap-binding complex to RNA interference and cell proliferation. *Cell* *138*, 328-339.
155. Wu, H., Sun, S., Tu, K., Gao, Y., Xie, B., Krainer, A.R., and Zhu, J. (2010). A splicing-independent function of SF2/ASF in microRNA processing. *Molecular cell* *38*, 67-77.

156. Michlewski, G., Guil, S., Semple, C.A., and Caceres, J.F. (2008). Posttranscriptional regulation of miRNAs harboring conserved terminal loops. *Molecular cell* 32, 383-393.
157. Trabucchi, M., Briata, P., Garcia-Mayoral, M., Haase, A.D., Filipowicz, W., Ramos, A., Gherzi, R., and Rosenfeld, M.G. (2009). The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs. *Nature* 459, 1010-1014.
158. Davis, B.N., Hilyard, A.C., Lagna, G., and Hata, A. (2008). SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* 454, 56-61.
159. Davis, B.N., Hilyard, A.C., Nguyen, P.H., Lagna, G., and Hata, A. (2010). Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha. *Molecular cell* 39, 373-384.
160. Scadden, A.D. (2005). The RISC subunit Tudor-SN binds to hyper-edited double-stranded RNA and promotes its cleavage. *Nature structural & molecular biology* 12, 489-496.
161. Kawahara, Y., Zinshteyn, B., Chendrimada, T.P., Shiekhattar, R., and Nishikura, K. (2007). RNA editing of the microRNA-151 precursor blocks cleavage by the Dicer-TRBP complex. *EMBO reports* 8, 763-769.
162. Kawahara, Y., Zinshteyn, B., Sethupathy, P., Iizasa, H., Hatzigeorgiou, A.G., and Nishikura, K. (2007). Redirection of silencing targets by adenosine-to-inosine editing of miRNAs. *Science* 315, 1137-1140.
163. Kawahara, Y., Megraw, M., Kreider, E., Iizasa, H., Valente, L., Hatzigeorgiou, A.G., and Nishikura, K. (2008). Frequency and fate of microRNA editing in human brain. *Nucleic acids research* 36, 5270-5280.
164. Heale, B.S., Keegan, L.P., McGurk, L., Michlewski, G., Brindle, J., Stanton, C.M., Caceres, J.F., and O'Connell, M.A. (2009). Editing independent effects of ADARs on the miRNA/siRNA pathways. *The EMBO journal* 28, 3145-3156.
165. van Rooij, E., Sutherland, L.B., Qi, X., Richardson, J.A., Hill, J., and Olson, E.N. (2007). Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science* 316, 575-579.
166. Gatfield, D., Le Martelot, G., Vejnar, C.E., Gerlach, D., Schaad, O., Fleury-Olela, F., Ruskeepaa, A.L., Oresic, M., Esau, C.C., Zdobnov, E.M., *et al.* (2009). Integration of microRNA miR-122 in hepatic circadian gene expression. *Genes & development* 23, 1313-1326.
167. Krol, J., Buskamp, V., Markiewicz, I., Stadler, M.B., Ribi, S., Richter, J., Duebel, J., Bicker, S., Fehling, H.J., Schubeler, D., *et al.* (2010). Characterizing light-regulated retinal microRNAs reveals rapid turnover as a common property of neuronal microRNAs. *Cell* 141, 618-631.

168. Buck, A.H., Perot, J., Chisholm, M.A., Kumar, D.S., Tuddenham, L., Cognat, V., Marcinowski, L., Dolken, L., and Pfeffer, S. (2010). Post-transcriptional regulation of miR-27 in murine cytomegalovirus infection. *Rna* *16*, 307-315.
169. Jeck, W.R., Sorrentino, J.A., Wang, K., Slevin, M.K., Burd, C.E., Liu, J., Marzluff, W.F., and Sharpless, N.E. (2013). Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *Rna* *19*, 141-157.
170. Memczak, S., Jens, M., Elefsinioti, A., Torti, F., Krueger, J., Rybak, A., Maier, L., Mackowiak, S.D., Gregersen, L.H., Munschauer, M., *et al.* (2013). Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature* *495*, 333-338.
171. Hansen, T.B., Jensen, T.I., Clausen, B.H., Bramsen, J.B., Finsen, B., Damgaard, C.K., and Kjems, J. (2013). Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature* *495*, 384-388.
172. Diederichs, S., and Haber, D.A. (2007). Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell* *131*, 1097-1108.
173. Katoh, T., Sakaguchi, Y., Miyauchi, K., Suzuki, T., Kashiwabara, S., and Baba, T. (2009). Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2. *Genes & development* *23*, 433-438.
174. Li, J., Yang, Z., Yu, B., Liu, J., and Chen, X. (2005). Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis. *Current biology : CB* *15*, 1501-1507.
175. Meisner, N.C., and Filipowicz, W. (2010). Properties of the regulatory RNA-binding protein HuR and its role in controlling miRNA repression. *Adv Exp Med Biol* *700*, 106-123.
176. Bhattacharyya, S.N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E.I., and Filipowicz, W. (2006). Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* *125*, 1111-1124.
177. Kedde, M., Strasser, M.J., Boldajipour, B., Oude Vrielink, J.A., Slanchev, K., le Sage, C., Nagel, R., Voorhoeve, P.M., van Duijse, J., Orom, U.A., *et al.* (2007). RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell* *131*, 1273-1286.
178. Kim, H.H., Kuwano, Y., Srikantan, S., Lee, E.K., Martindale, J.L., and Gorospe, M. (2009). HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression. *Genes & development* *23*, 1743-1748.
179. Gu, S., Jin, L., Zhang, F., Sarnow, P., and Kay, M.A. (2009). Biological basis for restriction of microRNA targets to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs. *Nature structural & molecular biology* *16*, 144-150.

180. Grimson, A., Farh, K.K., Johnston, W.K., Garrett-Engele, P., Lim, L.P., and Bartel, D.P. (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Molecular cell* 27, 91-105.
181. Chi, S.W., Zang, J.B., Mele, A., and Darnell, R.B. (2009). Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. *Nature* 460, 479-486.
182. Hafner, M., Landthaler, M., Burger, L., Khorshid, M., Hausser, J., Berninger, P., Rothballer, A., Ascano, M., Jr., Jungkamp, A.C., Munschauer, M., *et al.* (2010). Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell* 141, 129-141.
183. Leung, A.K., Young, A.G., Bhutkar, A., Zheng, G.X., Bosson, A.D., Nielsen, C.B., and Sharp, P.A. (2011). Genome-wide identification of Ago2 binding sites from mouse embryonic stem cells with and without mature microRNAs. *Nature structural & molecular biology* 18, 237-244.
184. Broderick, J.A., Salomon, W.E., Ryder, S.P., Aronin, N., and Zamore, P.D. (2011). Argonaute protein identity and pairing geometry determine cooperativity in mammalian RNA silencing. *Rna* 17, 1858-1869.
185. Saetrom, P., Heale, B.S., Snove, O., Jr., Aagaard, L., Alluin, J., and Rossi, J.J. (2007). Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity. *Nucleic acids research* 35, 2333-2342.
186. Ameres, S.L., and Zamore, P.D. (2013). Diversifying microRNA sequence and function. *Nature reviews Molecular cell biology* 14, 475-488.
187. Chatterjee, S., and Grosshans, H. (2009). Active turnover modulates mature microRNA activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 461, 546-549.
188. Chatterjee, S., Fasler, M., Bussing, I., and Grosshans, H. (2011). Target-mediated protection of endogenous microRNAs in *C. elegans*. *Developmental cell* 20, 388-396.
189. Ameres, S.L., Horwich, M.D., Hung, J.H., Xu, J., Ghildiyal, M., Weng, Z., and Zamore, P.D. (2010). Target RNA-directed trimming and tailing of small silencing RNAs. *Science* 328, 1534-1539.
190. Baccarini, A., Chauhan, H., Gardner, T.J., Jayaprakash, A.D., Sachidanandam, R., and Brown, B.D. (2011). Kinetic analysis reveals the fate of a microRNA following target regulation in mammalian cells. *Current biology : CB* 21, 369-376.
191. Pasquinelli, A.E. (2010). Molecular biology. Paring miRNAs through pairing. *Science* 328, 1494-1495.
192. Ebert, M.S., and Sharp, P.A. (2010). Emerging roles for natural microRNA sponges. *Current biology : CB* 20, R858-861.

193. Salmena, L., Poliseno, L., Tay, Y., Kats, L., and Pandolfi, P.P. (2011). A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? *Cell* *146*, 353-358.
194. Mercer, T.R., Wilhelm, D., Dinger, M.E., Solda, G., Korbie, D.J., Glazov, E.A., Truong, V., Schwenke, M., Simons, C., Matthaei, K.I., *et al.* (2011). Expression of distinct RNAs from 3' untranslated regions. *Nucleic acids research* *39*, 2393-2403.
195. Cheloufi, S., Dos Santos, C.O., Chong, M.M., and Hannon, G.J. (2010). A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* *465*, 584-589.
196. Cifuentes, D., Xue, H., Taylor, D.W., Patnode, H., Mishima, Y., Cheloufi, S., Ma, E., Mane, S., Hannon, G.J., Lawson, N.D., *et al.* (2010). A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science* *328*, 1694-1698.
197. Yang, J.S., Maurin, T., Robine, N., Rasmussen, K.D., Jeffrey, K.L., Chandwani, R., Papapetrou, E.P., Sadelain, M., O'Carroll, D., and Lai, E.C. (2010). Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 15163-15168.
198. Miyoshi, K., Miyoshi, T., and Siomi, H. (2010). Many ways to generate microRNA-like small RNAs: non-canonical pathways for microRNA production. *Mol Genet Genomics* *284*, 95-103.
199. Yang, J.S., and Lai, E.C. (2011). Alternative miRNA Biogenesis Pathways and the Interpretation of Core miRNA Pathway Mutants. *Mol Cell* *43*, 892-903.
200. Lee, Y.S., Shibata, Y., Malhotra, A., and Dutta, A. (2009). A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs). *Genes Dev* *23*, 2639-2649.
201. Huissecker, D., Huang, Y., Lau, A., Parameswaran, P., Fire, A.Z., and Kay, M.A. (2010). Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing. *RNA* *16*, 673-695.
202. Wang, H.W., Noland, C., Siridechadilok, B., Taylor, D.W., Ma, E., Felderer, K., Doudna, J.A., and Nogales, E. (2009). Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex. *Nature structural & molecular biology* *16*, 1148-1153.
203. Ender, C., Krek, A., Friedlander, M.R., Beitzinger, M., Weinmann, L., Chen, W., Pfeffer, S., Rajewsky, N., and Meister, G. (2008). A human snoRNA with microRNA-like functions. *Mol Cell* *32*, 519-528.
204. Saraiya, A.A., and Wang, C.C. (2008). snoRNA, a novel precursor of microRNA in *Giardia lamblia*. *PLoS Pathog* *4*, e1000224.
205. Babiarz, J.E., Ruby, J.G., Wang, Y., Bartel, D.P., and Blelloch, R. (2008). Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev* *22*, 2773-2785.

206. Matera, A.G., Terns, R.M., and Terns, M.P. (2007). Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 209-220.
207. Taft, R.J., Glazov, E.A., Lassmann, T., Hayashizaki, Y., Carninci, P., and Mattick, J.S. (2009). Small RNAs derived from snoRNAs. *RNA* 15, 1233-1240.
208. Scott, M.S., Avolio, F., Ono, M., Lamond, A.I., and Barton, G.J. (2009). Human miRNA precursors with box H/ACA snoRNA features. *PLoS Comput Biol* 5, e1000507.
209. Ono, M., Scott, M.S., Yamada, K., Avolio, F., Barton, G.J., and Lamond, A.I. (2011). Identification of human miRNA precursors that resemble box C/D snoRNAs. *Nucleic acids research* 39, 3879-3891.
210. Brameier, M., Herwig, A., Reinhardt, R., Walter, L., and Gruber, J. (2011). Human box C/D snoRNAs with miRNA like functions: expanding the range of regulatory RNAs. *Nucleic acids research* 39, 675-686.
211. Scott, M.S., and Ono, M. (2011). From snoRNA to miRNA: Dual function regulatory non-coding RNAs. *Biochimie* 93, 1987-1992.
212. Cole, C., Sobala, A., Lu, C., Thatcher, S.R., Bowman, A., Brown, J.W., Green, P.J., Barton, G.J., and Hutvagner, G. (2009). Filtering of deep sequencing data reveals the existence of abundant Dicer-dependent small RNAs derived from tRNAs. *RNA* 15, 2147-2160.
213. Pfeffer, S., Zavolan, M., Grasser, F.A., Chien, M., Russo, J.J., Ju, J., John, B., Enright, A.J., Marks, D., Sander, C., *et al.* (2004). Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* 304, 734-736.
214. Pfeffer, S., Sewer, A., Lagos-Quintana, M., Sheridan, R., Sander, C., Grasser, F.A., van Dyk, L.F., Ho, C.K., Shuman, S., Chien, M., *et al.* (2005). Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods* 2, 269-276.
215. Reese, T.A., Xia, J., Johnson, L.S., Zhou, X., Zhang, W., and Virgin, H.W. (2010). Identification of novel microRNA-like molecules generated from herpesvirus and host tRNA transcripts. *Journal of virology* 84, 10344-10353.
216. Bogerd, H.P., Karnowski, H.W., Cai, X., Shin, J., Pohlars, M., and Cullen, B.R. (2010). A mammalian herpesvirus uses noncanonical expression and processing mechanisms to generate viral MicroRNAs. *Mol Cell* 37, 135-142.
217. Miyoshi, K., Miyoshi, T., Hartig, J.V., Siomi, H., and Siomi, M.C. (2010). Molecular mechanisms that funnel RNA precursors into endogenous small-interfering RNA and microRNA biogenesis pathways in *Drosophila*. *Rna* 16, 506-515.

218. Tam, O.H., Aravin, A.A., Stein, P., Girard, A., Murchison, E.P., Cheloufi, S., Hodges, E., Anger, M., Sachidanandam, R., Schultz, R.M., *et al.* (2008). Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature* *453*, 534-538.
219. Watanabe, T., Totoki, Y., Toyoda, A., Kaneda, M., Kuramochi-Miyagawa, S., Obata, Y., Chiba, H., Kohara, Y., Kono, T., Nakano, T., *et al.* (2008). Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature* *453*, 539-543.
220. Lim, L.P., and Burge, C.B. (2001). A computational analysis of sequence features involved in recognition of short introns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 11193-11198.
221. Ruby, J.G., Jan, C.H., and Bartel, D.P. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* *448*, 83-86.
222. Okamura, K., Hagen, J.W., Duan, H., Tyler, D.M., and Lai, E.C. (2007). The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* *130*, 89-100.
223. Westholm, J.O., and Lai, E.C. (2011). Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie* *93*, 1897-1904.
224. Flynt, A.S., Greimann, J.C., Chung, W.J., Lima, C.D., and Lai, E.C. (2010). MicroRNA biogenesis via splicing and exosome-mediated trimming in *Drosophila*. *Mol Cell* *38*, 900-907.
225. Liu, Q., Greimann, J.C., and Lima, C.D. (2006). Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. *Cell* *127*, 1223-1237.
226. Chung, W.J., Agius, P., Westholm, J.O., Chen, M., Okamura, K., Robine, N., Leslie, C.S., and Lai, E.C. (2011). Computational and experimental identification of mirtrons in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Genome Res* *21*, 286-300.
227. Berezikov, E., Chung, W.J., Willis, J., Cuppen, E., and Lai, E.C. (2007). Mammalian mirtron genes. *Mol Cell* *28*, 328-336.
228. Glazov, E.A., Cottee, P.A., Barris, W.C., Moore, R.J., Dalrymple, B.P., and Tizard, M.L. (2008). A microRNA catalog of the developing chicken embryo identified by a deep sequencing approach. *Genome research* *18*, 957-964.
229. Zhu, Q.H., Spriggs, A., Matthew, L., Fan, L., Kennedy, G., Gubler, F., and Helliwell, C. (2008). A diverse set of microRNAs and microRNA-like small RNAs in developing rice grains. *Genome research* *18*, 1456-1465.
230. Glazov, E.A., Kongsuwan, K., Assavalapsakul, W., Horwood, P.F., Mitter, N., and Mahony, T.J. (2009). Repertoire of bovine miRNA and miRNA-like small regulatory RNAs expressed upon viral infection. *PLoS One* *4*, e6349.

231. Chong, M.M., Zhang, G., Cheloufi, S., Neubert, T.A., Hannon, G.J., and Littman, D.R. (2010). Canonical and alternate functions of the microRNA biogenesis machinery. *Genes Dev* 24, 1951-1960.
232. Chiang, H.R., Schoenfeld, L.W., Ruby, J.G., Auyeung, V.C., Spies, N., Baek, D., Johnston, W.K., Russ, C., Luo, S., Babiarz, J.E., *et al.* (2010). Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes Dev* 24, 992-1009.
233. Babiarz, J.E., Hsu, R., Melton, C., Thomas, M., Ullian, E.M., and Blalock, R. (2011). A role for noncanonical microRNAs in the mammalian brain revealed by phenotypic differences in Dgcr8 versus Dicer1 knockouts and small RNA sequencing. *RNA* 17, 1489-1501.
234. Deutsch, M., and Long, M. (1999). Intron-exon structures of eukaryotic model organisms. *Nucleic acids research* 27, 3219-3228.
235. Sakharkar, M.K., Chow, V.T., and Kanguane, P. (2004). Distributions of exons and introns in the human genome. *In Silico Biol* 4, 387-393.
236. Orban, T.I., Apati, A., Nemeth, A., Varga, N., Krizsik, V., Schamberger, A., Szebenyi, K., Erdei, Z., Varady, G., Karaszi, E., *et al.* (2009). Applying a "double-feature" promoter to identify cardiomyocytes differentiated from human embryonic stem cells following transposon-based gene delivery. *Stem Cells* 27, 1077-1087.
237. Kolacsek, O., Krizsik, V., Schamberger, A., Erdei, Z., Apati, A., Varady, G., Mates, L., Izsvak, Z., Ivics, Z., Sarkadi, B., *et al.* (2011). Reliable transgene-independent method for determining Sleeping Beauty transposon copy numbers. *Mob DNA* 2, 5.
238. Lacy-Hulbert, A., Thomas, R., Li, X.P., Lilley, C.E., Coffin, R.S., and Roes, J. (2001). Interruption of coding sequences by heterologous introns can enhance the functional expression of recombinant genes. *Gene Ther* 8, 649-653.
239. Schamberger, A., Sarkadi, B., and Orban, T.I. (2012). Human mirtrons can express functional microRNAs simultaneously from both arms in a flanking exon-independent manner. *RNA Biol* 9, 1177-1185.
240. Wang, Y., Medvid, R., Melton, C., Jaenisch, R., and Blalock, R. (2007). DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat Genet* 39, 380-385.
241. Varallyay, E., Burgyan, J., and Havelda, Z. (2008). MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes. *Nat Protoc* 3, 190-196.
242. Pan, Y.Z., Morris, M.E., and Yu, A.M. (2009). MicroRNA-328 negatively regulates the expression of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in human cancer cells. *Molecular pharmacology* 75, 1374-1379.

243. Davalos, A., Goedeke, L., Smibert, P., Ramirez, C.M., Warriar, N.P., Andreo, U., Cirera-Salinas, D., Rayner, K., Suresh, U., Pastor-Pareja, J.C., *et al.* (2011). miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 9232-9237.
244. Rayner, K.J., Esau, C.C., Hussain, F.N., McDaniel, A.L., Marshall, S.M., van Gils, J.M., Ray, T.D., Sheedy, F.J., Goedeke, L., Liu, X., *et al.* (2011). Inhibition of miR-33a/b in non-human primates raises plasma HDL and lowers VLDL triglycerides. *Nature* *478*, 404-407.
245. Varallyay, E., Burgyan, J., and Havelda, Z. (2007). Detection of microRNAs by Northern blot analyses using LNA probes. *Methods* *43*, 140-145.
246. Havens, M.A., Reich, A.A., Duelli, D.M., and Hastings, M.L. (2012). Biogenesis of mammalian microRNAs by a non-canonical processing pathway. *Nucleic Acids Res* *40*, 4626-4640.
247. Winter, J., and Diederichs, S. (2013). Argonaute-3 activates the let-7a passenger strand microRNA. *RNA Biol* *10*.
248. Zeng, Y., and Cullen, B.R. (2004). Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic acids research* *32*, 4776-4785.
249. Sibley, C.R., Seow, Y., Saayman, S., Dijkstra, K.K., El Andaloussi, S., Weinberg, M.S., and Wood, M.J. (2012). The biogenesis and characterization of mammalian microRNAs of mirtron origin. *Nucleic Acids Res* *40*, 438-448.
250. Jin, C., Rajabi, H., and Kufe, D. (2010). miR-1226 targets expression of the mucin 1 oncoprotein and induces cell death. *Int J Oncol* *37*, 61-69.
251. Ladewig, E., Okamura, K., Flynt, A.S., Westholm, J.O., and Lai, E.C. (2012). Discovery of hundreds of mirtrons in mouse and human small RNA data. *Genome research* *22*, 1634-1645.
252. Rainer, J., Ploner, C., Jesacher, S., Ploner, A., Eduardoff, M., Mansha, M., Wasim, M., Panzer-Grumayer, R., Trajanoski, Z., Niederegger, H., *et al.* (2009). Glucocorticoid-regulated microRNAs and mirtrons in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* *23*, 746-752.
253. Wulfken, L.M., Moritz, R., Ohlmann, C., Holdenrieder, S., Jung, V., Becker, F., Herrmann, E., Walgenbach-Brunagel, G., von Ruecker, A., Muller, S.C., *et al.* (2011). MicroRNAs in renal cell carcinoma: diagnostic implications of serum miR-1233 levels. *PLoS One* *6*, e25787.
254. Jones, D., Li, Y., He, Y., Xu, Z., Chen, H., and Min, W. (2012). Mirtron microRNA-1236 inhibits VEGFR-3 signaling during inflammatory lymphangiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *32*, 633-642.

255. Zhang, W.G., Chen, L., Dong, Q., He, J., Zhao, H.D., Li, F.L., and Li, H. (2013). Mmu-miR-702 functions as an anti-apoptotic mirtron by mediating ATF6 inhibition in mice. *Gene* 531, 235-242.
256. Curtis, H.J., Sibley, C.R., and Wood, M.J. (2012). Mirtrons, an emerging class of atypical miRNA. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3, 617-632.
257. Valen, E., Preker, P., Andersen, P.R., Zhao, X., Chen, Y., Ender, C., Dueck, A., Meister, G., Sandelin, A., and Jensen, T.H. (2011). Biogenic mechanisms and utilization of small RNAs derived from human protein-coding genes. *Nat Struct Mol Biol* 18, 1075-1082.
258. Sibley, C.R., Seow, Y., Curtis, H., Weinberg, M.S., and Wood, M.J. (2012). Silencing of Parkinson's disease-associated genes with artificial mirtron mimics of miR-1224. *Nucleic acids research* 40, 9863-9875.
259. Seow, Y., Sibley, C.R., and Wood, M.J. (2012). Artificial mirtron-mediated gene knockdown: functional DMPK silencing in mammalian cells. *Rna* 18, 1328-1337.

12. MELLÉKLET

12.1. Klónozó primerek és mirtron oligonukleotidok

For: *forward* primer

Rev: *reverse* primer

eie: exon-intron-exon (mirtron a határoló genomi exonokkal)

mut: mutagenézis

sm: splicing mutáns

*: RT-PCR-hez (reverz transzkripciót követő PCR, splicing detektálására) is alkalmaztuk primerként

PCR primerek mirtronok (határoló exonokkal együtt történő) amplifikációjához	
név	szekvencia
mir-877eie-For*	5'- AGGTGGTAGCAGATGAGACACC
mir-877eie-Rev*	5'- CTGGCCAGGGAGACACGCAT
mir-1226eie_For*	5'- GTGAGGCAGGGCAAGGTCACC
mir-1226eie_Rev*	5'- CACGGATGTGCACGTCCCCGT
mir-1233eie_For*	5'- AGCGGCCTTATGGACCTCCTG
mir-1233eie_Rev*	5'- CTTCTCTCCTCCTTGTCTGG
mir-328i_eie_For*	5'- TTTGTGTTGGAGAACAGCAGCCG
mir-328i_eie_Rev*	5'- CTTGTCTGAAGTCTCCTGTGTAG
mir-1003eie_For*	5'- ATAAAGCCGATAAGCGTGCGGAA
mir-1003eie_Rev*	5'- TCAATAGTCAACCAGTTTCTTGAGC

EGFP mutagenézis primerek (Pvull restrikciós hely bevitele)	
EGFPmut-For	5'- GCAGCGTGCAGCTGGCCGACCACTACCAGCAGAACAC
EGFPmut-Rev	5'- GTGTTCTGCTGGTAGTGGTCGGCCAGCTGCACGCTGC

PCR primerek intron/miRNS kontrollok amplifikációjához (EGFP kódoló régióba ligáláshoz)	
mulgCe3i-For	5'- GTGAGTACAGGAGGTGGAGAGT
mulgCe3i-Rev	5'- CTGTGGGACGACATGACTTAA
mir-33b_For	5'- GTGAGGGGTGGGGTCAGGGG
mir-33b_Rev	5'- CTGGGGGTGGCAGGCAGGG

PCR primerek splicing mutáns intron/miRNS kontrollok amplifikációjához (EGFP kódoló régióba ligáláshoz)	
mulgCe3i_5'sm-For	5'- CCGAGTACAGGAGGTGGAGAGT
mir-33b_5'sm_For	5'-TGGAGGGGTGGGGTCAGGGG

s: szensz
as: antiszensz
sm: splicing mutáns

mir-1233 shRNS oligók (psiSTRIKE vektorba ligáláshoz)	
1233shRNS_s	5'- ACCGGAGCCCTGTCCTCCCGCAGCTTCTGTCACTGCGGGAGGACAGGGCTCTTTTC
1233shRNS_as	5'- TGCAGAAAAAGAGCCCTGTCCTCCCGCAGTGACAGGAAGCTGCGGGAGGACAGGGCTC

mirtron oligók (EGFP kódoló régiójába ligáláshoz)	
mir877s	5'- GTAGAGGAGATGGCGCAGGGGACACGGGCAAAGACTTGGGGTTCCTGGGACCCTCAGACGTGTGTCCTTCTCCCTCCTCCCAG
mir877as	5'- CTGGGAGGAGGGAGAAGAGGACACACGTCTGAGGGTCCCAGGAACCCCCAAGTCTTTGCCCGTGTCCCCTGCGCCATCTCCTCTAC
mir1226s	5'- GTGAGGGCATGCAGGCCTGGATGGGGCAGCTGGGATGGTCCAAAAGGGTGGCCTCACCAGCCCTGTGTTCCCTAG
mir1226as	5'- CTAGGGAACACAGGGCTGGTGGAGGCCACCCTTTTGGACCATCCCAGCTGCCCCATCCAGGCCTGCA TGCCCTCAC
mir1233s	5'- GTGAGTGGGAGGCCAGGGCACGGCAGGGGGAGCTGCAGGGCTATGGGAGGGGGCCCCAGCGTCTGAGCCCTGTCTCCCGCAG
mir1233as	5'- CTGCGGGAGGACAGGGCTCAGACGCTGGGGCCCCCTCCCATAGCCCTGCAGCTCCCCCTGCCGTGCCCTGGCCTCCCACTCAC
mir1003s	5'- GTGGGTATCTGGATGTGGTTGGCTCTGGCGGTCTCTCACATTTACATATTCACAG
mir1003as	5'- CTGTGAATATGTAATGTGAGAGGACCGCCAGAGCCAACCACATCCAGATACCCAC

splicing mutáns mirtron oligók (EGFP kódoló régióba ligáláshoz)	
mir877sm_s	5'- TGAGAGGAGATGGCGCAGGGGACACGGGCAAAGACTTGGGGTTCCTGGGACCCTCAGACGTGTGTCCTTCTCCCTCCTCCCAG
mir877sm_as	5'- CTGGGAGGAGGGAGAAGAGGACACACGTCTGAGGGTCCCAGGAACCCCCAAGTCTTTGCCCGTGTCCCCTGCGCCATCTCCTCTCA
mir1226sm_s	5'- TGGAGGGCATGCAGGCCTGGATGGGGCAGCTGGGATGGTCCAAAAGGGTGGCCTCACCAGCCCTGTGTTCCCTAG
mir1226sm_as	5'- CTAGGGAACACAGGGCTGGTGGAGGCCACCCTTTTGGACCATCCCAGCTGCCCCATCCAGGCCTGCATGCCCTCCA
mir1233sm_s	5'- TGGAGTGGGAGGCCAGGGCACGGCAGGGGGAGCTGCAGGGCTATGGGAGGGGGCCCCAGCGTCTGAGCCCTGTCTCCCGCAG
mir1233sm_as	5'- CTGCGGGAGGACAGGGCTCAGACGCTGGGGCCCCCTCCCATAGCCCTGCAGCTCCCCCTGCCGTGCCCTGGCCTCCCACTCCA

12.2. Luciferáz szenzor oligonukleotidok

luciferáz szenzorok I. (sensor=szenzor; msensor= mutáns szenzor; s= szensz; as=antiszensz)	
mir-877_5'sensor_s	5'- TCGAGCCCCTGCGCCATCTCCTCTACAATCACCCCCTGCGCCATCTCCTCTACGC
mir-877_5'sensor_as	5'- GGCCGCGTAGAGGAGATGGCGCAGGGGGTGATTGTAGAGGAGATGGCGCAGGGGC
mir-877_5'msensor_s	5'- TCGAGCCCCTGCGCCATCTCGTGTTCAATCACCCCCTGCGCCATCTCGTGTTTCGC
mir-877_5'msensor_as	5'- GGCCGCGAACACGAGATGGCGCAGGGGGTGATTGAACACGAGATGGCGCAGGGGC
mir-877_3'sensor_s	5'-TCGAGCTGGGAGGAGGGAGAAGAGGACACAATCACCTGGGAGGAGGGAGAAGAGGACACGC
mir-877_3'sensor_as	5'-GGCCGCGTGTCTCTTCTCCCTCCTCCCAGGTGATTGTGTCTCTTCTCCCTCCTCCCAGC
mir-877_3'msensor_s	5'-TCGAGCTGGGAGGAGGGAGAACACGTCTCAATCACCTGGGAGGAGGGAGAACACGTCTCGC
mir-877_3'msensor_as	5'-GGCCGCGAGACGTGTTCTCCCTCCTCCCAGGTGATTGAGACGTGTTCTCCCTCCTCCCAGC
mir-1226_3'sensor_s	5'- TCGAGCTAGGGAACACAGGGCTGGTCAAATCACCTAGGGAACACAGGGCTGGTGAGC
mir-1226_3'sensor_as	5'- GGCCGCTCACCAGCCCTGTGTTCCCTAGGTGATTTACCAGCCCTGTGTTCCCTAGC
mir-1226_3'msensor_s	5'- TCGAGCTAGGGAACACAGGGGTGCTCAAATCACCTAGGGAACACAGGGGTGCTCAGC
mir-1226_3'msensor_as	5'- GGCCGCTGAGCACCCCTGTGTTCCCTAGGTGATTTGAGCACCCCTGTGTTCCCTAGC
mir-1226_5'sensor_s	5'-TCGAGCCCCATCCAGGCCTGCATGCCCTCACAATCACCCCCATCCAGGCCTGCATGCCCTCACGC
mir-1226_5'sensor_as	5'- GGCCGCGTGAGGGCATGCAGGCCTGGATGGGGGTGATTGTGAGGGCATGCAGGCCTGGATGGGGC
mir-1226_5'msensor_s	5'- TCGAGCCCCATCCAGGCCTGCATGGCGTGACAATCACCCCCATCCAGGCCTGCATGGCGTGACGC
mir-1226_5'msensor_as	5'- GGCCGCGTCACGCCATGCAGGCCTGGATGGGGGTGATTGTACGCCATGCAGGCCTGGATGGGGC
mir-1233_3'sensor_s	5'- TCGAGCTGCGGGAGGACAGGGCTCAAATCACCTGCGGGAGGACAGGGCTCAGC
mir-1233_3'sensor_as	5'- GGCCGCTGAGCCCTGTCCTCCCGCAGGTGATTTGAGCCCTGTCCTCCCGCAGC
mir-1233_3'msensor_s	5'- TCGAGCTGCGGGAGGACAGCGGTCAAATCACCTGCGGGAGGACAGCGGTGAGC
mir-1233_3'msensor_as	5'- GGCCGCTCACCGCTGTCCTCCCGCAGGTGATTTACCAGCTGTCCTCCCGCAGC

Luciferáz szenzorok II. (sensor=szenzor; msensor= mutáns szenzor; a= szenz; as=antiszenz)	
mir-1233_5'sensor_s	5'-TCGAGCCCCCTGCCGTGCCCTGCCCTCCCACTACAATCACCCCCCTGCCGTGCCCTGGCC TCCCACTCACGC
mir-1233_5'sensor_as	5'- GGCCGCGTGAGTGGGAGGCCAGGGCACGGCAGGGGGGTGATTGTGAGTGGGAGGCCAGGGC ACGGCAGGGGGC
mir-1233_5'msensor_s	5'- TCGAGCCCCCTGCCGTGCCCTGCCGTGCCGTGCGAGTGACAATCACCCCCCTGCCGTGCCCTGCCGTG CGAGTGACGC
mir- 1233_5'msensor_as	5'- GGCCGCGTCACTCGCACGGCAGGGCACGGCAGGGGGGTGATTGTCACTCGCACGGCAGGGCAC GGCAGGGGGC
mir-1003sensor_s	5'- TCGAGCTGTGAATATGTAAATGTGAGAAATCACCTGTGAATATGTAAATGTGAGAGC
mir-1003sensor_as	5'- GGCCGCTCTCACATTTACATATTCACAGGTGATTTCTCACATTTACATATTCACAGC
mir-1003msensor_s	5'- TCGAGCTGTGAATATGTAAATCTCACAATCACCTGTGAATATGTAAATCTCACAGC
mir-1003msensor_as	5'- GGCCGCTGTGAGATTTACATATTCACAGGTGATTTGTGAGATTTACATATTCACAGC
mir-328sensor_s	5'- TCGAGACGGAAGGGCAGAGAGGGCCAGAATCACACGGAAGGGCAGAGAGGGCCAGGC
mir-328sensor_as	5'- GGCCGCTTCCGTGTGATTCTGGCCCTCTCTGCCCTTCCGTC
mir-328msensor_s	5'- TCGAGACGGAAGGGCAGAGACGCCGTGAATCACACGGAAGGGCAGAGACGCCGTGCC
mir-328msensor_as	5'- GGCCGCCACGGCGTCTCTGCCCTTCCGTGTGATTCACGGCGTCTCTGCCCTTCCGTC
mir-33b_sensor_s	5'- TCGAGGCAATGCAACAGCAATGCACAATCACGCAATGCAACAGCAATGCACGC
mir-33b_sensor_as	5'- GGCCGCGTGCAATTGCTGTTGCATTGCGTGATTGTGCAATTGCTGTTGCATTGCC
mir-33b_msensor_s	5'- TCGAGGCAATGCAACAGCATTCTCAATCACGCAATGCAACAGCATTCTCGC
mir-33b_msensor_as	5'- GGCCGCGAGGAATGCTGTTGCATTGCGTGATTGAGGAATGCTGTTGCATTGCC

12.3. Northern blot próbák

oligonukleotid próbák Northern blot-hoz	
U6 (DNS próba)	5'- CACGAATTTGCGTGTCATCCTT
mir-877_5'-kar (LNA próba)	5'- CCCTGCGCCATCTCCTCTAC
mir-1226_3'-kar (LNA próba)	5'- CTAGGGAACACAGGGCTGGTGA
mir-1233_3'-kar (LNA próba)	5'- CTGCGGGAGGACAGGGCTCA
mir-33b_5'-kar (LNA próba)	5'- GCAATGCAACAGCAATGCAC

12.4. Splicing predikciók

ie: exon-intron-exonikus konstrukciók splicing predikciói

SD: splice donor hely predikció

SA: splice akceptor hely predikció

humán: humán sejtekben történő splicing predikció

Drosophila: *Drosophila*-ban történő splicing predikció

heterológ környezet: splicing predikciók intronként beépítve az EGFP szekvenciába

5'intron: splicing predikciók az EGFP szekvenciába SmaI helyet beépítve létrehozott intron klónozási helyről (nem ez, hanem a 3' intron lett kiválasztva)

3'intron: splicing predikciók az EGFP szekvenciába PvuII helyet beépítve létrehozott intron klónozási helyről (ez a klónozási hely lett kiválasztva)

eredeti exon-környezet	klónozott fragmens mérete	SD/ SA (humán; <i>Drosophila</i>)
877eie	375bp	9.32 / 14.43
1226eie	319bp	11.56 / 5.95
1233eie	284bp	8.06 / 9.97
328eie(as)	358bp	-
1003eie	721bp	11.70 / 5.50 ; 13.80 / 4.22

heterológ környezet	méret// érett miRNS predikció	5'intron (EGFP+SmaI hely)	3'intron (EGFP+PvuII hely)
		SD/ SA (humán; <i>Drosophila</i>)	SD/ SA (humán; <i>Drosophila</i>)
egér Ig Ce gén intronja	82bp	9.46/ 7.58	13.38 / 6.95
mir-877	86nt// 5'-kARBól	-! / 12.68	9.46 / 12.43
mir1226	75nt// 3'-kARBól	4.0 / 5.33	11.56 / 5.08
mir1233	82nt// 3'-kARBól	9.46 / 8.97	13.38 / 8.72
mir-33b	96 (475)nt// 5'-kARBól	4.00 / 9.75	11.56 / 9.50
mir-1003	56nt//3'-kARBól	2.60 / 5.12; 4.56 / 3.48	11.28 / 4.88 13.80 / 4.47

12.5. FACS adatok

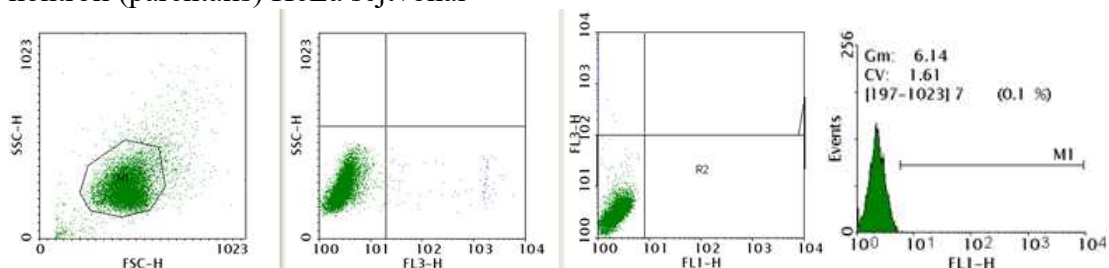
SSC-H: *forward scatter* (sejtek mérete)

FSC-H: *side scatter* (sejtek granuláltsága)

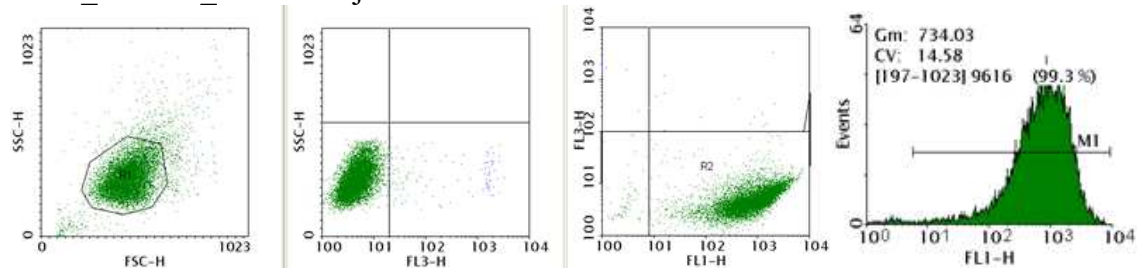
FL-3: itt: propidium jodid csatornája (halott sejtek kizárása)

FL-1: itt: EGFP csatornája (EGFP pozitív sejtek meghatározása)

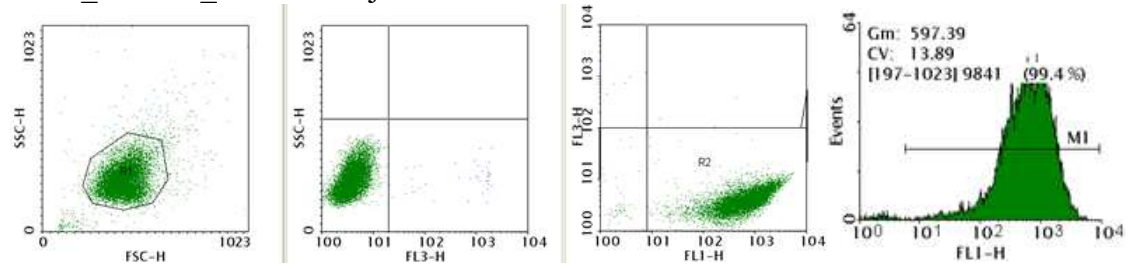
kontroll (parentális) HeLa sejt vonal



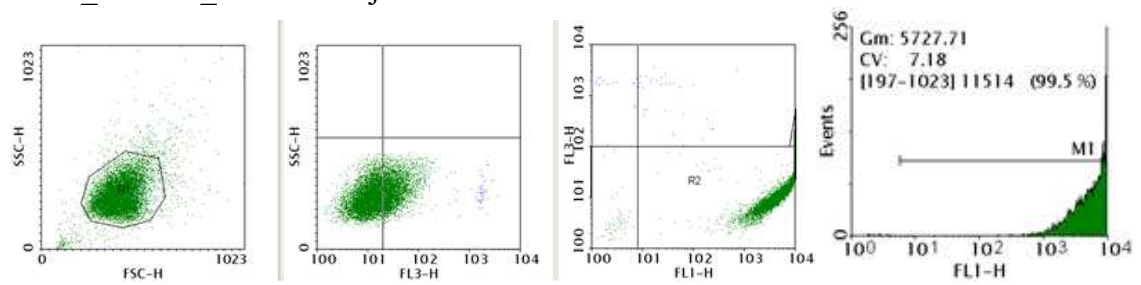
HeLa_EGFPm_mir-877 sejtvonal



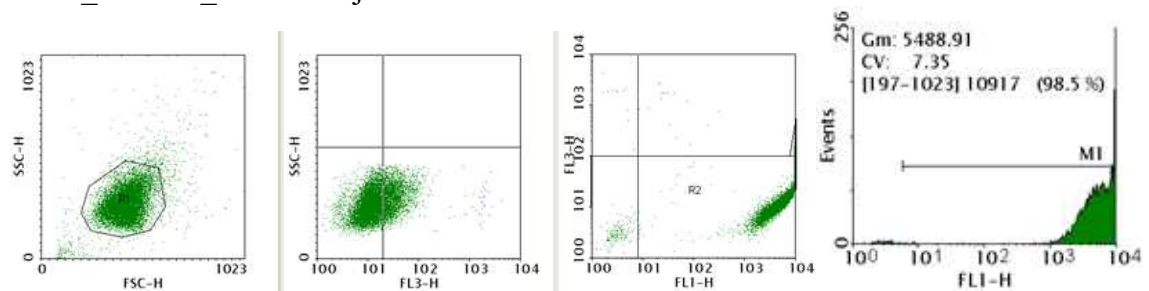
HeLa_EGFPm_mir-1226 sejtvonal



HeLa_EGFPm_mir-1233 sejtvonal



HeLa_EGFPm_mir-33b sejtvonal



HeLa_EGFPm_i (=egér intron) sejtvonal

