

# A mikroRNS-ek patogenetikai szerepe és expressziós mintázata praeeclampsiában

Doktori értekezés

**Biró Orsolya Brigitta**

Semmelweis Egyetem  
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Rigó János, MTA doktora, egyetemi tanár  
Dr. Nagy Bálint, MTA doktora, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Lampé Rudolf, Ph.D., egyetemi adjunktus  
Dr. Nagy Zoltán, Ph.D., klinikai orvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Igaz Péter, MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Csire Márta, Ph.D., laboratórium vezető  
Dr. Mayer Balázs, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Budapest  
2018

## Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke .....	4
<b>1. Bevezetés .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1. Praeclampsia .....</b>	<b>6</b>
1.1.1. Általános jellemzők .....	6
1.1.2. Anyai és magzati szövődmények .....	7
1.1.3. Kockázati tényezők .....	7
1.1.4. Patogenezis .....	7
1.1.5. Antiangiogén faktorok .....	10
1.1.6. Immunológiai faktorok .....	10
1.2. Extracelluláris vesiculák .....	11
1.3. miRNS-ek .....	13
1.3.1. Biogenezis és funkció .....	13
1.3.2. A mikroRNS-ek nevezéktana .....	14
1.3.3. Placentában expresszáldó miRNS-ek, szerepük praecclampsziában .....	15
1.3.4. Keringő miRNS-ek terhességben, jelentőségük biomarkerként .....	18
1.3.5. A <i>hsa-miR-210</i> „hypoxamir” szerepe praecclampsziában .....	22
2. Célkitűzések .....	23
3. Módszerek .....	24
3.1. Bioinformatikai analízis .....	24
3.1.1. miRNS-mRNS hálózat .....	24
3.1.2. Microarray adatok előfeldolgozása .....	25
3.1.3. miRNS-mRNS interakciós analízis .....	26
3.1.4. Hálózatépítés .....	27
3.1.5. Funkcionális elemzés .....	28
3.2. Laboratóriumi vizsgálatok .....	28
3.2.1. Vizsgálati alanyok .....	28
3.2.2. Mintagyűjtés és előkészítés .....	29
3.2.3. Sejttenyésztés és kezelés .....	30
3.2.4. Exoszóma izolálás .....	32
3.2.5. RNS/miRNS izolálás .....	35
3.2.6. Mennyiségi és minőségi kontroll .....	39
3.2.7. Valós idejű kvantitatív polimeráz lánreakció (RT-PCR) .....	40
3.2.8. Statisztika .....	44
4. Eredmények .....	46

4.1.	miRNS-mRNS hálózat .....	46
4.1.1.	miRNS és mRNS expressziós adatok feldolgozása .....	46
4.1.2.	A miRNS-mRNS interakciós hálózat felépítése .....	47
4.1.3.	A miRNS-mRNS hálózat elemeinek funkcionális vizsgálata .....	49
4.1.4.	miRNS szabályozott fehérje-fehérje interakciós hálózatok .....	53
4.2.	Az exoszómális össz-miRNS koncentráció és a <i>hsa-miR-210</i> expressziós profilja különböző típusú terhességi magas vérnyomásos kórképekben .....	56
4.2.1.	Össz-miRNS koncentráció .....	56
4.2.2.	Exoszómális <i>hsa-miR-210</i> expresszió .....	57
4.3.	Exoszómális és Ago-kötött <i>hsa-miR-210</i> szekréció praeeclampsziában .....	60
4.3.1.	<i>hsa-miR-210</i> expressziós profil placentában és különböző plazma frakciókban .....	60
4.3.2.	A <i>hsa-miR-210</i> hypoxia-indukált intracelluláris expressziója és szekréciója trophoblast sejtkultúrákban .....	66
5.	Megbeszélés .....	70
6.	Következtetések .....	79
7.	Összefoglalás .....	81
8.	Summary .....	82
9.	Irodalomjegyzék .....	83
10.	Saját publikációk jegyzéke .....	98
10.1.	Az értekezés témájában megjelent közlemények .....	98
10.2.	A tudományos munkásságot megalapozó egyéb közlemények .....	98
10.3.	Tudományos közlemények összesítése .....	99
11.	Köszönetnyilvánítás .....	100

## Rövidítések jegyzéke

Ago: argonaute protein

ANOVA: analysis of variance

C14MC: chromosome 14 microRNA cluster

C19MC: chromosome 19 microRNA cluster

cDNS: complementary DNS

CHT: chronicus hypertonia

DFO: desferrioxamine

DMSO: dimethylsulfoxide

eNOS: endothelialis nitrogén-monoxid szintáz

EVT: extravillosus trophoblast

FBS: fetal bovine serum

FDR: false discovery rate

FC: fold-change

FPR: false-positive rate

GEO: gene expression omnibus

GHT: gestatio hypertonia

GO: gene ontology

HELLP: hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count

HPRD: human protein reference database

HRE: hypoxia reszponzív elem

HUVEC: human umbilical vein endothelial cells

IUGR: intrauterin growth restriction

LNA: locked nucleic acid

miRISC: miRNA-induced silencing complex

miRNS: mikroRNS

mPE: enyhe (mild) praeclampsia

N: normotenzív

PBS: phosphate-buffered saline

PE: praeclampsia

PLAP: placental alkaline phosphatase

PFP: vérlemezkementes plazma

PlGF: placentáris növekedési faktor  
pre-miRNS: prekursor miRNS  
pri-miRNS: primer miRNS  
RMA: robust multi-array analysis  
RT-PCR: real-time polymerase chain reaction  
RQ: relative quantity  
SD: standard deviation  
SE: standard error  
sEng: szolubilis endoglin  
sFlt-1: szolubilis fms-szerű tirozin kináz-1  
SpA: spirális artéria  
sPE: súlyos (severe) praeclampsia  
STB: syncytiotrophoblast  
TGF- $\beta$ : transzformáló növekedési faktor  $\beta$   
UC: ultracentrifugálás  
UTR: nem transzlálódó régió  
VEGF: vaszkuláris endothelialis növekedési faktor  
VT: villosus trophoblast

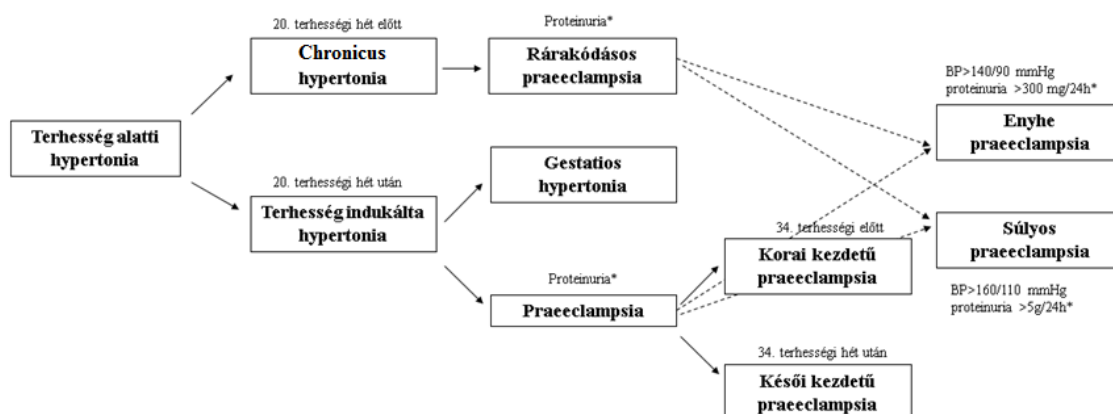
## 1. Bevezetés

### 1.1. Praeclampsia

#### 1.1.1. Általános jellemzők

A magas vérnyomás az egyik leggyakrabban előforduló terhességi komplikáció, a megjelenés ideje és formája alapján több alcsoportot alkothatunk (Tranquilli és mtsai 2014) (1. ábra). A chronicus hypertonia esetében a vérnyomás már a terhességet megelőzően meghaladja a 140/90 mmHg-t, vagy a terhesség első húsz hetében jelentkezik. Gestatios hypertoniának nevezzük a 20. terhességi hét után fellépő magas vérnyomásos állapotot, ahol a praeclampsia jellemező egyéb tünetek nem jelennek meg, és a vérnyomás a szülést követően normalizálódik.

A praeclampsia több szervrendszert érintő elváltozás, mely 3-8% terhességet érint világszerte (Duley 2009). A betegséget a terhesség 20. hete után jelentkező magas vérnyomás és proteinuria definiálja. Fehérjevizelés hiányában a diagnózis egyéb anyai szervi zavarok, mint például trombocytopenia, májfunkciók károsodása, veseelégtelenség, tüdőödéma és korábban nem tapasztalt agyi vagy látási zavarok megléte alapján is felállítható (Tranquilli és mtsai 2014). Chronicus hypertoniában szenvedő nők 20-25%-ánál úgynevezett ráarakódásos praeclampsia alakul ki. HELLP-szindróma (vörösvértestek szétesése, emelkedett májenzimek és alacsony vérlemezkesszám) a praeclampsias esetek 10–20%-ában jelentkezik, az anyai halálozás akár a 20%-ot is elérheti. Az eclampsia a praeclampsia szövődményeként tekinthető, grand mal rohamokkal és eszméletvesztéssel járó életveszélyes állapot. A súlyos praeclampsias esetek körülbelül 5%-ában alakul ki.



1. ábra. Terhesség alatti hypertonia fajtái (\*: és/vagy egyéb anyai szervi zavarok)

### **1.1.2. Anyai és magzati szövődmények**

A praeclampsia az anyai és magzati/perinatális morbiditás és mortalitás egyik vezető okténevezője világszerte, súlyos szövődményekkel jár a terhesség alatt és hosszútávon is. A leggyakoribb anyai szövődmény a vesefunkció beszűkülése, amely 65%-os gyakorisággal fordul elő ráakódásos praeclampsziával érintett terhességekben. Emellett jelentkezhethet még korai lepényleválás, disszeminált intravaszkuláris koaguláció, HELLP-szindróma, tüdőödéma/aspiráció, eclampsia, májelégtelenség, májhematóma és agyvérzés. A praeclampsia fokozott rizikót jelent továbbá a későbbi szív- és érrendszeri betegségek kialakulására (Craici és mtsai 2008). Az esetek számottevő része társul intrauterin növekedési retardációval (IUGR), illetve gyakran végződik koraszüléssel (Raymond és Peterson 2011). A magzatnál súlyosabb esetekben neurológiai károsodás és perinatális halálozás is bekövetkezhethet.

### **1.1.3. Kockázati tényezők**

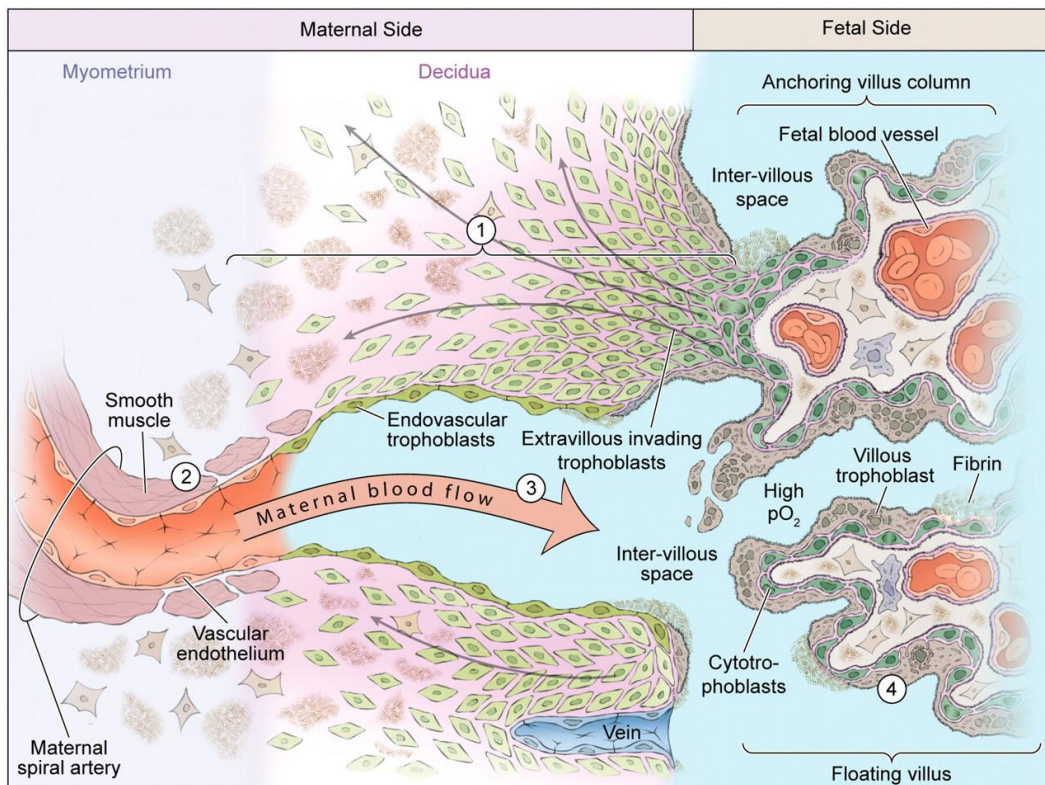
A praeclampsia kialakulására magas kockázatot jelent a chronicus hypertonia és vesebetegség, kórelőzményben szereplő gestatos hypertonia, diabetes mellitus, autoimmunitás; közepes kockázattal bír a 40 év feletti anyai életkor, primiparitás, többes terhesség, molaterhesség, utolsó terhesség óta eltelt több mint 10 év, elhízás, családi anamnézisben praeclampsia (American College of Obstetricians and Gynecologists & Task Force on Hypertension in Pregnancy 2013).

### **1.1.4. Patogenezis**

A praeclampsia terhességre specifikus, multiszisztémás kórkép, amelynek kórellettani változásai már jóval a klinikai tünetek megjelenését megelőzően végbemennek („preklinikai fázis”). A betegség kialakulásának oka a mai napig vitatott, az általánosan elfogadott kétlépcsős modell szerint a klinikai tünetegyüttes a placenta perfúziós zavarának következménye (Alasztics és mtsai 2012).

Élettani terhességben a decidua spirális artériái (SpA) alacsony ellenállású, nagy kapacitású erekké alakulnak át az első trimeszter során, ez az úgynevezett SpA remodelling folyamata. Az első 8 hétben az extravillosus cytotrophoblast sejtek a

deciduába nyomulva dugót képeznek a SpA-ák disztális végén. A 9. hét után a trophoblastok intravaszkuláris migrációjának köszönhetően a dugók feloldódnak, lehetővé téve az anyai vér intervillózus térbe való áramlását. A megnövekedett oxigénellátás következtében felgyorsul a trophoblast proliferáció és differenciáció, a cytotrophoblastok endovaszkuláris trophoblastokká alakulnak és átveszik az endothelsejtek helyét. A terhesség 20. hetéig az érfalak simaizomrétege feloldódik és végbemegy a SpA remodelling, ami a placentáris vérátáramlás növekedését eredményezi (2. ábra).



**2. ábra.** A placenta fejlődése élettani terhességben (Kingdom és Drewlo 2011)

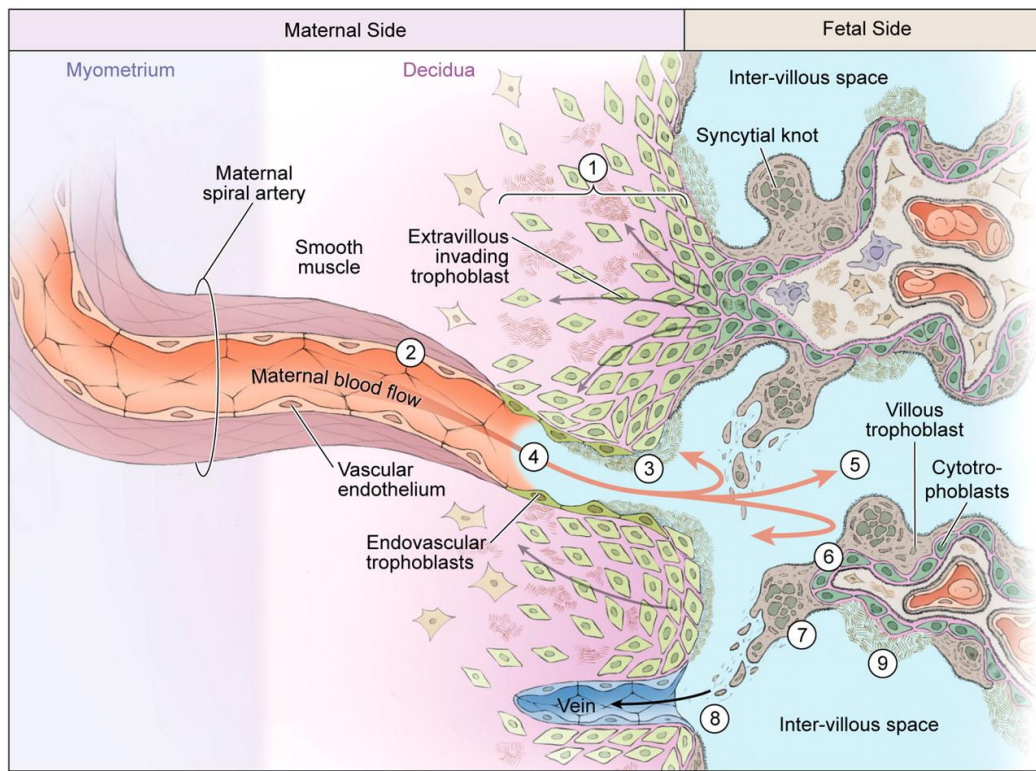
Praeclamsziában az utóbbi többlépcsős folyamat zavart szenved és oxidatív stressz lép fel. Az elégtelen vérkeringéssel rendelkező, hipoperfundált placentából különböző káros anyagok (antiangiogén faktorok, proinflammatorikus mediátorok és extracelluláris vezikulák) szekretálódnak az anyai vérkeringésbe (Alasztics és mtsai 2014; Escudero és mtsai 2016) (3. ábra). Az anyában ennek hatására több szervrendszert érintő elváltozások alakulnak ki, melyeket endothel diszfunkció, szisztémás gyulladás és az immunrendszer egyensúlyának felborulása jellemez („klinikai fázis”) (Alasztics és mtsai 2012). A tünetek



proteinuria, hypertonia, ödéma, thrombophilia, májfunkciós eltérések és különböző neurológiai zavarok formájában jelentkezhetnek.

A klinikai megjelenés idejétől függően korai és késői kezdetű formákat különíthetünk el. A korai praeclampsia esetében a tünetek terhesség 34. hete előtt jelentkeznek, melyeket az elégtelen trophoblast invázió és spirális artéria remodelling vált ki (Raymond és Peterson 2011). A késői kezdetű praeclampsia a 34. terhességi hét után jelenik meg, körülbelül tízszer gyakoribb és általában kevésbé súlyos, mint a korai forma. Az utóbbi időkben azt feltételezik, hogy ebben az esetben a placenta a terhesség előrehaladtával meghaladja a méh és az érrendszer kapacitását, ami csökkent perfúzióhoz és fokozott hypoxia kialakulásához vezet (Redman 2017).

A placenta perfúziós zavara gyakran csak anyai kockázati tényezők együttes jelenlétében okoz kóros elváltozásokat, továbbá különböző anyai hajlamosító kórképek (pl. chronicus hypertonia, diabetes, autoimmun betegség) is hozzájárulhatnak a hipoperfundált placenta létrejöttéhez. A praeclampsia két formája nem minden esetben különíthető el egymástól, gyakran kevert formában jelentkeznek, mely legtöbbször súlyos tünetekkel társul.



**3. ábra.** A placenta kóros fejlődése praeclampszában (Kingdom és Drewlo 2011)

### 1.1.5. Antiangiogén faktorok

A lepényi elhúzódó hypoxia fokozza az antiangiogén szolubilis fms-szerű tirozin kináz-1 (sFlt-1) és a szolubilis endoglin (sEng) szöveti expresszióját. Hatásukat részben az endothelialis nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) vaszkuláris endothelialis növekedési faktor A (VEGF-A), placentáris növekedési faktor (PlGF) és transzformáló növekedési faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) által indukált aktiváció gátlásán keresztül fejti ki.

Az Flt-1 a VEGF-A és a PlGF endothelialis receptora, melynek szolubilis szabadon előforduló formája az Flt-1 transzkriptumból alternatív splicing révén jön létre. Az sFlt-1 megköti a keringésben található angiogén VEGF-A és PlGF fehérjéket, ezáltal antiangiogén hatást vált ki. A praeclampsia jellemező fokozott lepényi Flt-1 expresszió az anyai szérum sFlt-1-szint emelkedését eredményezi, mely a szabad VEGF-A és PlGF koncentráció csökkenésével társul. Számos tanulmány igazolta az sFlt1/PlGF arány meghatározásának hatékonyságát a terhesség második és harmadik trimeszterében végzett szűrésenként (Young és Karumanchi 2016). Különböző vér-alapú biomarkerek és ultrahang vizsgálatok (PAPP-A, PlGF, anyai artériás nyomás és arteria uterina pulzatilitási index) kombinációjával 93%-os detekciós ráta érhető el korai kezdetű- és 61% késői kezdetű praeclampsia esetén 5%-os fals pozitív rátával (FPR) (Poon és Nicolaides 2014). Mivel azonban az esetek többsége a terhesség 37. hete után jelentkezik, sürgősen további biomarkerekre van szükség.

A másik legtöbbször vizsgált antiangiogén hatású molekula a szolubilis endoglin (sEng), amely a kóros méhlepényből a keringésbe jutva megköti és gátolja az angiogén TGF- $\beta$ -t. Praeclampsia esetén a sEng vérben mért szintje már a kórkép klinikai tüneteinek megjelenése előtt megemelkedik, és az emelkedés aránya egyenesen arányos a betegség súlyosságával (Levine és mtsai 2006).

### 1.1.6. Immunológiai faktorok

A betegség kórélettanában az immunológiai folyamatok is meghatározó szereppel bírnak, melyre számos epidemiológiai adat utal. Az anya szervezete immuntoleranciát biztosít a placenta és az embrió által prezentált „idegen” antigének részére, mely lehetővé teszi a terhesség fennállását. A primiparitás koncepció szerint a praeclampsia gyakrabban fordul elő első szülő nők körében, azonban a multiparitás protektív hatása

nem érvényesül, ha a terhesség új partnertől fogant (Li és Wi 2000). Az apai antigéneknek a fogamzás előtt hosszabb időtartamig kitett anyai szervezetben erősebb immuntolerancia alakul ki a magzat és a placenta iránt (Klonoff-Cohen és mtsai 1989). A praeclampsia incidenciája magasabb bizonyos asszisztált reprodukciós eljárások, úgymint a donor inseminatio, petesejt-, illetve embryodonatio esetében (Salha és mtsai 1999). Az utóbbi módszer alkalmazásakor az előfordulás gyakorisága kifejezetten megnő, mely azzal magyarázható, hogy a magzat komplett allograft és a fogamzást spermaexpozíció nem előzi meg a biológiai apával. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az anyai-magzati immunológiai maladaptáció fontos szerepet játszhat a praeclampsia kialakulásában.

## 1.2. Extracelluláris vesiculák

Az extracelluláris vesiculák sejt-eredetű kettős foszfolipid membránnal határolt struktúrák. Különböző tulajdonságaik alapján (méret, keletkezési mód és fehérjetartalom) alapján több alcsoportba oszthatók: exoszómák, mikrovezikulák és apoptotikus testek (1. táblázat).

### 1. táblázat. Extracelluláris vesiculák tulajdonságai

Extracelluláris vesicula típusa	Keletkezés	Méret	Markerek	Tartalom	Funkció
Exoszómák	Exocitózis a multivezikuláris testből	30-100 nm	Alix, Tsg101, tetraspaninok (CD81, CD63, CD9), flotilin	fehérjék, lipidek, mRNS, ncRNS	Intracelluláris kommunikáció
Mikrovezikulák	Plazmamembrán lefűződés	100-1000 nm	Foszfatidilszerin, integrinek, szelektin, CD40	fehérjék, lipidek, mRNS, ncRNS	Intracelluláris kommunikáció
Apoptotikus testek	Programozott sejthalál / apoptózis	1000-5000 nm	Annexin V, Foszfatidilszerin	nukleáris frakciók, sejtszervecskék, fehérjék, mRNS, ncRNS, DNS	Phagocytosis elősegítése

A vesiculák sejtbiológiai és élettani funkciói igen sokrétűek, ezek közé tartozik többek között az antigén prezentálás, immunmoduláló hatás és sejt-sejt kommunikáció. Termelődésük majdnem minden sejttypusban megfigyelhető, a különböző szövetekben egyszerre többféle vesiculum populáció is jelen lehet, melyek összetétele időben és térben

változhat (Raposo és Stoorvogel 2013). Vizsgálatukkal információt nyerhetünk a forrás sejtben játszódó folyamatokról, melynek köszönhetően számos betegségben potenciális diagnosztikai, prognosztikai és terápiás szereppel is bírhatnak.

Az exoszómák a legkisebb mérettartományú, legjobban jellemzett extracelluláris vesicula populáció (40-120 nm). Endoszómális eredetűek, a multivesiculáris testek konstitutív vagy indukált exocitózisával ürülnek a sejten kívüli térbe (Colombo és mtsai 2014). Tartalmuk a forrás sejttypusoktól és funkciójuktól függően elég változatos, megtalálhatóak bennük többek között kódoló- és nem kódoló RNS-ek, illetve különböző típusú fehérje molekulák. A sejtekből való szekréciót követően modulálhatják a szomszédos sejtek aktivitását, vagy a szervezeten belül távoli pontokra jutva, nem-hormonális módon képesek intercelluláris kommunikációra (Turchinovich és mtsai 2013). Különböző módon képesek befolyásolni a célsejtek működését, például receptorkötődést követően intracelluláris szignáltranszdukciós kaszkádokat aktiválhatnak, vagy szabályozó molekuláik internalizációja révén befolyásolhatják a génextpressziót. A különféle sejttypusokból származó exoszómák fehérjéinek összetétele nagy részben megegyezik, univerzális endoszómális fehérje markerek (például CD63, CD81 és TSG101) kimutatásával azonosíthatóak (Kowal és mtsai 2016). A placentából felszabaduló exoszómák specifikus, placenta alkalikus foszfatáz protein (PLAP) marker alkalmazásával különíthetőek el (Salomon és mtsai 2014a). Élettani terhesség esetén a trophoblast-eredetű exoszómák a 6. gesztációs héttől mutathatók ki az anyai keringésben (Salomon és mtsai 2014a). Mivel az intervillusos keringés egészen a 10. terhességi hétig nem alakul ki teljesen, ezek többsége feltehetően az extravillusos trophoblastrétegből (EVT) származik. A vesiculák száma a terhesség folyamán fokozatosan növekszik, majd szülés után 48 órán belül eliminálódnak a vérkeringésből (Salomon és mtsai 2014a).

Az elmúlt évtizedben több olyan kutatást végeztek, amelyben in vitro kísérletekkel tanulmányozták a placenta-eredetű vesiculák hatását különböző célsejteken (Göhner és mtsai 2017; Salomon és mtsai 2013a, 2013b, 2014b; Truong és mtsai 2017). Bizonyítást nyert, hogy képesek szabályozni a környező sejtek aktivitását, mely szerepet játszhat az élettani terhesség kialakulásában és fenntartásában. Azonban, kóros folyamatok révén megváltozhat a vesiculák száma és összetétele, ami különböző terhességi kórképek kialakulásához vezethet. A placenta által kibocsátott exoszómák szintje és azok tartalma információt nyújtanak a terhesség lefolyásáról, ezáltal biomarkerként szolgálhatnak

különböző kórképek kimutatására. Praeclampsziában a placenta diszfunkció a trophoblast-eredetű vesiculák rendellenes szekrécióját okozza, ami által megváltozik az exoszómális faktorok, köztük a mikroRNS-ek (miRNS) szintje is az anyai keringésben (Escudero és mtsai 2016). Ennek következtében a betegségre jellemző, több szervrendszert érintő elváltozások alakulhatnak ki az anyában. Több tanulmány számolt be a miRNS-ek megváltozott expressziójáról praecclampsziában (Bounds és mtsai 2017; Murphy és mtsai 2017; Salomon és mtsai 2017; Sheikh és mtsai 2016) és egyéb terhességi kórképekben (Nothnick 2017; Poirier és mtsai 2017).

### **1.3. miRNS-ek**

#### **1.3.1. Biogenezis és funkció**

A miRNS-ek rövid (15-23 nukleotid), egyszálú nem kódoló RNS molekulák, melyek fontos szerepet játszanak az eukarióta gének posztttranszkripciós szabályozásában (Butz és Patócs 2015). A miRBase adatbázisban 1881 humán miRNS prekursor és 2588 érett miRNS található. A miRNS-eket kódoló gének a genom intra- és intergénikus régióiban találhatóak. A legtöbb esetben a fehérjét kódoló gének intronikus szakaszain lokalizálódnak, amelyek a transzkripció során kivágódnak az mRNS előalakból. A miRNS-eket kódoló gének kisebb része önálló transzkripciós egységként működik, ezek a genom nem kódoló, intergénikus régióiban találhatóak (Yates és mtsai 2013).

A miRNS-ek prekursor alakja az mRNS-ektől eltérően kettős szálú, többlépéses érési folyamat során válnak egyszálúvá. Transzkripciójában a II-es típusú RNS polimeráz vesz részt, amely először egy úgynevezett „hajtűprekuzort” hoz létre, a primer miRNS-t (pri-miRNS). A pri-miRNS-t, amely kódolhat egyetlen miRNS-t, vagy akár egy miRNS klasztert is, még a sejtmagon belül a Drosha-DGCR8 komplex hasítja el. A keletkező intermedier terméket pre-miRNS-nek nevezzük. Ezután a sejtmagból a citoplazmába jutva a Dicer-TRBP komplex eltávolítja róla a terminális hurkot, egy 20-24 nukleotid hosszúságú kettős szálát eredményezve. A duplex ezután egy Argonauta (Ago) fehérjével kapcsolódik, majd a cél-mRNS-sel komplementer szál („guide strand”) kiválasztódásával létrejön az effektor funkciót ellátó miRISC (miRNA-induced silencing complex) ribonukleoprotein-komplex. A másik szál („passenger strand”) a folyamat során kiválik a komplexből és degradálódik (Yates és mtsai 2013).

A miRNS-ek hatásukat negatív reguláció révén fejtik ki: az mRNS szekvenciák nem transzlálódó végéhez (3'UTR) kötődve gátolják annak transzlációját vagy teljes komplementaritás esetén degradálódást idéznek elő. A miRNS 5' vége tartalmazza az mRNS szekvenciával komplementer, 7 nukleotid hosszúságú úgynevezett „seed” régiót. Egy mRNS számos miRNS kötőhelyet tartalmazhat, és egy miRNS több mRNS célponttal is rendelkezhet, mely a génexpresszió finomhangolását teszi lehetővé (Filipowicz és mtsai 2008; Nagy és Igaz 2015). A miRNS-ek komplex szabályozási hálózatok részei, expressziós mintázataikra tér- és időbeli specificitás jellemző. Ugyanaz a miRNS különböző szövetekben eltérő módon fejeződik ki, más mRNS célpontokkal rendelkezhet, és ezáltal sokféle funkciót láthatnak el. Olyan alapvető élettani folyamatok irányításában vesznek részt, mint a sejtciklus, a proliferáció, a differenciáció és a sejthalál (Nagy és Igaz 2015).

### 1.3.2. A mikroRNS-ek nevezéktana

A különböző fajokban jelenlévő miRNS-eket a fajra utaló egyezményes rövidítéssel jelöljük (hsa-miR-: homo sapiens, cel-miR-: C. elegans stb.). Az eltérő szekvenciájú érett miRNS-eket a "miR" előtag után sorszámokkal adjuk meg. A let-7 miRNS család kitüntetett szerepű, mivel az elsőként felfedezett miRNS-ek között szerepel. C. elegansban a *let-7*-et kódoló gén mutációja halálos kimenetelűek, ezért kapta a "let" (lethal) előtagot. Az azonos szekvenciájú, azonban eltérő lókuszu miRNS-eket újabb sorszámozással különítjük el egymástól (például a *miR-1-1* a 20-as kromoszómán, a *miR-1-2* pedig a 18-as kromoszómán lokalizálódik). Az egy-két nukleotidban különböző miRNS-eket a számozás utáni betűkkel jelöljük (például *miR-30a*, *miR-30b*, *miR-30c* és *miR-30d*). A miRNS érési folyamat során a kettőszálú pre-miRNS-eknek általában csak az egyik szála lesz működőképes miRNS, de néha előfordul, hogy mindkettő (Choo és mtsai 2014). Kétféle jelölést alkalmazhatunk ezek elkülönítésére: a kevésbé domináns szálból képződő miRNS-t nevében csillaggal jelöljük, vagy annak megfelelően, hogy az eredeti pre-miRNS melyik száláról képződik, -3p, illetve -5p jelölésekkel látjuk el.

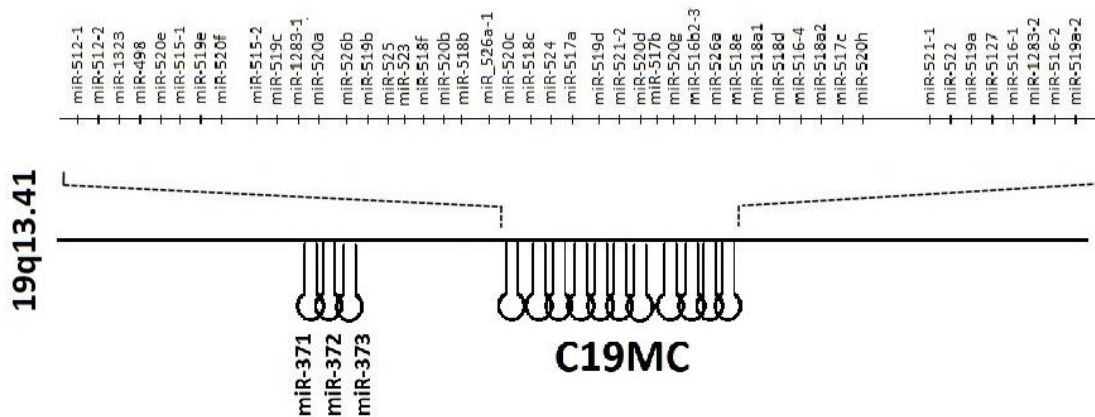
### 1.3.3. Placentában expresszáldó miRNS-ek, szerepük praeclampszában

Genomszintű vizsgálatok a placentában több száz miRNS-t azonosítottak (Mouillet és mtsai 2015), melyek egy része kizárólag a placentában, nagyobb hányaduk más szövetekben is kifejeződik. A terhesség folyamán betöltött funkciójuk a mai napig nem tisztázott, feltehetően részt vesznek a placentáció szabályozásában és szükségesek a terhesség zavartalan lefolyásához (Fu és mtsai 2013a).

A miRNS biogenezis kanonikus útvonalában szereplő valamennyi kulcsmolekula szintén megtalálható a placentában (Mouillet és mtsai 2011). Az Ago2 fehérjéről bebizonyították, hogy elengedhetetlen az egér embriogenezis korai stádiumaihoz (Lykke-Andersen és mtsai 2008), mutációja a placenta fejlődési zavarához és embrionális halálhoz vezet (Cheloufi és mtsai 2010). A placentában expresszáldó miRNS-ek az evolúció késői szakaszán jelentek meg, és kizárólag az emlős fajokra jellemzőek (Morales-Prieto és mtsai 2014). Legnagyobb számban a villosus trophoblast (VT) rétegben vannak jelen, és a terhesség különböző szakaszaiban eltérő módon fejeződnék ki (Bounds és mtsai 2017; Morales-Prieto és mtsai 2012). A miRNS-ek szerepet játszanak a placenta génjeinek dinamikus szabályozásában, élettani koncentrációjuk különböző szignál transzdukciós kaszkádok illetve környezeti faktorok (hypoxia, oxidatív stressz stb.) révén megváltozhat.

Léteznek úgynevezett placenta-specifikus miRNS-ek, melyek egyéb szövetekben élettani körülmények között nem expresszáldódnak: a 14-es és 19-es kromoszómán elhelyezkedő miRNS klaszterek (C14MC és C19MC), illetve a *miR-371-373* család. A C14MC 34 érett miRNS-t foglal magába, a méhlepényes emlősök között evolúciósan konzervált (Seitz és mtsai 2004). A C19MC 46 különböző miRNS hajtú szerkezetet tartalmaz, melyről 59 érett miRNS képződik, ezáltal a legnagyobb ismert miRNS klaszter, kizárólag főemlősökben található meg (4. ábra) (Bortolin-Cavaille és mtsai 2009). Mindkét klaszter genetikailag imprintált, ám a terhesség folyamán eltérő expressziós tendenciát mutatnak. A C14MC miRNS-ek az anyai allélről fejeződnék ki, szintjük az első trimeszterben a legmagasabb, majd a terhesség előrehaladtával fokozatosan lecsökken (Morales-Prieto és mtsai 2012). Ezzel szemben, a C19MC miRNS-ek esetében az apai allél aktív (Noguer-Dance és mtsai 2010), és expressziójuk korai aktivációt követően a gesztációs korról fokozódik (Morales-Prieto és mtsai 2012). Élettani

terhességben a növekvő tendencia az anyai vérkeringésben is mérhető (Dumont és mtsai 2017; Hromadnikova és mtsai 2012). A *miR-371-373* család szintén a 19-es kromoszómán helyezkedik el, terhességben betöltött funkciójáról azonban keveset tudunk (Schönleben és mtsai 2016). A jelen kutatások középpontjában a C19MC áll, mivel a placentában expresszálódó miRNS-ek nagy százalékát e klaszter tagjai teszik ki. Bebizonyosodott, hogy ezek a miRNS-ek elengedhetetlen funkciókat látnak el a terhesség folyamán, és kóros kifejeződésük feltehetően patogenetikai tényezőként jelölhető meg különböző terhességi kórképekben.



4. ábra. C19MC miRNS klaszter (Bíró és Rigó 2018)

A miRNS-ek rendellenes expressziója hozzájárulhat a praeclampsia kialakulásához, mivel befolyásolják a trophoblastsejtek invázióját, a SpA remodellinget, az angiogenezist illetve immunológiai szereppel is bírnak. A 2. táblázatban a betegséggel mindezidáig összefüggésbe hozott, ismert funkciójú és célpontú miRNS-ek listája látható. A proangiogén/antiangiogén faktorok egyensúlyának megbomlása jól ismert jelenség praeclampsiaiban. Placentában és trophoblast sejtvonalakban számos az angiogenezist befolyásolni képes miRNS-t (úgynevezett angiomiR-t) leírtak, úgy, mint a betegségben jelentősen megemelkedett *hsa-miR-155* és *hsa-miR-210*-et (Ishibashi és mtsai 2012; Lee és mtsai 2011; Li és mtsai 2014b). Sok miRNS-ről, köztük a *hsa-miR-17~92* család tagjairól, bebizonyosodott, hogy szabályozzák trophoblast sejtek proliferációját, migrációját (Kumar és mtsai 2013). Élettani terhességben az immunológiai folyamatok irányítását számos kis szabályozó RNS molekula végzi. Többek között a *hsa-miR-494*, a *hsa-miR-181a* és *hsa-miR-152* különböző immunsejtek funkcióját szabályozza, melyek felborulása a praeclampsia jellemező gyulladós reakciók kialakulásához vezethet (Liu és mtsai 2012; Zhao és mtsai 2016; Zhu és mtsai 2010).



**2. táblázat.** Praeeklampsia kialakulásával és kórlefolásával összefüggésbe hozott placentában expresszlódó miRNS-ek. ↑: emelkedés, ↓: csökkenés

Szabályozott funkció	miRNS-ek	Expresszió	Validált célpontok és útvonalak	Referencia
Angiogenezis	<i>hsa-miR-16</i> <i>hsa-miR-29b</i>	↑	VEGF-A, CCNE1	Wang és mtsai 2012
	<i>hsa-miR-494</i>	↑	CDK6/CYCD1	Chen és mtsai 2015
	<i>hsa-miR-17</i> <i>hsa-miR-20a</i> <i>hsa-miR-20b</i>	↑	Ephrin B2, B4	Wang és mtsai 2012
	<i>hsa-miR-155</i>	↑	CYR61 (→ VEGF↓)	Zhang és mtsai 2010
	<i>hsa-miR-21</i>	↓	AKT és ERK1/2 útvonalak	Liu és mtsai 2011
	<i>hsa-miR-210</i>	↑	EFNA3, HOXA9, HSD17B1	Ishibashi és mtsai 2012; Zhang és mtsai 2012
Trophoblast invázió	<i>hsa-miR-125b</i>	↑	S1PR	Li és mtsai 2014a
	<i>hsa-miR-34a</i>	↓	SERPINA3	Doridot és mtsai 2014
	<i>hsa-miR-210</i>	↑	KCMF-1	Luo és mtsai 2014
	<i>hsa-miR-155</i>	↑	CYCD1, eNOS	Dai és mtsai 2011; Li és mtsai 2014b
	<i>hsa-miR-378a</i> <i>hsa-miR-376c</i> <i>hsa-miR-21</i>	↓	ALK7, Nodal útvonal	Chaiwangyen és mtsai 2015; Fu és mtsai 2013b; Luo és mtsai 2012
	<i>hsa-miR-17~92</i>	↑	hGCM1, hCYP19A1	Kumar és mtsai 2013
Gyulladásos folyamatok	<i>hsa-miR-155</i>	↑	IRAKM, NKIRAS1, PTEN (→AP-1/NF-κB↑)	Xue és mtsai 2013
	<i>hsa-miR-494</i>	↑	PGE2	Zhao és mtsai 2016
	<i>hsa-miR-181a</i>	↑	TGFβ útvonal (TGFBR1, TGFBRAP1)	Liu és mtsai 2012
	<i>hsa-miR-152</i>	↑	HLA-G	Zhu és mtsai 2010
	<i>hsa-miR-210</i>	↑	STAT6/IL-4 útvonal	Kopriva és mtsai 2013
	<i>hsa-miR-125b</i>	↑	SGPL1 (→IL-8 ↑)	Yang és mtsai 2016

A C19MC miRNS-ek EVT-eredetű sejtvonalban történő expresszálatása (élettani körülmények között itt nem fejeződnek ki), a sejtek migrációs képességét csökkenti a proliferáció vagy apoptózis befolyásolása nélkül. Microarray technikával megerősítették, hogy a C19MC klaszter tagjai a sejtek mozgásával kapcsolatos transzkriptumokat szabályozzák (Xie és mtsai 2014). A *hsa-miR-517* család tagjai (*hsa-miR-517a*, *hsa-miR-517b*, *hsa-miR-517c*) praeclampsia esetén a placentában magasabb koncentrációban találhatóak meg, továbbá azt is bebizonyították, hogy hypoxia hatására indukálódnak és gátolják a trophoblast inváziót. Megemelkedett szintjük in vitro sejtmódelben a betegségben kulcsfontosságú szerepet játszó, antiangiogén sFlt-1 fehérje fokozott termelődéséhez vezet (Anton és mtsai 2015). Kimutatták, hogy a C19MC miRNS-eknek a virális fertőzések elleni védekezésben is szerepe van. A klaszter tagjai trophoblast-eredetű exoszómákba csomagolódnak, és a recipiens sejtekben autofágia indukálásával gátolják a vírus replikációt (Delorme-Axford és mtsai 2013; Mouillet és mtsai 2014).

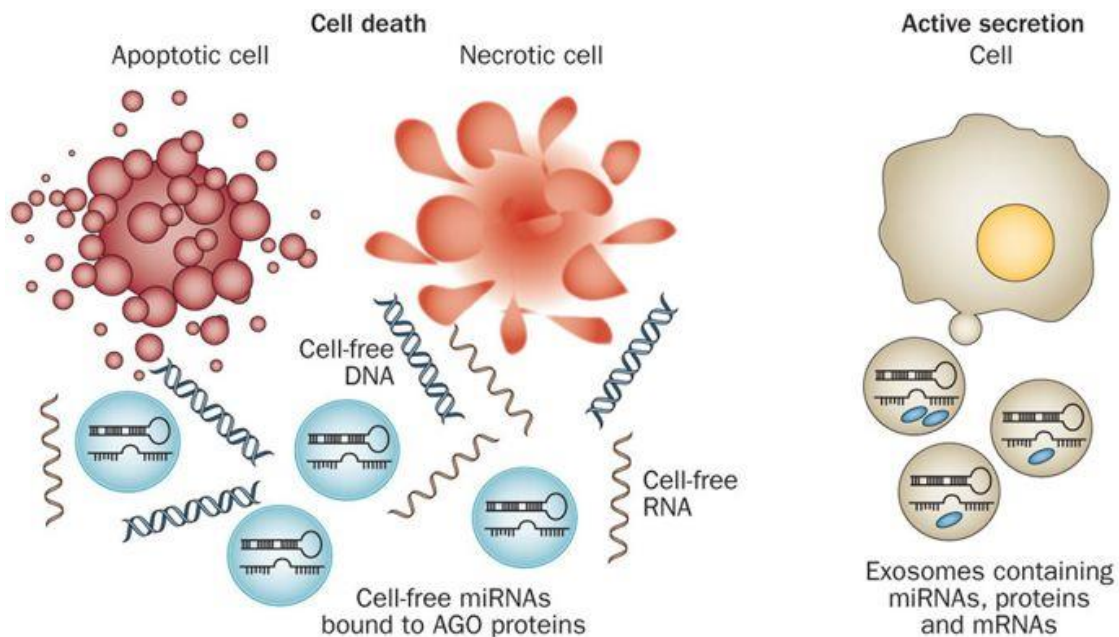
Összefoglalva elmondható, hogy a trophoblast sejtek szerteágazó funkciót látnak el, és hatásukat vesiculák révén közvetítik a placenta más részei illetve az anyai sejtek felé. A placentában expresszáldó miRNS-ek jelentős része, a syncytiotrophoblast (STB) rétegből aktív vagy passzív szekréció révén kijut az anyai véráramba (Escudero és mtsai 2016).

#### **1.3.4. Keringő miRNS-ek terhességben, jelentőségük biomarkerként**

A keringésben extracelluláris vesiculákba csomagolódva, lipoprotein vagy RNS-stabilizáló fehérjékhez (például Ago2 vagy nukleoplazmin) kötötten fordulnak elő, melynek köszönhetően a közegre jellemző nagyfokú RNáz aktivitással szemben védettséget élveznek. Stabilitásukat megőrzik olyan szélsőséges körülmények között is, mint a többszöri fagyasztási-olvasztási ciklusok, a magas, illetve alacsony pH és a hosszú tárolási idő (Chen és mtsai 2008; Gilad és mtsai 2008). Ezen tulajdonságait kihasználva, a keringő miRNS-ek potenciális biomarkerként szolgálhatnak különböző kórképek diagnosztikájában, prognosztikájában és terápiás hatás vizsgálatában.

Az extracelluláris miRNS-ek 90–99%-a nem exoszómális formában, hanem Ago-fehérjékhez kötötten fordul elő, mind a vérkeringésben mind a sejtenyészetek felülúszójában (Arroyo és mtsai 2011; Turchinovich és mtsai 2011). Az egyes miRNS-

ek felszabadulásának módja eltérő lehet, egy részük jellemzően vesiculák révén, más részük fehérje-kötötten szekretálódik a sejtekből. A sejtek feltehetően képesek bizonyos nem kódoló RNS-ek szelektív kibocsátására, ily módon befolyásolhatják a környező és távoli célsejtek funkcióját. A miRNS-ek a donorsejtekben és az azokból származó exoszómákban sokszor eltérő mintázatot mutatnak, mely a miRNS-ek exoszómális úton való aktív szekréciót támasztja alá. A kizárólag non-vesiculáris frakcióban jelenlévő miRNS-ek vélhetően az általános élettani folyamatok és sejthalál non-specifikus melléktermékei, mindazonáltal a szervezetre kifejtett hatásuk jelentősége nem ismert (5. ábra) (Schwarzenbach és mtsai 2014). Egyes feltételezések szerint a vesiculáris illetve az Ago-kötött miRNS-ek különböző sejttípusokból származnak, és tükrözik a sejttípus-specifikus miRNS expressziót és/vagy felszabadulási mechanizmusokat (Arroyo és mtsai 2011). Az Ago-specifikus miRNS profil a vérésejtekben és a vérplazmában jelentősen különbözik, ami arra utal, hogy a legtöbb keringő non-vesiculáris miRNS nem a vérésejtekből származik (Turchinovich és Burwinkel 2012).



**5. ábra.** Szabad miRNS-ek felszabadulása: AGO-kötött (passzív) és exoszómális (aktív) szekréciós útvonalak (Schwarzenbach és mtsai 2014)

A terhességgel összefüggésben lévő, de nem kizárólag placenta-eredetű miRNS-ek az anyai vérben detektálhatóak, mennyiségük a terhesség előrehaladtával megnő, szülés után visszaáll a nem terhes egyénekben mért szintre. A placenta-specifikus miRNS-ek a nem terhes egyének vérében nem mutathatók ki, anyai keringésben mérhetőek, mennyiségük

a terhesség előrehaladtával megnő, szülés után pedig eliminálódnak a vérkeringésből. A praeclampsiában eltérő expressziót mutató keringő miRNS-ek a 3. táblázatban kerültek összefoglalásra.

**3. táblázat.** Anyai keringésben eltérő expressziót mutató miRNS-ek praeclampsiában.

Gesztációs kor	Minta típus	Módszer	Szint	miRNS-ek	Referencia
1. trimeszter	Szérum	TLDA, RT-PCR validálás	↑	<i>hsa-miR-1233, hsa-miR-520a, hsa-miR-210</i>	Ura és mtsai 2014
			↓	<i>hsa-miR-144</i>	
1-2. trimeszter	Plazma	RT-PCR	↑	<i>hsa-miR-516-5p, hsa-miR-517*, hsa-miR-518b, hsa-miR-520a*, hsa-miR-520h, hsa-miR-525, hsa-miR-526a</i>	Hromadnikova és mtsai 2012, 2017
2-3. trimeszter	Szérum	RT-PCR	↑	<i>hsa-miR-210</i>	Anton és mtsai 2013
2-3. trimeszter	Plazma	RT-PCR	↑	<i>hsa-miR-210</i>	Xu és mtsai 2014
			↓	<i>hsa-miR-18a, hsa-miR-19b1, hsa-miR-92a-1</i>	
3. trimeszter	Szérum	Újgenerációs szekvenálás (NGS)	↑	<i>hsa-miR-521, hsa-miR-520h, hsa-miR-517c, hsa-miR-519d, hsa-miR-520g, hsa-miR-517b, hsa-miR-542-3p, hsa-miR-136, let7-f1*, hsa-miR-518e, let-7a*, hsa-miR-125b, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-519a, hsa-miR-29a</i>	Yang és mtsai 2011
			↓	<i>let-7f, hsa-miR-223, hsa-miR-1260, let7d, hsa-miR-320c, hsa-miR-185, hsa-miR-1272</i>	
3. trimeszter	Plazma	RT-PCR	↑	<i>hsa-miR-516-5p, hsa-miR-517*, hsa-miR-520a*, hsa-miR-525, hsa-miR-526a</i>	Hromadnikova és mtsai 2013
3. trimeszter	Plazma	RT-PCR	↑	<i>hsa-miR-210</i>	Gunel és mtsai 2011
			↓	<i>hsa-miR-152</i>	
3. trimeszter	Plazma	Microarray, RT-PCR validálás	↑	<i>hsa-miR-574-5p, hsa-miR-26a, hsa-miR-181a, hsa-miR-130b, hsa-miR-103, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-24</i>	Wu és mtsai 2012
3. trimeszter	Plazma	RT-PCR	↑	<i>hsa-miR-210</i>	Zhang és mtsai 2012
3. trimeszter	Plazma	SOLiD szekvenálás, RT-PCR validálás	↑	<i>hsa-miR-141 and hsa-miR-29a</i>	Zhu és mtsai 2013
			↓	<i>hsa-miR-144</i>	
3. trimeszter	Plazma	RT-PCR	↑	<i>hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-126-3p, hsa-miR-221-3p</i>	Murphy és mtsai 2015

A placenta-specifikus mikroRNS-ek keringésben mért koncentrációja korai lepényleválás esetén megváltozik. Egy vizsgálat során a C19MC klaszter bizonyos tagjainak (*hsa-miR-515-3p*, *-517a*, *-517c* és *-518b*) plazmakoncentrációit mérték a 25-40. terhességi hetek között. Bebizonyították, hogy a keringő *hsa-miR-517c* szintje az anyai plazmában megnövekedett a lepényleválás következtében, melynek oka feltehetően a trophoblast-törmelékek fokozott felszabadulása (Miura és mtsai 2017). In vitro fertilizációs programban résztvevő terhesek keringésében már két héttel az implantáció után detektálhatóak voltak C19MC miRNS-ek (Dumont és mtsai 2017). Szintjük a terhesség előrehaladtával mind plazmában, mind izolált exoszóma frakcióban fokozatosan emelkedett. A klaszter korai megjelenése arra utal, hogy tagjai szerepet játszhatnak az anyai-magzati felszín kialakításában (Dumont és mtsai 2017). Humanizált egérmodellben lehetőség nyílt a placenta-specifikus miRNS-ek anyai és magzati keringésben történő vizsgálatára. Az egerekben természetes körülmények között nem expresszálódik a C19MC klaszter, azonban transzgenikus állatot létrehozva a humán szervezetnek megfelelő miRNS mintázat figyelhető meg (Chang és mtsai 2017). Nem terhes állatokban különböző szövetekben gyenge, míg terhesekben fokozott lepényi expressziót írtak le. A miRNS-ek funkcionális hatásaira a tanulmányban nem tértek ki. Kimutatták, hogy a placenta-specifikus miRNS-ek elsősorban az anyai keringésben jelennek meg, azonban az anyai eredetű miRNS-ek mind a placenta irányába, mind a magzati oldalra vándorolhatnak. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a terhességgel összefüggésben lévő miRNS-ek az anyai-magzati felszínek közötti kommunikáció egy eddig ismeretlen, nem-hormonális módját határozzák meg.

Hromadnikova munkacsoportja jelentős munkát végzett a placenta-specifikus miRNS-ek tanulmányozásában. Eredményeik szerint a C19MC bizonyos tagjai biomarkerként szolgálhatnak nem csak a praeclampsia, hanem az IUGR és gestatos hypertonia kórképek előjelzésére is (Hromadnikova és mtsai 2012, 2014, 2017). A vizsgált miRNS-ek szintje jelentősen megemelkedik a terhesség korai szakaszán, ami lehetőséget adhat az élettani és kóros kimenetelű terhességek elkülönítésére. Már fennálló betegség esetén csak a praeclampsiás csoportban figyeltek meg szignifikáns különbséget (Hromadnikova és mtsai 2013).



## 2. Célkitűzések

**I. Vizsgálat:** A placentában expresszáldó miRNS-ek terhesség folyamán betöltött funkciója a mai napig tisztázatlan, feltehetően részt vesznek a placentáció szabályozásában és szükségesek a terhesség zavartalan lefolyásához. Rendellenes expressziójuk hozzájárulhat különböző terhességi kórképek, köztük a praeclampsia kialakulásához. A miRNS-ek patogenitásának felmérésére expressziós adatbázisból nyert adathalmazokon bioinformatikai elemzést hajtottunk végre. Az *in silico* analízis során olyan kulcsfontosságú miRNS-mRNS interakciók feltérképezését tűztük ki célul, amelyek lehetővé teszik a betegség hátterében álló folyamatok és ezáltal a betegséget kialakító molekuláris interakciók pontosabb megismerését.

**II. Vizsgálat:** A placentában expresszáldó miRNS-ek jelentős része, a trophoblast rétegből aktív vagy passzív szekréció révén kijut az anyai vérkeringésbe. Praeclampszában a placenta diszfunkció a trophoblast-eredetű vesiculák rendellenes felszabadulását okozza, ami által megváltozik az exoszómális faktorok, köztük a miRNS-ek szintje is az anyai keringésben. Célkitűzésünk az exoszómális össz-miRNS koncentráció meghatározása és a *hsa-miR-210* expressziós vizsgálata különböző terhességi magas vérnyomásos csoportokban, továbbá összefüggést keresése a kérdéses faktorok és a praeclampsia súlyossága között.

**III. Vizsgálat:** A *hsa-miR-210* praeclampsia esetén mind a placentában, mind az anyai vérben fokozottan expresszáldódik, mindazonáltal kérdés tárgyát képezi, hogy ez a jelenség hozzájárul-e a betegség kialakulásához, vagy inkább annak következménye. Ezenfelül a miRNS szekréciójának módja (exoszómális vagy Ago-kötött), és a különböző formák betegségben betöltött szerepe sem tisztázott. Célkitűzésünk a *hsa-miR-210* expressziós analízise placentamintákban és anyai vérből izolált exoszómális és Ago-kötött frakciókban, szignifikáns eltérések keresése praeclampszával szövődött és élettani terhességek között. A miRNS szekrécióját különböző típusú trophoblast sejtvonalak segítségével modellezzük. Az *in vitro* vizsgálat során VT és EVT sejtvonalakban hypoxiás állapotot idézünk elő, majd meghatározzuk a *hsa-mir-210* sejten belüli, exoszómális és Ago-kötött expressziós mintázatát.

### 3. Módszerek

#### 3.1. Bioinformatikai analízis

A miRNS-ek komplex szabályozási hálózatok részei, feltérképezésükhöz rendszerbiológiai szemlélet szükséges. A molekuláris genetikai és bioinformatikai módszerek ötvözésével mélyebb betekintést nyerhetünk a betegségeket kiváltó mechanizmusokba. A miRNS-ek patogenitásának felmérésére expressziós adatbázisból nyert adathalmazokon bioinformatikai elemzést hajtottunk végre. A microarray vizsgálatok kvantitatív eredményt adnak a gén- és miRNS-expressziós mintázatra vonatkozóan. A kóros és egészséges szöveti expresszió összehasonlításával meghatározhatók azon gének és miRNS-ek listái, amelyek kifejeződése a vizsgált csoportokban szignifikánsan eltér, ezáltal azonosíthatók a betegségre jellemző patogenetikai mechanizmusok és molekuláris markerek. Vizsgálatunkban olyan kulcsfontosságú miRNS-mRNS interakciók feltérképezését tűztük ki célul, amelyek hozzásegíthetnek a betegség hátterében álló molekuláris interakciók pontosabb megismeréséhez.

##### 3.1.1. miRNS-mRNS hálózat

A miRNS-mRNS hálózat felépítéséhez miRNS- és génexpressziós adathalmazokat kerestünk a Gene Expression Omnibus (GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) és ArrayExpress (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) adatbázisokban. A kritériumok a következők voltak: preeclampsia vs. kontroll vizsgálati felépítés, terminus placentaszövet, és egyedi, nem „poolozott” RNS mintákból származó adatok. A hálózat felépítésekor nem volt elérhető olyan publikus kutatási eredmény, ahol a miRNS- és mRNS expressziós adatok ugyanazokból a biológiai mintákból származtak volna. Két miRNS- és nyolc mRNS adathalmazt találtunk, amelyek megfeleltek a szűrési feltételeknek, ezek közül egy-egy hasonló vizsgálati felépítésűt választottunk (4. táblázat). A bevonási kritérium mindkét kutatásban a terhesség 20. hete után jelentkező de novo hipertónia és proteinúria. A minták átlag amerikai populációból származtak. A miRNS profilt a GSE57050 adathalmazból nyertük, ami 6 kóros és 4 kontroll placentaszövetből származó adatokat tartalmazott. Az analízist Affymetrix Multispecies miRNA-2\_0 arrays (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA) platformon végezték el. Az mRNS expressziós adatok közül a GSE73374 bizonyult megfelelőnek: 19 kóros és 17 kontroll



minta adatait foglalta magába, melyeket Affymetrix Human Gene 2.0 ST Array platform segítségével nyertek. A hálózat felépítését a két adathalmaz integrált elemzésével folytattuk (7. ábra).

**4. táblázat.** A szűrési feltételeknek megfelelő, nyilvánosan elérhető adatbázisokban (ArrayExpress, GEO) rendelkezésre álló placentáris miRNS- és génexpressziós adathalmazok (praeclampsia vs. kontroll).

Hozzáférés	Típus	Platform	Szövet	Minták
E-GEOD-57050, GSE57050	miRNS array	Affymetrix GPL14613	placenta	6 PE, 4 N
E-GEOD-15789, GSE15789	miRNS array	Capitalbio GPL8469	placenta	4 PE, 4 N
E-GEOD-35574, GSE35574	gén array	Illumina GPL6102	placenta	27 IUGR, 19 PE, 40 N
E-GEOD-4707, GSE4707	gén array	Agilent GPL1708	placenta	10 PE, 4 N
E-GEOD-73374, GSE73374	gén array	Affymetrix GPL16686	placenta	19 PE, 17 NE
E-GEOD-74341, GSE74341	gén array	Agilent GPL16699	placenta	8 PE, 5 N
E-GEOD-10588, GSE10588	gén array	Applied Biosystems GPL2986	placenta	17 PE, 26 N
E-GEOD-24129, GSE24129	gén array	Affymetrix GPL6244	placenta	8 PE, 8 IUGR, 8 N
E-GEOD-25906, GSE25906	gén array	Illumina GPL6102	placenta	23 PE, 37 N
E-GEOD-47187, GSE47187	gén array	Agilent GPL14550	placenta	5 PE, 5 N

### 3.1.2. Microarray adatok előfeldolgozása

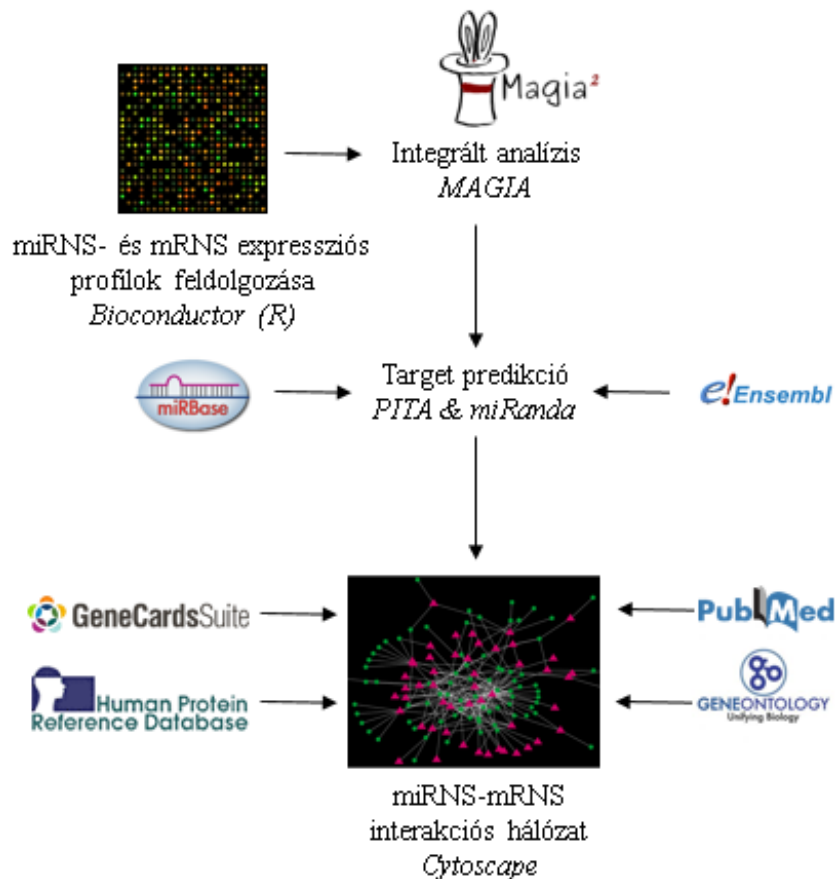
A microarray adatok elemzését az R statisztikai csomag implementálásával végeztük el ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)). A kapcsolódó Bioconductor projekt ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)) további R csomagokat biztosít a microarray adatelemzéshez. A preprocessálás legfontosabb lépései a következők voltak:

- Adatok letöltése: a GSE57050 és a GSE73374 nyers adathalmazok lehozásához a GEOquery könyvtár `getGEOSuppFiles()` parancsát használtuk. Ily módon megkaptuk az egyes próbákra vonatkozó nyers intenzitást tartalmazó CEL fájlokat, melyeket a `ReadAffy()` paranccsal nyitottunk meg.
- Minőségellenőrzés: Az adatok minőségét a `qc()` módszerrel értékeltük a következő minőségi mértékek kiszámításával: a különböző array-k átlagos háttérértékei, a skálafaktorok és a szignifikáns jelet adó pontok százalékos aránya.

- Adatok normalizálása: A lekérdezett adatokat az RMA (Robust Multi-array Analysis) módszerrel normalizáltuk, amely tartalmazza a háttér korrekciót, a log transzformációt, a kvantilis és próba normalizációt.
- Adatok szűrése: A noninformatív adatokat kiszűrtük. Ezek közé tartoztak a kontrollként használt próbák és azok az alacsony jelintenzitású próbák is, amelyek nem alkalmasak az expresszió különbségek tesztelésére.
- Expressziós különbséget mutató próbák keresése: A szignifikánsan túl- és alulexpresszált RNS-eket többszörös lineáris regressziós modell segítségével (limma) határoztuk meg.

### 3.1.3. miRNS-mRNS interakciós analízis

Az mRNS és miRNS expressziós adatok integrálására a MAGIA webes eszközt (<http://gencomp.bio.unipd.it/magia2/start/>) használtuk (Sales és mtsai 2010). Az elemzés azon az elgondoláson alapul, hogy a miRNS és célpontjai inverz módon fejeződnek ki. A MAGIA a miRNS- és a génexpressziós adatok elemzését target predikcióval köti össze, mely lehetővé teszi a miRNS-ek és a célpont mRNS-ek közötti kísérletesen alátámasztott szabályozási kapcsolatok felderítését. A számításokat a "nem illesztett minták" beállítással végeztük, mivel a miRNS és mRNS expresszióra vonatkozó információk két különböző kísérletből származtak. A génexpressziós profilok integrált elemzéséhez meta-analízist alkalmaztunk, mely lehetővé tette a két csoport közötti (praeclamptikus és normál) szignifikánsan eltérő próbák azonosítását az egyes array-ken. Ezt követően két eltérő számítási elven alapuló target prediktor algoritmust (miRanda és PITA) választottunk, melyeket kombinálva specifikusabb eredményeket kaphatunk. Végül feltöltöttük a miRNS és a génexpressziós mátrixokat, és elvégeztük az elemzést.



7. ábra. Bioinformatikai analízis lépései

### 3.1.4. Hálózatépítés

A miRNS-mRNS hálózat megalkotásához a Cytoscape szoftvercsomagot alkalmaztuk (Shannon és mtsai 2003). A MAGIA elemzésből kapott legerősebb 250 interakciót jelöltük ki, és tovább szűkítettük a  $q < 0,0001$  értékű párokra. Szignifikáns találat esetén a  $q$ -érték megadja a fals pozitívok előfordulási arányát, mely által kontrollálható a hamis felfedezési arány (false discovery rate, FDR). Bizonyos alhálózatokat a humán fehérje referencia adatbázis (HPRD, <http://www.hprd.org/>) felhasználásával protein-protein kölcsönhatások hozzáadásával bővítettünk, így miRNS-szabályozott protein-protein interakciós hálózatokat nyertünk. Az egyes gének szövetspecifikus expressziójának meghatározásához a humán fehérje atlaszt (The Human Protein Atlas, <http://www.proteinatlas.org/>) használtuk, mely lehetővé tette a placentában termelődő fehérjék kiválasztását.

### 3.1.5. Funkcionális elemzés

A szabályozott gének funkcionális analízisét DAVID bioinformatikai adatbázis (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, <https://david.ncifcrf.gov/>) segítségével végeztük el (Dennis és mtsai 2003). Az online szoftver három gén-ontológia (GO) kategóriába sorolja a géneket: biológiai útvonal (Biological Pathway, BP), molekuláris funkció (Molecular Function, MF) és sejtkomponens (Cellular Component, CC).

A hálózat elemeit a GeneCards Suite integrált tudásbázis (<http://geneanalytics.genecards.org/>) különböző alkalmazásaival tanulmányoztuk tovább. A VarElect funkcióval a géneket fenotípusok szerint lehet rangsorolni (Stelzer és mtsai 2016). A praeclampsia-val kapcsolatos kulcsszavakat kerestünk, beleértve a fő tüneteket (magas vérnyomás és proteinuria), valamint a társbetegségeket és kockázati tényezőket (szív- és érrendszeri betegségek, elhízás, diabetes mellitus stb.). A gének betegségekhez kapcsolódó relevanciaértékeit a MalaCards adatbázis (<http://www.malacards.org/>) felhasználásával kaptuk meg (Rappaport és mtsai 2017).

## 3.2. Laboratóriumi vizsgálatok

### 3.2.1. Vizsgálati alanyok

Vérminták: A kutatási alanyok 2015-2017 folyamán a Semmelweis Egyetem I.sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikán terhesgondozásban résztvevő vagy a terhespatológiai osztályra felvett várandósok közül kerültek bevonásra. Harmadik trimeszteri perifériás vérmintákat gyűjtöttünk egészséges és különböző formájú terhességi magas vérnyomással érintett várandósoktól: chronicus hypertonia, gestatio hypertonia és praeclampsia. Minden résztvevőnek meg kellett felelnie a bevonási és kizárási kritériumoknak.

Placentaminták: A placenta mintákon elvégzett vizsgálatokba elektív illetve sürgősségi császármetszésre irányított várandós nők kerültek bevonásra. Minden résztvevőnek meg kellett felelnie a bevonási és kizárási kritériumoknak. Az előzetesen tájékoztatott és írásbeli beleegyezését adó önkéntes terhesek esetében a szülést követően a placenta különböző részeiből szövetdarabokat gyűjtöttünk.

Bevonási kritériumok: Gestatios hypertonia (GHT) esetén de novo hypertonia (BP > 140/90 mmHg) egyéb társ tünet nélkül; Chronicus hypertonia (CHT) esetén már a terhesség előtt fennálló vagy a 20. gestatios hetéig megjelenő hypertonia. A praeclampsia (PE) csoportban a terhesség 20. hete után jelentkező proteinuria (> 300 mg/24h vagy ++ vizelet fehérje gyorseszten) és de novo hypertonia, illetve ráakódásos PE esetén megelőző hypertonia. Súlyos PE-nak tekintettük azokat az eseteket, ahol 110/160 mmHg értéket meghaladó vérnyomás és nagymértékű proteinuria volt jelen (5g/24h vagy +++ vizelet fehérje gyorseszten), vagy egyéb anyai szervi zavarok léptek fel (trombocytopenia, májfunkciók károsodása, veseelégtelenség, tüdőödéma, korábban nem tapasztalt agyi vagy látási zavarok). IUGR-rel társult az a terhesség, amikor a magzat ultrahang által becsült súlya a korának és nemének megfelelő standard 10 percentilise alá esett [35].

Kizárási kritériumok: megindult szülés, ikerterhesség, magzati fejlődési rendellenesség, továbbá a normotenzív csoportban, az anamnézisben szereplő hypertonia, spontán abortusz, koraszülés és IUGR esetek is kizárásra kerültek.

A kutatás elvégzését az Egészségügyi Tudományos Tanács Kutatásetikai Bizottsága (ETT TUKEB) engedélyezte (engedélyek száma: 2379/2014, 24387-2/2016). A vizsgáló orvos szóban és írásban tájékoztatta a vizsgálat alanyait, akik ezután írásbeli beleegyező nyilatkozatot tettek a vér- és placentaminták további felhasználásáról. A kutatás a Helsinki Nyilatkozat, az embereken végzett orvosi kutatások etikai alapelveinek megfelelően történt.

### **3.2.2. Mintagyűjtés és előkészítés**

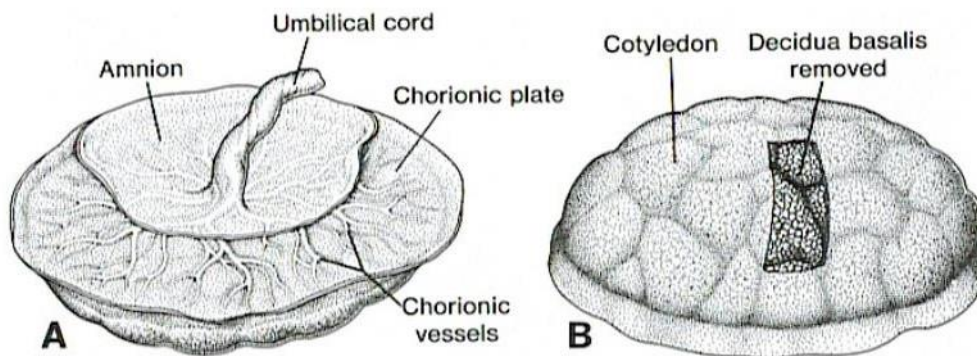
#### Vérminták gyűjtése és feldolgozása

Az anyai perifériás vérmintákat EDTA tartalmú csövekbe gyűjtöttük, hogy megakadályozzuk a véralvadást. Az K<sub>3</sub>-EDTA a Ca<sup>2+</sup> és Mg<sup>2+</sup> ionok megkötése által fejti ki antikoaguláns hatását, továbbá gátolja az endogén nukleázok aktivitását. A vérmintákból Eppendorf 5810 R (Eppendorf AG, Hamburg, Németország) típusú centrifuga segítségével elválasztottuk a plazmát. A mintákat 10 percig 2500 x g fordulatszámra, majd a leszívott felülúszót 10 percig 12500 x g fordulatszámra centrifugáltuk. Az így módon kapott úgynevezett „vérlemezké mentes plazma” (platelet-

free plasma, PFP) mintákat 1,5 ml-es Eppendorf csövekben,  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a további feldolgozásig.

#### Placentaminták gyűjtése és feldolgozása

A placentaminták gyűjtését a Pasupathy és mtsai által leírt protokoll szerint végeztük (Pasupathy és mtsai 2008). A placenta anyai felületén a sérült, további vizsgálatra alkalmatlan területeket elkülönítettük (kalcifikáció, haematoma stb.), és négy arra megfelelő helyet jelöltünk ki mintavételre. A bazális membránból 1–2 mm-t eltávolítottunk és a villusok alkotta lebenyekből (cotyledon) borsónyi méretű szövetmintákat vettünk (8. ábra). A mintákat kétszer mostuk  $4^{\circ}\text{C}$ -os 1x foszfát-puffer oldatban (PBS), majd RNAlater (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) stabilizáló oldatba helyeztük, melynek alkalmazásával elkerülhető az RNS degradáció. Az ily módon kezelt mintákat egy hónapig  $4^{\circ}\text{C}$ -on, ezt követően  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.



**8. ábra.** A placenta sematikus ábrázolása. A. Magzati felszín. B. Anyai felszín és cotyledon (Mannelli és mtsai 2015)

### III. Vizsgálat

#### 3.2.3. Sejttenyésztés és kezelés

*Az MTA TTK, Enzimológiai Intézet, Biomembrán Kutatócsoport közreműködésével*

Az *in vitro* vizsgálatok elvégzéséhez JAR és HTR-8 placenta-eredetű sejtvonalakat használtunk. Az előbbi egy choriocarcinoma sejtvonal, melynek jellemzői a VT-nak felelnek meg, míg az utóbbi egy immortalizált EVT sejtvonal. A sejtenyésztéseket standard körülmények között ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) termosztátban tartottuk.

A JAR sejteket RPMI-1640, a HTR-8 sejteket pedig DMEM tápoldatban tartottuk, melyet mindkét esetben 10% FBS-sel (Fetal Bovine Serum), 1% L-Glutaminnal és antibiotikumokkal (Penicillin-Streptomycin, 10 000 U/ml) komplettáltunk.

### **A tenyésztés lépései:**

#### Sejtek felvétele folyékony nitrogénből

- 9 ml médiumot kimérünk egy 10 ml-es Falcon csőbe
- Az 1 ml-enként lefagyasztott sejteket felengedjük és a 9 ml médiumba tesszük
- 230 x g-n, 5 percig centrifugáljuk
- A felülúszó leöntése után 3 ml médiumot adunk a pellethez és felszuszpendáljuk
- 15 ml-es flaskába 12 ml médiumot teszünk és hozzáadjuk a sejtsuszpenziót

#### Sejtek fenntartása

- A flaskából leszívjuk a használt médiumot a sejtréteg megsértése nélkül
- 15 ml friss médiumot mérünk a sejtekre

#### Sejtek passzálása

- A flaskából leszívjuk a használt médiumot a sejtréteg megsértése nélkül
- 10 ml PBS-sel leöblítjük a sejteket
- A PBS leszívása után 4 ml tripszint mérünk a sejtekre és 10 percre visszahelyezzük a 37°C-os termosztátba
- Mikroszkóppal ellenőrizzük, hogy a sejtek teljesen feljöttek-e flaska aljáról
- 10 ml médiumot adunk a felszedett sejtekhez és felszuszpendáljuk
- 10x hígítást alkalmazunk, 1 ml sejtsuszpenzióhoz 14 ml friss médiumot adunk

### **A kezelés lépései:**

#### Médium előkészítése

A komplettált médiumban alapvetően sok, szérum-eredetű extracelluláris vesicula található, ami befolyásolhatja a mérési eredményeket. Ez okból, a sejtek kezeléséhez

ultracentrifugálás segítségével exoszóma-mentes médiumot állítottunk elő: a 10% FBS-t 120000 x g-n, 4 °C-on, 2 óráig centrifugáltuk, majd az így nyert felülúszót használtuk komplettáláshoz.

#### A sejtek kirakása

A sejtek kezelését megelőzően sejtszámlálást végeztünk a TC20<sup>TM</sup> (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA) automata készülékkel. 6 lyukú plate-re lyukanként  $4 \times 10^5$  sejtet raktunk ki 2 ml-es végtérfogatú exoszóma-mentes médiumban.

#### A sejtek kezelése

A sejteket 24 óra elteltével 100  $\mu$ M desferrioxaminnal (DFO), vagy kontrollként dimetilszulfoxiddal (DMSO) kezeltük, majd standard körülmények között további 24 órán keresztül tenyésztettük. A DFO egy jól ismert hypoxia indukáló szer, amelyet in vitro vizsgálatokban széleskörűen alkalmaznak hypoxiás állapot modellezésére.

### **3.2.4. Exoszóma izolálás**

Különbféle módszereket fejlesztettek ki az exoszómák biológiai folyadékokból történő izolálására. A plazma vagy szérum klinikai szempontból a legfontosabb extracelluláris vesiculákat hordozó közeg, jóllehet feltárásuk más biológiai folyadékokhoz képest igen bonyolult. A nagy viszkozitású és sűrűségű plazma különböző méretű és sűrűségű vesiculákat és nanorészecskéket tartalmaz (például vírusrészecskék és lipoproteinek), melyek fizikai tulajdonságai átfedhetnek az exoszómákéval.

Az exoszóma izolálásához a mai napig legerjedtebb gold standard módszer a differenciál ultracentrifugálás (UC), melynek lényege, hogy egy előcentrifugálással elválasztásra kerülnek a nagyobb méretű struktúrák, majd kiülepítéssel dúsítják fel az exoszómális populációt. Az esetek többségében az előcentrifugálás elégtelen az összes sejtörmelék eltávolításához, ugyanakkor a vesiculák egy jelentős hányadának elvesztésével jár. Nem elhanyagolható az a tény sem, hogy a fennmaradó vérlemezkék fagyasztást-felolvasztást követően számos további vesiculát bocsáthatnak ki, és az ily módon létrejövő „kontamináció” negatívan befolyásolhatja a vizsgálatok kimenetelét. Az UC módszerrel történő elválasztás nehézkes kivitelezése és időigényessége miatt új eszközök kerültek kifejlesztésre, melyek nagyban hozzájárultak az extracelluláris



vesiculák területén történő kutatásokhoz. Ezek közé tartozik a kromatográfia, filtráció, polimer alapú precipitáció, immunológiai szeparáció és a membrán-alapú affinitásoszlop módszer. Kutatásunk különböző fázisai során a precipitációs és a membrán-alapú affinitásoszlop módszereket alkalmaztunk, ezeket alább részletesebben ismertetjük.

## II. Vizsgálat

A vérmintákból exoszóma izolálást végeztünk MN Exosome Precipitation Solution (Serum / Plasma) precipitációs kit (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany) felhasználásával.

A módszer elve: Az izolálás első lépésében a biológiai folyadékot (esetünkben vérplazmát) polimer tartalmú precipitációs oldattal keverjük össze, melyet egy rövid inkubáció és alacsony fordulatszámon történő centrifugálás követ. A módszer előnye a gyors és egyszerű kivitelezésén kívül, hogy az izolált exoszómák nincsenek kitéve erős kölcsönhatásoknak, így megfelelő mennyiségű és minőségű vesicula nyerhető. Ugyanakkor, fennáll a lehetősége non-vesiculáris komponensek (például lipoproteinek) koprecipitációjának, és a nem megfelelő specificitás téves eredményekhez vezethet.

Az izolálás menete:

- Exoszóma precipitáció: 500 µl plazmához (PFP) 200 µl exoszóma precipitációs oldatot adunk, 10 másodpercig vortexeljük, majd fél óráig 2–8 °C-on inkubáljuk.
- Exoszóma elválasztás: az elegyet 5 percig 500 x g-n centrifugáljuk, majd a felülúszó eltávolítása után a csapadékot 500 µl RNáz-mentes vízben vesszük fel.

## III. Vizsgálat

A vérmintákból (A) és a sejttenyésztő tápoldatokból (B) exoszóma izolálást végeztünk a QIAGEN ExoRNEasy (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) membrán-alapú affinitásoszlop izolálási módszerrel. Az előbbi a kisebb térfogathoz ajánlott Midi (0,5-1 ml), míg az utóbbit a nagyobb térfogatú mintákhoz ajánlott Maxi (2-4 ml) verzióval végeztük el.

A módszer elve: A membrán-alapú affinitásoszlop az extracelluláris vesiculák egy precíz és gyors izolálási technikája, vérplazmából és sejtmédiumból egyaránt. Segítségével nem csak az exoszómális, hanem a non-vesiculáris (más néven Ago-kötött) miRNS frakció is elválasztható, mely a két típus speciális vizsgálatát teszi lehetővé (Enderle és mtsai 2015) (9. ábra). Az előbbieket az oszlopon kötve maradnak, míg az utóbbiak oszlopon áthaladó folyadékban találhatók meg. A fenol/guanidin alapú kombinált lízis és elúciós lépéssel leoldható az exoszómális frakció, amelyet a teljes RNS szilikagél-membránon alapuló tisztítása követ.

Az izolálás menete:

#### A) Exoszóma izolálás plazmamintából

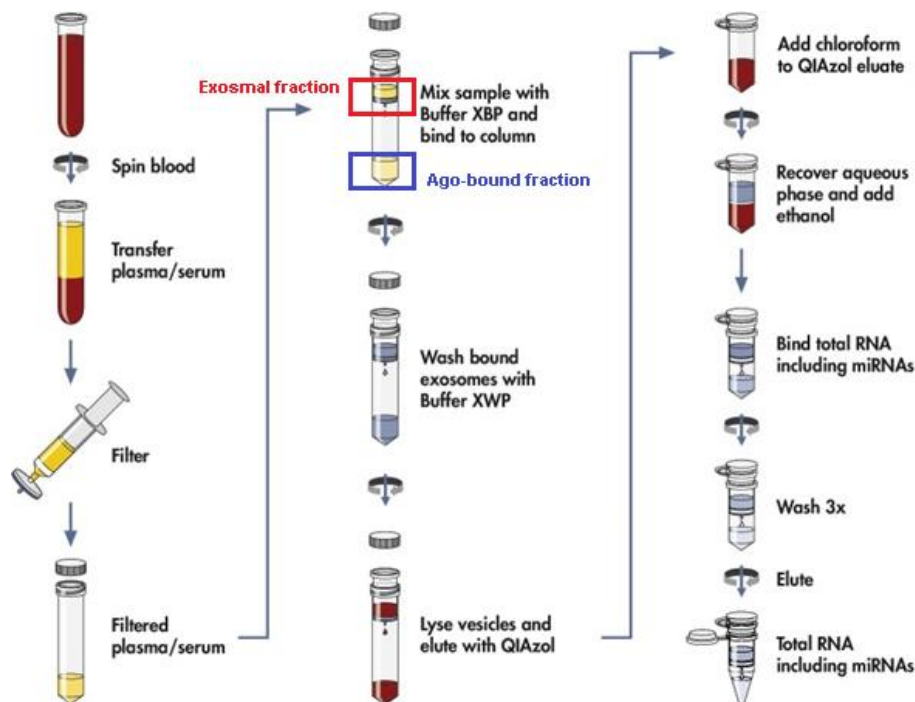
- Szűrés: A plazmamintákat 0,2 µm-es steril fecskendőszűrőn (VWR Scientific) eresztjük át a nagyobb részecskék eliminálásához
- Exoszómák megkötése: 500 µl mintához ugyanannyi XBP-t (kötő puffer) adunk, majd többszöri forgatással összekeverjük. Az elegyet az exoEasy oszlopra visszük és 1 percig 500 x g-n centrifugáljuk. A megszárt folyadékot félretesszük a későbbi non-vesiculáris miRNS izoláláshoz.
- Exoszóma tisztítás: Az oszlopra 3,5 ml XWP-t (mosó puffer) mérünk, és 5 percig 5000 x g-n centrifugáljuk.
- Exoszóma eluálás és lízis: Az oszlopot új gyűjtőcsőbe helyezzük és 700 µl QIAzol-t (lízis reagens) mérünk a membránra. 5 percig 5000 x g-n centrifugáljuk, majd az így kapott lizátumot 2 ml-es Eppendorf csőbe mérjük.

#### B) Exoszóma izolálás sejtenyésző tápoldatból

- Szűrés: A médiumot 10 percig maximális fordulatszámon centrifugáljuk, majd 0,2 µm-es steril fecskendőszűrőn eresztjük át a sejtörmelékek és egyéb nagyobb részecskék eliminálásához.
- Exoszómák megkötése: 2 ml mintához ugyanannyi XBP-t (kötő puffer) adunk, majd többszöri forgatással összekeverjük. Az elegyet az exoEasy oszlopra visszük és 1

percig 500 x g-n centrifugáljuk. A megszárt folyadékot félretesszük későbbi non-vesiculáris miRNS izoláláshoz.

- Exoszóma tisztítás: Az oszlopra 10 ml XWP-t (mosó puffer) mérünk, és 5 percig 5000 x g-n centrifugáljuk.
- Exoszóma eluálás és lízis: Az oszlopot új gyűjtőcsőbe helyezük és 700 µl QIAzol-t (lízis reagens) mérünk a membránra. 5 percig 5000 x g-n centrifugáljuk, majd az így kapott lizátumot 2 ml-es Eppendorf csőbe mérjük.



**9. ábra.** Exoszómális és Ago-közt miRNS izolálás membrán-alapú affinitásoszlop módszerrel (Forrás: Qiagen exoRNeasy Serum/Plasma kézikönyv, 2015 január, átdolgozott ábra)

### 3.2.5. RNS/miRNS izolálás

#### II. Vizsgálat

A precipitációs exoszóma izolátumokból miRNS extrakciót végeztünk a NucleoSpin® miRNA Plasma (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Németország) kit felhasználásával, a gyártó leírásának megfelelően.

A módszer elve: a módszer a hagyományos szerves oldószerekkel történő izolálást kombinálja a szilikamembrán alapú oszlopos technikával, így lehetővé válik a kisméretű RNS molekulák megkötése. A plazmából származó, membránon megkötött miRNS mosási lépéseket követően centrifugálással az oszlopról eltávolítható, és közvetlenül használható további kísérletekben. Az eljárás nagy előnye a hagyományos módszerekkel szemben, hogy az extrakció menete, főleg több minta esetén, gyorsabb és egyszerűbb.

Az izolálás lépései:

- Minta előkészítése: 500 µl exoszómamintához 90 µl denaturáló MLP puffert adunk, 5 másodpercig vortexeljük, majd 3 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk.
- Fehérje kicsapása: 30 µl MPP puffert adunk az elegyhez, 5 másodpercig vortexeljük, 1 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk, majd 11000 x g-n 3 percig centrifugáljuk.
- Felülúszó elválasztása: a felülúszót átvisszük egy új 2 ml-es eppendorf csőbe, 400 µl izopropanolt adunk hozzá és 5 másodpercig vortexeljük.
- DNS és RNS megkötése: a NucleoSpin® miRNA oszlopot egy 2 ml-es eppendorfbba helyezük, a mintát az oszlopra pipetázzuk, 2 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk, majd 11000 x g-n 30 másodpercig centrifugáljuk. A felülúszót elöntjük, majd visszahelyezzük az oszlopot a csőbe.
- DNS emésztése (opcionális): az oszlop többlépéses mosása után (ld. következő lépés) 50 µl rDNÁzt pipetázzunk a membránra, majd 15 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk.
- A szilikamembrán mosása: 1. mosás: 100 µl mosó MW1 puffert adunk a mintához, majd 11,000×g-n 30 másodpercig centrifugáljuk. Az átszűrt folyadékot elöntjük, majd visszahelyezzük az oszlopot a csőbe. 2. mosás: 700 µl mosó MW2 puffert adunk a mintához, majd 11000 x g-n 30 másodpercig centrifugáljuk. Az átszűrt folyadékot elöntjük, majd visszahelyezzük az oszlopot a csőbe. 3. mosás: 250 µl mosó MW2 puffert adunk a mintához, majd 11000 x g-n 2 percig centrifugáljuk. Az átszűrt folyadékot elöntjük, majd visszahelyezzük az oszlopot a csőbe.
- RNS eluálása: a NucleoSpin® miRNA oszlopot egy új 1,5 ml-es eppendorba helyezük, 30 µl RNáz-mentes vizet pipetázzunk a membránra, 1 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk, majd 11000 x g-n 1 percig centrifugáljuk. Az átszűrt

folyadékban található az oszlopról leoldott miRNS, amelyet a további feldolgozásig -80°C-on tárolunk.

### III/1. Vizsgálat - Vérminták

#### miRNeasy – exoszómális (A) és non-vesiculáris (B) miRNS-ek izolálása

A módszer elve: az exoszómák eluálásához és a non-vesiculáris frakció líziséhez használt QIAzol reagens denaturálja a fehérjekomplexeket és az RNázokat, továbbá szerves extrakcióval a fennmaradó DNS- és fehérjeszennyeződések többségét is eltávolítja. Kloroform hozzáadása után, centrifugálással szétválik a vizes és szerves fázis. Az exoszómális és non-vesiculáris RNS molekulák tisztítása a felső, vizes rétegből szilikamembrán alapú technológiával valósul meg.

#### A) exoszómális miRNS-ek izolálása

- Az exoEasy oszlopról leoldott lizátumot röviden vortexeljük és 5 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk, mellyel elősegítjük a nukleoprotein komplexek disszociációját. Ezzel egy időben elindítjuk a non-vesiculáris frakcióból való miRNS izolálást (B).
- A lizátumhoz 90 µl kloroformot adunk, 15 másodpercig kézben erősen összerázzuk, majd 2-3 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk.
- Az elegyet 15 percig 12000 x g-n 4 °C-on centrifugáljuk. Három fázist kapunk, amelyből a legfelső, vizes réteget a középső réteg megsértése nélkül új 1,5 ml-es Eppendorf csőbe pipetázzuk.
- Az így kapott, körülbelül 350 µl-es frakcióhoz kétszer annyi, 700 µl ethanol adunk, és többszöri pipetázással keverjük. 700 µl-t RNeasy oszlopra mérünk, majd 15 másodpercig, 8000 x g-n centrifugáljuk. Az átszűrt folyadékot elöntjük, visszahelyezzük az oszlopot, majd a maradék eleggyel megismételjük a lépést.
- 700 µl RWT mosópuffert mérünk az oszlopra, majd másodpercig, 8000 x g-n centrifugáljuk. Az átszűrt folyadékot elöntjük, visszahelyezzük az oszlopot. Ezt követően 500 µl RPE mosópuffert mérünk az oszlopra, majd másodpercig, 8000 x g-n centrifugáljuk. Az átszűrt folyadékot elöntjük, visszahelyezzük az oszlopot, majd

megismételjük a lépést 2 perces centrifugálással. Az oszlopot új gyűjtőcsőbe helyezzük, majd nyitott fedéllel 5 percig maximális fordulatszámon centrifugáljuk.

- A száraz oszlopot egy 1,5 ml-es Eppendorf csőbe helyezzük, majd 14 µl RNáz-mentes vizet pipetázunk a membránra. 1 percig inkubáljuk, majd az RNS eluálásához 1 percig teljes fordulatszámon centrifugáljuk.

#### B) non-vesiculáris (Ago-kötött) miRNS-ek izolálása

- 200 µl mintához 1 ml QIAzol lízis reagenst mérünk, vortexeljük, majd 5 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk.
- A lizátumhoz 200 µl kloroformot adunk, 15 másodpercig kézben erősen összerázzuk, majd 2-3 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk. Ezt követően a lépések megegyeznek az exoszómális miRNS izolálásánál leírtakkal.

### III/1. Vizsgálat - Placentaminták

*Az MTA TTK, Enzimológiai Intézet, Biomembrán Kutatócsoport közreműködésével*

A placentaszöveti RNS izolálást TRIzol™ lízis reagenssel (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) a gyártó leírása szerint végeztük, melynek lépései a következők:

Lizálás és fázisszétválasztás:

- Az 50-100 mg-os placentamintákat Potter-Elvehjem szövethomogenizáló cső és rúd segítségével 1 ml TRIzol hozzáadásával homogenizáljuk, majd 5 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk.
- A lizátumhoz 200 µl kloroformot adunk, 15 másodpercig kézben erősen összerázzuk, majd 2-3 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk.
- Az elegyet 15 percig 12000 x g-n 4 °C-on centrifugáljuk. Három fázist kapunk, amelyből a legfelső, vizes réteget a középső réteg megsértése nélkül új 1,5 ml-es Eppendorf csőbe pipetázzuk.

RNS kicsapása:

- Az így kapott frakcióhoz 500 µl izopropanolt adunk, és többszöri pipettázással keverjük.
- 10 percig inkubáljuk, majd 10 percig 7500 x g-n 4 °C-on centrifugáljuk. A totál RNS fehér gélyszerű csapadékot képez a cső alján, a felülúszót elöntjük.

RNS tisztítása:

- A pelletet 1 ml 75 %-os ethanolban vesszük fel, és röviden vortexeljük. 5 percig 12000 x g-n 4 °C-on centrifugáljuk, a felülúszót elöntjük. 5-10 percig nyitott fedéllel szárítjuk a kapott pelletet.

RNS beoldása:

- Az RNS-t 50 µl RNáz-mentes vízbe vesszük fel, majd -80 °C-on tároljuk a további felhasználásig.

### **III/2. Vizsgálat - Sejtenyészetek**

*Az MTA TTK, Enzimológiai Intézet, Biomembrán Kutatócsoport közreműködésével*

A sejtenyészetekből való RNS izolálás a placentaszövetekhez hasonlóan, a TRIzol™ lízis reagenssel, a gyártó leírásának megfelelően történt.

#### **3.2.6. Mennyiségi és minőségi kontroll**

##### Spektrofotométer – RNS koncentráció és tisztaság meghatározása

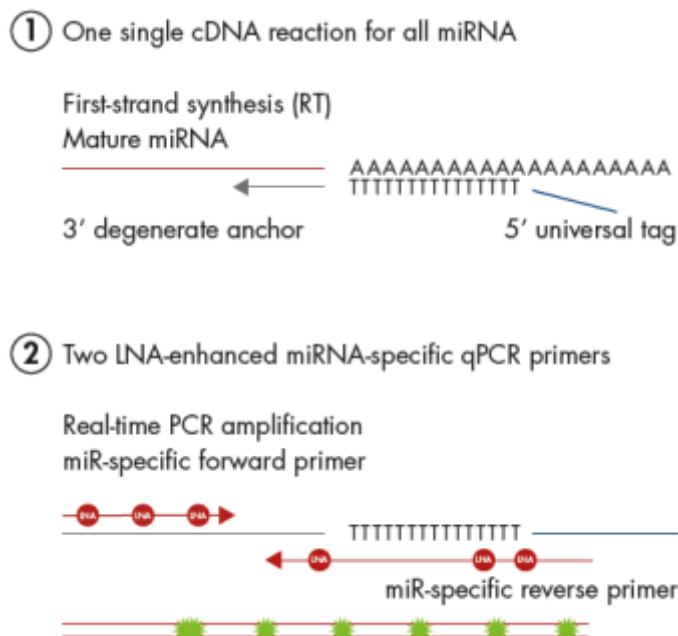
A vizsgált minták totál RNS koncentrációját Nanodrop 1000 UV-VIS spektrofotométer (Thermo Fischer Scientific Inc., Wilmington, USA) segítségével határoztuk meg. RNA-40 beállítással dolgoztunk, és az egyes mérésekhez 2 µl mintát használtunk fel. A nukleinsavak abszorpciós maximuma 260 nm-es hullámhosszon (A260) látható, az elnyelés mértékéből kiszámítható a minta nukleinsav koncentrációja. A fehérjék elnyelési maximuma 280 nm-nél van, így az A260/A280 arányból megbecsülhető a fehérjeszennyezettség mértéke. Az értéket 1,6 és 2,0 szélsőértékek között tekintjük megfelelőnek.

## Fluorométer – miRNS koncentráció meghatározása

A miRNS koncentráció specifikus meghatározáshoz a Qubit® microRNA Assay Kítet (Thermo Fischer Scientific Inc., Wilmington, USA) alkalmaztuk, mely fluoreszcens festékes jelöléssel teszi lehetővé a kis RNS-ek szelektív és pontos mérését. A leolvasáshoz a Qubit® 2.0 Fluorométert használtuk.

### 3.2.7. Valósídejű kvantitatív polimeráz lánreakció (RT-PCR)

A vizsgálni kívánt miRNS-ek szintjét RT-PCR módszerrel határoztuk meg, melynek lépései a 10. ábrán láthatóak.



**10. ábra.** Real-time PCR (Forrás: Qiagen miRCURY® LNA® miRNA PCR - Exosomes, Serum/Plasma and Other Biofluid Samples kézikönyv, 2017 október)

A mérés elve: A polimeráz lánreakciót a vizsgált nukleinsav szekvencia megsokszorozásához használjuk. A különböző mintákból izolált miRNS-ekről reverz transzkriptáz enzim segítségével cDNS-t (complementary DNS) szintetizálunk, mivel a PCR-ben működő DNS polimerázok csak DNS-templáton képesek működni. A reverz transzkriptáz egy RNS-függő DNS-polimeráz, amely az RNS templátról egy RNS/DNS



hibrid molekulát állít elő. A következő lépésekben egy ribonukleáz és egy további DNS-polimeráz közreműködésével létrejön a kétszálú cDNS lánc. A cDNS szintézis reakcióelegyhez úgynevezett RNS spike-in-t (szintetikus poliadenilált transzkriptum) adva ellenőrizhetjük a reverz transzkripció hatékonyságát, továbbá a különböző plate-ek közötti kalibrációhoz is alkalmazható.

Az átírás után végrehajtjuk az amplifikációt. A folyamat enzimes reakciók ismétlődésével, in vitro körülmények között megy végbe. A reakcióelegyben jelen van a templát cDNS, az amplifikálandó cDNS szakaszra specifikus primerek („forward” és „reverse”), a hőstabil DNS-polimeráz enzim (Taq-polimeráz), a négy dezoxiribonukleotid-trifoszfát (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) és a puffer. A reakció során a puffer biztosítja a megfelelő ionkoncentrációt, fontos alkotó eleme a  $Mg^{2+}$  ion, amely a polimeráz enzim kofaktora. A templátról képződő termék mennyisége minden ciklus során megkétszereződik, tehát koncentrációjának növekedése exponenciális.

A valós idejű kvantitatív PCR berendezések alkalmazásával ciklusról ciklusra nyomon követhető a cDNS templát felsokszorozódása, mérése fluoreszcens detektáláson alapul. A SYBR Green festék interkaláló molekula, amely a kettős szálú DNS-hez (dsDNS) kötődik a PCR reakcióelegyben. Bekötődve, adott monokróm fényel indukálva fényt bocsát ki. Az így létrejövő mérhető fluoreszcens jel nagysága a PCR folyamán sokszorozódó dsDNS mennyiségével arányosan növekszik. A fluoreszcencia mérése minden ciklusban végbemegy, így láthatóvá válik a reakció kinetikája (amplifikációs görbe). Az a ciklusszám ( $C_t$ ), amelynél a jel eléri a logaritmikus PCR fázist, a target cDNS kiindulási mennyiségének függvénye. Ennek ismeretében lehetséges a target kiindulási mennyiségének pontos mérése.

Az úgynevezett olvadáspont-analízist a termék azonosítására használjuk, mely a termékspecifikus  $T_m$  érték kimérésével lehetséges. Minden DNS fragmentumra jellemző az olvadáspontja ( $T_m$ ), mely definíció szerűen az a hőmérséklet, melyen az adott DNS fragmens 50%-a egyszálú. Az olvadáspontot leginkább befolyásoló tényezők: a fragmens G+C tartalma, valamint hossza.

A mennyiségi meghatározás történhet abszolút vagy relatív kvantifikációval. Az abszolút kvantifikáció során egy ismert koncentrációjú, úgynevezett kalibrátor mintából hígítási sort készítünk. Az egyes hígítási tagokhoz tartozó  $C_T$  értékek adják ki a standard

görbét, mely alapján egy ismeretlen minta  $C_T$  értékéből következtetni tudunk annak kiindulási mennyiségére. Relatív kvantifikációkor ( $\Delta\Delta C_T$  módszer) a meghatározandó gén/miRNS amplifikációját egy olyan referencia templáthoz viszonyítjuk, melynek expressziója a vizsgált közegben állandó. Ahhoz, hogy összehasonlíthassuk a kérdéses és a referens gén/miRNS PCR termékének kiinduló templát tartalmát, azonos amplifikációs hatékonysággal kell rendelkezniük.

### **cDNS szintézis**

Az RNS minták reverz transzkripcióját a miRCURY LNA™ Universal cDNA Synthesis Kit (Exiqon A/S, Vedbaek, Denmark) felhasználásával végeztük el, a gyártó leírásának megfelelően. A cDNS szintézis hatékonyságának ellenőrzéséhez az UniSp6 RNS spike-in-t alkalmaztuk.

A cDNS szintézis lépései:

- Reverz transzkripció master mix összeállítása: Összemérjük a cDNS szintézishez szükséges komponenseket az alábbi módon (a mennyiség egy mintára értendőek):

2  $\mu$ l 5x RT Reaction Buffer

1  $\mu$ l 10x RT Enzyme Mix

0,5  $\mu$ l UniSp6 spike-in

4,5  $\mu$ l RNáz-mentes víz

- Templát hozzáadása: A mixhez 2  $\mu$ l templát miRNS-t (5  $\mu$ g/uL) adunk, amivel elérjük a 10  $\mu$ l-es végtérfogatot.

Futtatás: A futtatást a GeneAmp® PCR System 9700 thermocyclerrel (Thermo Fischer Scientific Inc., Wilmington, USA) hajtjuk végre: a mintát először 60 percig, 37°C-on inkubáljuk, majd 5 percig 95°C-on hőinaktiváljuk a reverz transzkriptáz enzimet.

### **RT-PCR**

A RT-PCR reakciót az ExiLENT SYBR® Green master mix kit segítségével (Exiqon A/S, Vedbaek, Denmark) hajtjuk végre a vizsgált miRNS-ekre specifikus

LNA™ PCR primerek segítségével (5. táblázat). Olvadásgörbe analízis segítségével azonosítottuk az amplifikált termékeket és kizártuk a primerek nonspecifikus kötődését (pl. primer dimer stb.). A *hsa-miR-210* relatív expresszióját a ddCT módszerrel számoltuk ki, és a *hsa-miR-103a* belső kontroll miRNS-eshez normalizáltuk. A mérések során további miRNS-eket is vizsgáltunk: a *hsa-miR-16* egy a vérben abundáns, főleg a vörösvértestekből felszabaduló miRNS (Pritchard és mtsai 2012), míg a *hsa-mir-517c* a C19MC miRNS család tagja, és kizárólag a placentában expresszálódik (Noguer-Dance és mtsai 2010).

A placentaszövet és sejttenyészetek esetén 1:80, a precipitációs kittel izolált exoszómáknál 1:40, a membrán-affinitás módszerrel izolált exoszóma és non-vesiculáris RNS-ből átírt cDNS mintáknál 1:10 arányú hígítást alkalmaztunk.

#### 5. táblázat. A vizsgált miRNS-ek adatai

Teljes miRNS név	miRBase azonosító	Seed szekvencia
<i>hsa-miR-210-3p</i>	MIMAT0000267	5'-CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA-3'
<i>hsa-miR-16-5p</i>	MIMAT0000069	5'-UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG-3'
<i>hsa-miR-517c-3p</i>	MIMAT0002866	5'-AUCGUGCAUCCUUUUAGAGUGU-3'
<i>hsa-miR-103a-3p</i>	MIMAT0000101	5'-AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA-3'

A RT-PCR lépései:

- PCR mix összeállítása: Összemérjük a PCR reakcióhoz szükséges komponenseket az alábbi módon (a mennyiség egy mintára értendőek):

5 µl 2x miRCURY SYBR Green Master Mix

1 µl PCR primer mix

0,5 µl ROX referencia festék (ABI StepOne™)

- Templát hozzáadása: A mixhez 4 µl / 3,5 µl hígított cDNS-t adunk, amivel elérjük a 10 µl-es végtérfogatot.
- Futtatás: A kutatás kezdeti szakaszán a futtatásokhoz az üvegapilláris alapú LightCycler® 1.0 qPCR-t (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország)

használtuk, majd később áttértünk az Applied Biosystems StepOne™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) PCR-plate-s platformra. A méréseket ebben az esetben nagy koncentrációjú ROX festék alkalmazásával egészítettük ki.

- A LightCycler qPCR adatok feldolgozását a Light Cycler® 4.05 szoftverrel végeztük el, majd a kapott Ct értékeket a Microsoft Excel programmal összegeztük és normalizáltuk. A StepOne qPCR amplifikációs görbék elemzését, a nyers Ct értékek meghatározását és normalizálását a StepOne™ Real-Time PCR System szoftverrel végeztük el.

### 3.2.8. Statisztika

A statisztikai elemzések elvégzéséhez a STATISTICA analitikai szoftvercsomagot (Statistica, Tulsa, Oklahoma, USA) és az R statisztikai nyelvet használtuk. A folytonos változók normalitásának felmérésére Shapiro-Wilk W tesztet alkalmaztunk

## II. Vizsgálat

A vizsgált csoportok különböző anyai és magzati faktorai (anyai életkor, gesztációs kor mintavételkor illetve szüléskor, magzati súly) normális eloszlásúak voltak, így egymáshoz való viszonyításukhoz egyszempontos variancia-analízist (ANOVA) végeztünk. Az értékeket átlag  $\pm$  SD formában adtuk meg. Mivel sem az össz-miRNS koncentráció, sem a relatív *hsa-miR-210* expressziós értékek nem követtek normális eloszlást, az adatok statisztikai elemzéséhez nem-paraméteres teszteket alkalmaztunk. A csoportok összehasonlításához Kruskal-Wallis-féle ANOVA-t használtuk, post-hoc tesztként az átlagos rangszámok többszörös összehasonlítását végeztük el. Az értékeket medián és interkvartilis tartomány formájában jelöltük. Az expressziós és a koncentrációbéli különbségek kifejezésére „foldchange” (FC) arányt számítottunk: az  $FC > 2$  érték jelentős emelkedésnek, az  $FC < 0,5$  jelentős csökkenésnek volt megfeleltethető. A *hsa-miR-210* expresszió és az össz-miRNS koncentráció közötti lehetséges kapcsolat felderítésére Spearman Rank Order korrelációs értéket számoltunk.

### III/1. Vizsgálat

A két vizsgált csoport különböző anyai és magzati faktorai (anyai életkor, gesztációs kor mintavételkor illetve szüléskor, magzati súly) normális eloszlást követtek, így összehasonlításukat Student-féle kétmintás t-tesztel végeztük el. Az értékeket átlag  $\pm$  SD formában adtuk meg. A vizsgált miRNS-ek expressziós értékei nem feleltek meg a normális eloszlás követelményeinek, így a csoportok közötti összehasonlítást Mann-Whitney U tesztel végeztük el.

### III/2. Vizsgálat

A sejtenyészeten végzett mérések miRNS expressziós értékei logaritmusos transzformációt követően normális eloszlásúak voltak, összehasonlításukat Student-féle kétmintás t-tesztel végeztük el. Az eredményeket „relative quantity” (RQ)  $\pm$  SE formában fejeztük ki, ami a kontroll kezelés átlagához viszonyított linearizált értéknek felelt meg.

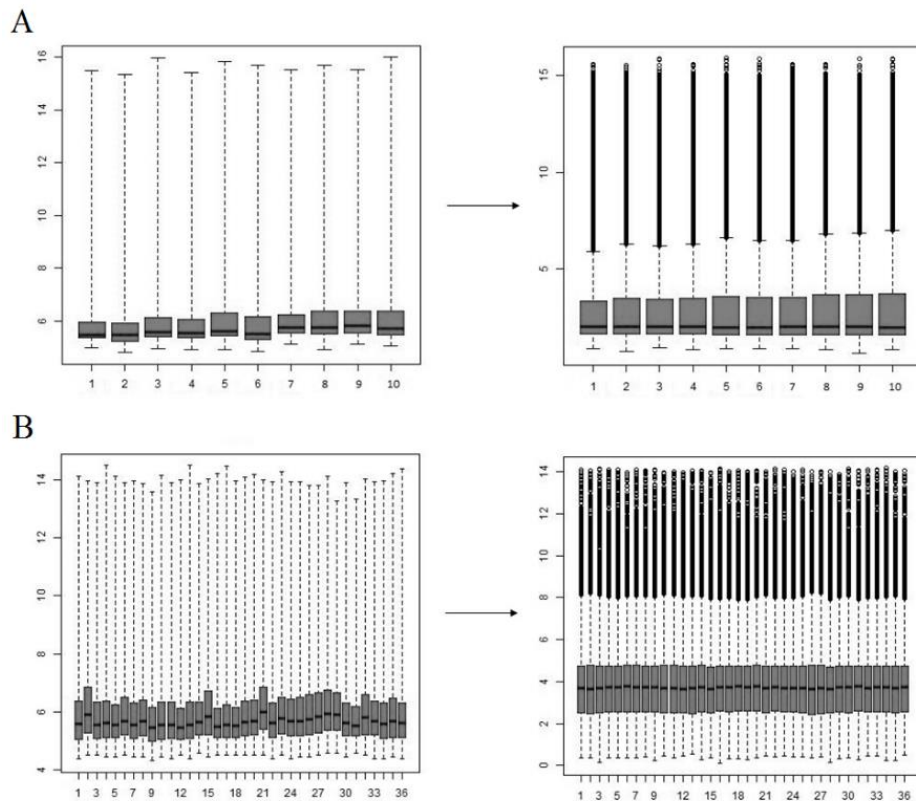
Minden vizsgálatnál a  $p < 0,05$  értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak (\*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ ). A vér- és placentaszöveten végzett vizsgálatok eredményeit box-plot segítségével ábrázoltuk, ahol a kiugró és extrém értékeket külön jelöltük. A korrelációs analízis eredményét szórásdigrammal szemléltettük. A sejtenyészeten végzett mérések eredményeit oszlopdiagrammal demonstráltuk.

## 4. Eredmények

### 4.1. miRNS-mRNS hálózat

#### 4.1.1. miRNS és mRNS expressziós adatok feldolgozása

A nyers miRNS és mRNS expressziós adathalmazok minőségi ellenőrzésével majd normalizálásával kapott adatok megfelelőnek bizonyultak a további elemzéshez (11. ábra). A normalizált adathalmazok további szűrése az 1105 humán érett miRNS-próba 704-re, és a 40716 gén-próba 26808-ra való leszűkítését eredményezte.



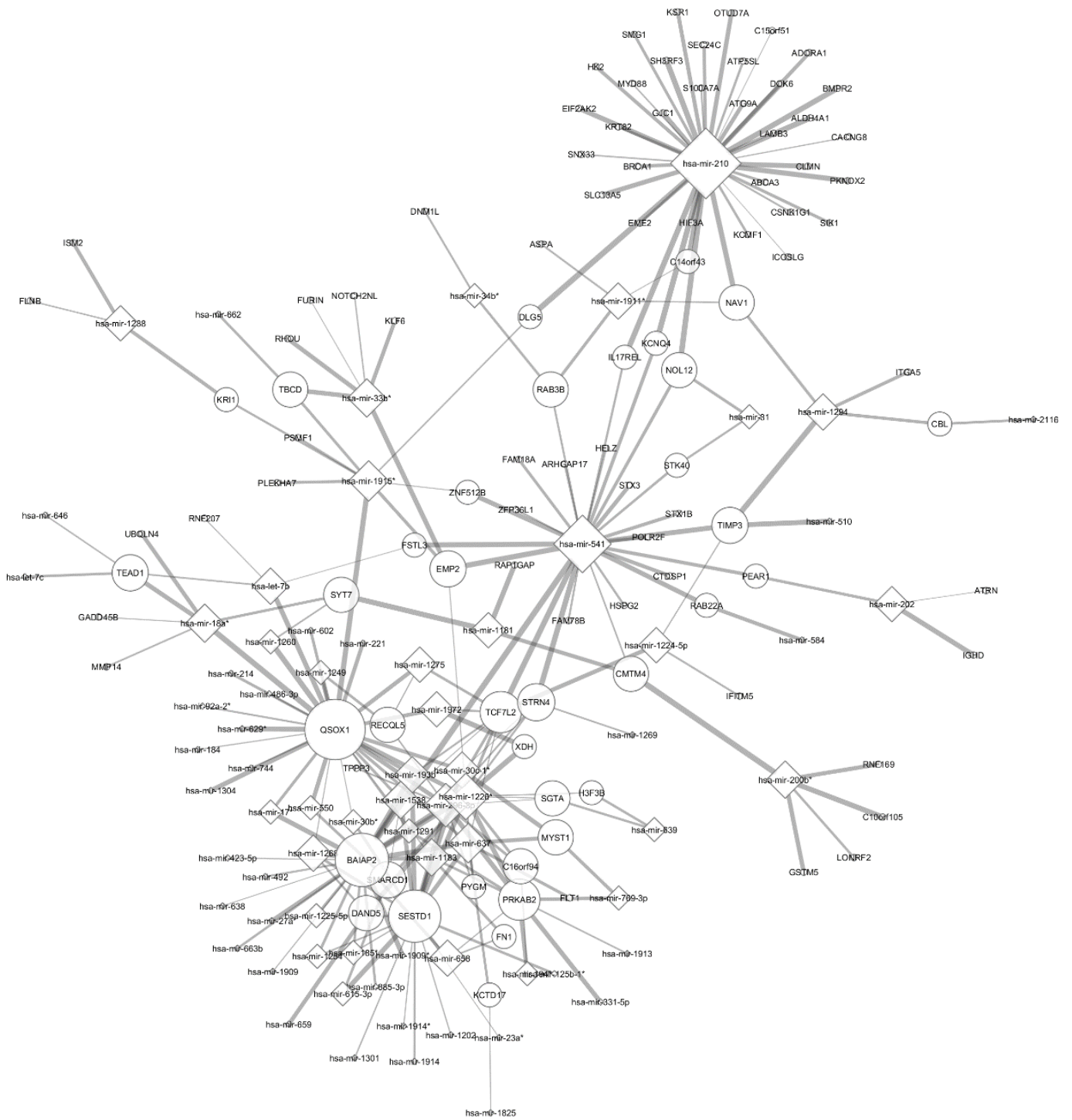
**11. ábra.** Az adatok normalizálásának hatása. A. miRNS microarray B. gén microarray. Jobb oldal: nyers adatok, baloldal: normalizált adatok. X tengely: placenta minták, y tengely: expressziós tartomány.

A differenciális génexpressziós analízis elvégzésével megkaptuk a beteg- és kontrollcsoportban eltérően expresszálódó miRNS-ek listáját. A praeclampsziás csoportban szignifikáns túlsúlyban lévő ( $FC > 2$ ,  $p < 0,05$ ) miRNS-ek közé tartozott a *hsa-mir-187*, *hsa-mir-210*, *hsa-mir-1181*, *hsa-mir-943*, *hsa-mir-33b\**, *hsa-mir-466* és a *hsa-*

*mir-1238*; míg a *hsa-mir-202*, *hsa-mir-628-5p*, *hsa-mir-488*, *hsa-mir-548u*, *hsa-mir-603*, *hsa-mir-200b\** és a *hsa-mir-450b* erősen alulreprezentáltak bizonyultak ( $FC < 0,5$ ,  $p < 0,05$ ).

#### **4.1.2. A miRNS-mRNS interakciós hálózat felépítése**

Összesen 52603 miRNS-mRNS interakciót generált a MAGIA webes algoritmus. A küszöbérték állításával az interakciókat 15650-re szűkítettük  $q < 0,1$ , 3564-re  $q < 0,01$ , 1670-re  $q < 0,001$ , és 80-ra  $q < 0,0001$  szinten. A legerősebb 250 interakciót vizualizáltuk, és ezek közül a  $q < 0,0001$  értékű párokat elemeztük az FDR minimalizálása érdekében. A legjelentősebb találatok 85 csomópontot (33 miRNS-t és 52 szabályozott gént) és 80 interakciót foglaltak magukban. A 12. ábrán látható a beteg és kontroll csoportban eltérően expresszálódó miRNS-ek és prediktált célpont génjeik által alkotott hálózat. A vonalak vastagsága jelzi a szabályozási kapcsolat valószínűségét, és a csomópontok mérete arányos a fokszámmal.



**12. ábra.** miRNS-mRNS interakciós hálózat. Jelölések: miRNS: négyzet, mRNS: kör. A vonalvastagság a kapcsolat valószínűségét fejezi ki, a csomópontok nagysága a fokszámmal arányos.



#### 4.1.3. A miRNS-mRNS hálózat elemeinek funkcionális vizsgálata

Az 52 gén közül 11-et korábban már összefüggésbe hoztak praeclampsiaival: ATG9A (Kojima és mtsai 2015), BMPR2 (Nagashima és mtsai 2013), DLG5 (Saben és mtsai 2014), EMP2 (Williams és mtsai 2017), FSTL3 (Guo és mtsai 2012), KCNQ4 (Mistry és mtsai 2011), KLF6 (Racca és mtsai 2015), TCF7L2 (Lian és mtsai 2013), TIMP3 (Xiang és mtsai 2013), QSOX1 (Tejera és mtsai 2013) és XDH (Many és mtsai 2000). A VarElect analízis alapján 8 gén közvetlenül kapcsolható hypertóniához, ezek a BMPR2, GSTM5, KLF6, SLC7A11, TBCD, TCF7L2, TIMP3 és XDH. Az EMP2 proteinúriával asszociált, és 9 gén összefüggésbe hozható szív- és érrendszeri megbetegedésekkel. A többszörös találatok között szerepelt még egyebek mellett a cukorbetegség és az elhízás is.

Kilenc gén többszörös miRNS szabályozás alatt áll, ezek a QSOX1, BAIAP2, SESTD1, PRKAB2, TIMP3, CMTM4, DAND5, EMP2 és XDH csökkenő fozszámú sorrendben (6. táblázat). Közülük kettőt, a TIMP3-at és a CMTM4-et, kóros placentában gyengén expresszálódó miRNS-k szabályozzák, ami fokozott mRNS kifejeződést idéz elő. A további 7 gén túlexpresszálódó miRNS-ekkel áll kapcsolatban, ami lefelé irányuló szabályozást eredményez. A Malacard annotációk alapján feltételezhető, hogy a QSOX1 és a BAIAP2 közvetve, míg a TIMP3 és az XDH közvetlenül kapcsolódik praeclampsiaához.

**6. táblázat.** A hálózatban egynél több miRNS által szabályozott gének. ↓: a miRNS túlexpressziója a target downregulációját okozza, ↑: a miRNS alulexpressziója a target upregulációját okozza

célgén	fokszám	szabályozó miRNS-ek	hatás	VarElect (pontszám)	Malacard (pontszám)
QSOX1	10	<i>hsa-mir-1226*</i> , <i>hsa-mir-1249</i> , <i>hsa-mir-1260</i> , <i>hsa-mir-1275</i> , <i>hsa-mir-1304</i> , <i>hsa-mir-18a*</i> , <i>hsa-mir-1915*</i> , <i>hsa-mir-296-3p</i> , <i>hsa-mir-550</i> , <i>hsa-mir-629*</i>	↓	-	hypoxia (0,113)
BAIAP2	8	<i>hsa-mir-1226*</i> , <i>hsa-mir-1538</i> , <i>hsa-mir-17*</i> , <i>hsa-mir-1909*</i> , <i>hsa-mir-193b*</i> , <i>hsa-mir-27a*</i> , <i>hsa-mir-296-3p</i> , <i>hsa-mir-637</i>	↓	-	hypoxia (0,113)
SESTD1	7	<i>hsa-mir-1226*</i> , <i>hsa-mir-1538</i> , <i>hsa-mir-193b*</i> , <i>hsa-mir-296-3p</i> , <i>hsa-mir-30c-1*</i> , <i>hsa-mir-615-3p</i> , <i>hsa-mir-637</i>	↓	-	-
PRKAB2	4	<i>hsa-mir-1226*</i> , <i>hsa-mir-194*</i> , <i>hsa-mir-296-3p</i> , <i>hsa-mir-331-5p</i>	↓	cukorbetegség (2,12)	-
TIMP3	3	<i>hsa-mir-1294</i> , <i>hsa-mir-510</i> , <i>hsa-mir-541</i>	↑	magas vérnyomás (1,08), szívelégtelenség (7,37), cukorbetegség (5,37), elhízás (2,96)	praeclampsia (0,070), eclampsia (0,070), hypoxia (0,070)
CMTM4	2	<i>hsa-mir-1181</i> , <i>hsa-mir-200b*</i>	↑	-	-
DAND5	2	<i>hsa-mir-1226*</i> , <i>hsa-mir-659</i>	↓	cukorbetegség (2,27)	-
EMP2	2	<i>hsa-mir-33b*</i> , <i>hsa-mir-541</i>	↓	proteinuria (2,23)	endometrium carcinoma (0,102)
XDH	2	<i>hsa-mir-1226*</i> , <i>hsa-mir-1972</i>	↓	magas vérnyomás (6,41), szívelégtelenség (16,87), cukorbetegség (3,68), elhízás (1,74)	enyhe praeclampsia (2,876)

A 33 miRNS közül 9 irodalmi adatok alapján szerepet játszik praeeclampsiában: *hsa-miR-17\** (Wang és mtsai 2012), *hsa-miR-18a\** (Harapan és Andalas 2015), *hsa-miR-193b\** (Harapan és Andalas 2015), *hsa-miR-200b* (Chan és mtsai 2011), *hsa-miR-296-3p* (Harapan és Andalas 2015), *hsa-miR-210* (Sheikh és mtsai 2016), *hsa-miR-27a\** (Song és mtsai 2015), *hsa-miR-33b\** (Gunel és mtsai 2017) és *hsa-miR-637* (Cross és mtsai 2015). 13 miRNS több mRNS-t is szabályozhat: *hsa-mir-210*, *hsa-mir-1226\**, *hsa-mir-1263*, *hsa-mir-541*, *hsa-mir-200b\**, *hsa-mir-296-3p*, *mir-33b\**, *hsa-mir-18a\**, *hsa-mir-1181*, *hsa-mir-1538*, *hsa-mir-193b\**, *hsa-mir-30c-1\** és *hsa-mir-637* csökkenő fokszámú sorrendben (7. táblázat). Ezek közül három, a *hsa-mir-1263*, a *hsa-mir-541* és a *hsa-mir-200b\** kóros placentában kisebb mennyiségben van jelen, ezért a célpontjaik fokozottan expresszálódnak. A többi miRNS túlexpresszálódik, ami az általuk szabályozott mRNS-ek szintjének csökkenéséhez vezet.

**7. táblázat.** A hálózatban egynél több gént szabályozó miRNS-ek. ↓: a miRNS túlexpressziója a target downregulációját okozza, ↑: a miRNS alulexpressziója a target upregulációját okozza. FC: fold change.

miRNS	fokszám	célpontok	FC	hatás
<i>hsa-mir-210</i>	17	ALDH4A1, ATG9A, BMPR2, C14orf43, CLMN, DLG5, DOK6, EIF2AK2, GJC1, IL17REL, KCNQ4, NAV1, NOL12, OTUD7A, PKNOX2, SH3RF3, SLC13A5	2,55	↓
<i>hsa-mir-1226*</i>	6	BAIAP2, DAND5, PRKAB2, QSOX1, SESTD1, XDH	1,57	↓
<i>hsa-mir-1263</i>	6	FERIL4, NFASC, PCNX, SLC35E4, ST6GAL2, TFCP2L1	0,19	↑
<i>hsa-mir-541</i>	6	FSTL3, RAB22A, STRN4, STX3, TIMP3, ZNF512B	0,49	↑
<i>hsa-mir-200b*</i>	4	C10orf105, CMTM4, GSTM5, RNF169	0,49	↑
<i>hsa-mir-296-3p</i>	4	BAIAP2, PRKAB2, QSOX1, SESTD1	1,56	↓
<i>hsa-mir-33b*</i>	4	EMP2, KLF6, RHO, TBCD	2,24	↓
<i>hsa-mir-18a*</i>	3	QSOX1, TEAD1, UBQLN4	2,02	↓
<i>hsa-mir-1181</i>	2	RAP1GAP, SYT7	2,18	↓
<i>hsa-mir-1538</i>	2	BAIAP2, SESTD1	1,5	↓
<i>hsa-mir-193b*</i>	2	BAIAP2, SESTD1	1,81	↓
<i>hsa-mir-30c-1*</i>	2	MYST1, SESTD1	1,5	↓
<i>hsa-mir-637</i>	2	BAIAP2, SESTD1	1,5	↓

A génontológiai annotáció elvégzésekor magas klasszifikációs restriktiót és  $p < 0,1$  küszöbszintet állítottunk be. Az eredményül kapott GO-kifejezések alapján az eltérően expresszálódó miRNS-ek főként fejlődési folyamatokban résztvevő géneket szabályoznak: multicelluláris organizmusfejlődés ( $p = 3,86E-03$ ), rendszerfejlődés ( $p = 4,63E-03$ ), anatómiai struktúrafejlődés ( $p = 9,32E-03$ ) stb. A szabályozott gének sejttösszetevői leginkább a sejtmembránhoz tartoznak ( $p = 3.80E-02$ ) (8. táblázat).

**8. táblázat.** Az eltérően expresszálódó miRNS-ek génontológiai (GO) annotációja. Rövidítések: BP: biológiai útvonal, MF: molekuláris funkció, CC: sejtkomponens.

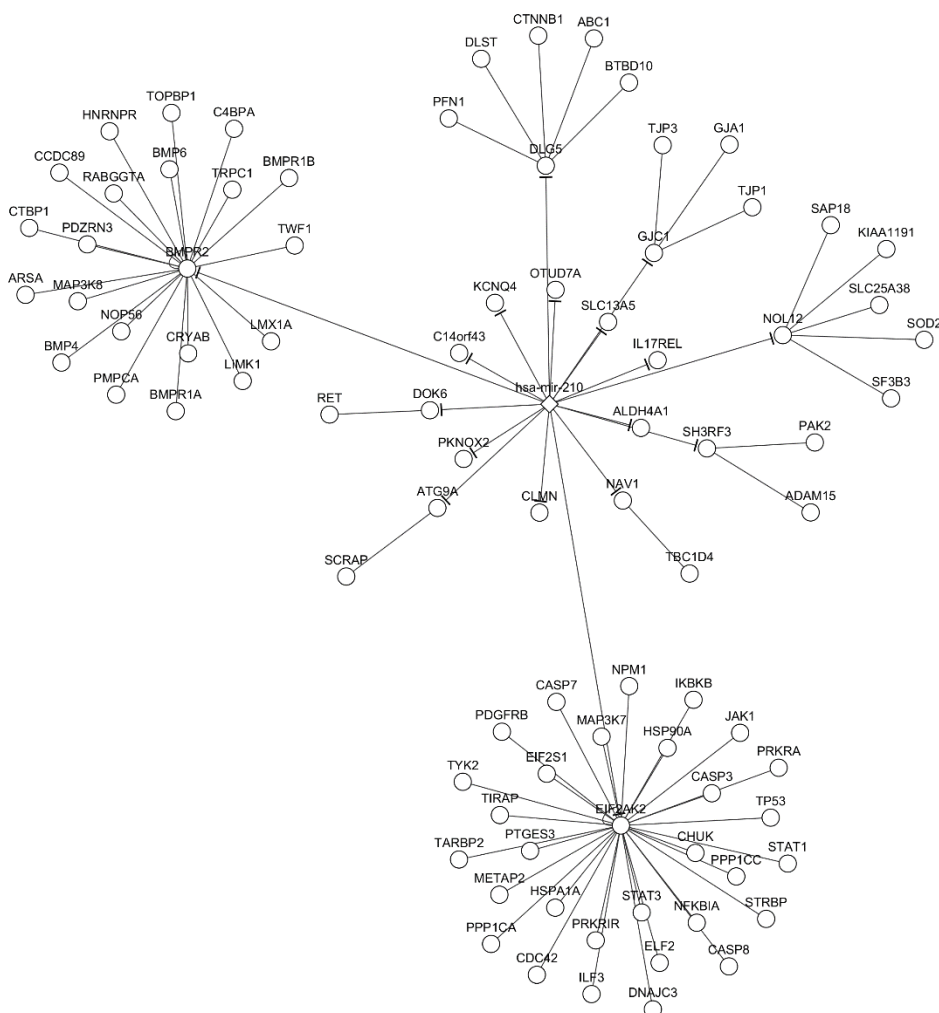
GO kategória	Folyamat	miRNS-ek száma	p-érték
BP	többsejtű szervezet fejlődése	16	3,86E-03
BP	rendszer fejlődés	14	4,63E-03
BP	anatómiai struktúrák fejlődése	14	9,32E-03
BP	fejlődési folyamatok	16	9,65E-03
BP	biológiai folyamatok negatív szabályozása	11	1,56E-02
BP	sejtes folyamatok negatív szabályozása	10	2,47E-02
BP	sejtfejlődés	6	2,53E-02
BP	szervfejlődés	10	3,22E-02
BP	anatómiai struktúrák morfogenezise	8	3,36E-02
BP	sejt differenciáció	9	5,80E-02
BP	sejtes fejlődési folyamat	9	7,08E-02
BP	éhezésre adott sejtes válasz	2	8,06E-02
BP	válasz külső ingerre	6	8,83E-02
BP	sebggyógyulás	3	8,91E-02
BP	válasz tápanyagszintekre	3	9,39E-02
CC	membrán összetevő	26	3,80E-02
CC	külső membrán	5	5,03E-02
CC	sejt-sejt kapcsolat	5	5,80E-02
CC	membrán	27	6,94E-02

#### 4.1.4. miRNS szabályozott fehérje-fehérje interakciós hálózatok

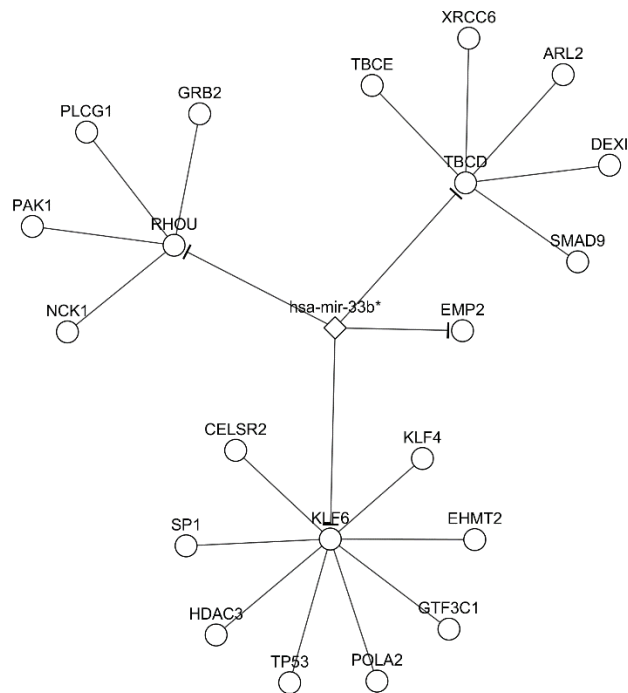
A két legjelentősebb kórosan megemelkedett miRNS, a *hsa-miR-210* és a *hsa-mir-33b\**, fehérje-kódoló célpontjaiból interakciós hálózatokat hoztunk létre. A célpontok közvetlen fehérje-fehérje kölcsönhatásait a HPRD adatbázisban végzett keresésből kaptuk meg:

A *hsa-miR-210* által szabályozott fehérje-fehérje interakciós hálózatban 101 kölcsönhatásba lépő fehérje közül 70 expresszálódik a placentában (13.A ábra). A hálózat 87 csomópontból áll, köztük 1 miRNS, 17 közvetlenül szabályozott és 69 közvetett módon szabályozott gén. Két csomópont, a *BMPR2* és az *EIF2AK2* kiemelkedő a fehérje kölcsönhatások számának tekintetében.

A *hsa-miR-33b\** szabályozása alatt álló fehérje-fehérje interakciós hálózatban a 20 fehérje közül 17 megtalálható a placentában (13.B ábra). A hálózat 22 csomópontból áll, köztük 1 miRNS, 4 direkt és 17 indirekt szabályozott gén. A csomópontok közül a *KLF4* rendelkezik a legtöbb fehérje kölcsönhatással.



**13.A ábra.** A *hsa-miR-210* által szabályozott fehérje-fehérje interakciós hálózat. miRNS: háromszög, mRNS: kör, —|: miRNS-mRNS interakció, —: fehérje-fehérje interakció



**13.B ábra.** A *hsa-miR-33b\** által szabályozott fehérje-fehérje interakciós hálózat. miRNS: háromszög, mRNS: kör, —|: miRNS-mRNS interakció, —: fehérje-fehérje interakció

#### 4.2 Az exoszómális össz-miRNS koncentráció és a *hsa-miR-210* expressziós profilja különböző típusú terhességi magas vérnyomásos kórképekben

A különböző csoportok anyai és magzati tényezői a 9. táblázatban kerültek részletezésre.

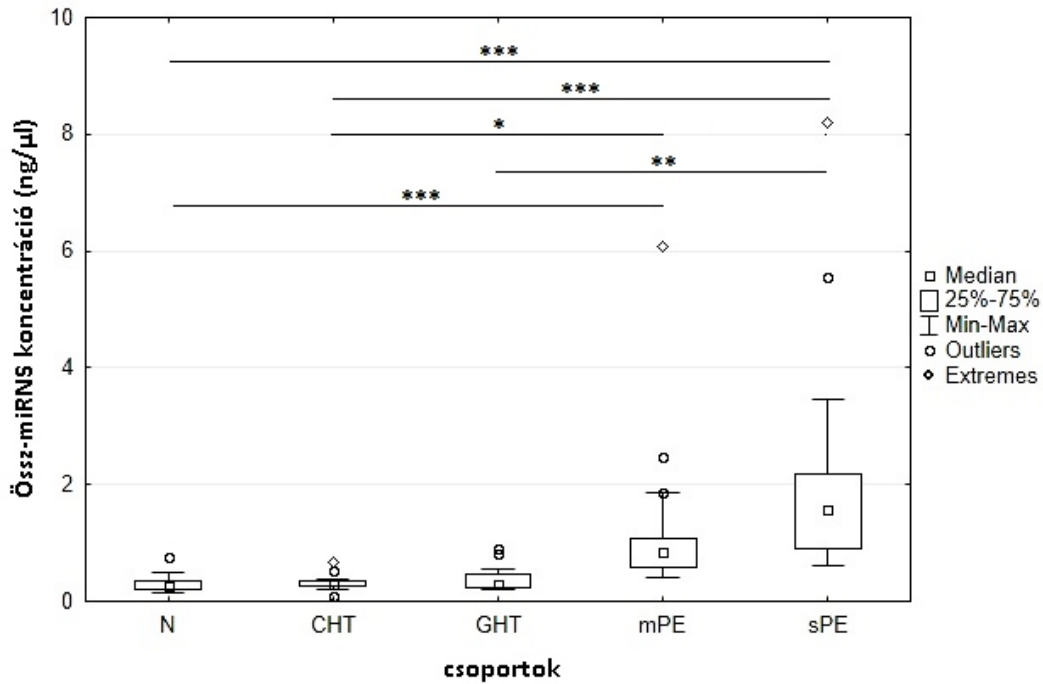
**9. táblázat.** A plazmaminták beteg- és kontrollcsoport jellemzői. A folytonos változók értékei átlag  $\pm$  SD formában szerepelnek. A kategorikus változó (IUGR) értékét abszolút szám (%) formájában adtuk meg.

	N	CHT	GHT	mPE	sPE	p
<b>mintaszám (n)</b>	34	16	14	15	19	
<b>anyai életkor (év)</b>	30,96 $\pm$ 4,16	33,00 $\pm$ 4,24	33,54 $\pm$ 4,47	28,92 $\pm$ 5,86	31,47 $\pm$ 6,96	>0,05
<b>gestációs kor vérvételkor (hét)</b>	35,79 $\pm$ 2,35	32,63 $\pm$ 6,29	35,46 $\pm$ 3,48	33,09 $\pm$ 4,35	31,33 $\pm$ 4,94	<0,05
<b>gestációs kor szüléskor (hét)</b>	38,87 $\pm$ 1,13	37,02 $\pm$ 4,25	36,91 $\pm$ 3,74	36,46 $\pm$ 2,93	31,30 $\pm$ 5,03	<0,05
<b>születési súly (g)</b>	3524 $\pm$ 592	3118 $\pm$ 772	2922 $\pm$ 991	2521 $\pm$ 770	1593 $\pm$ 950	<0,05
<b>IUGR</b>	0 (0%)	4 (25%)	3 (21,43%)	3 (20%)	7 (36,84%)	

##### 4.2.1 Össz-miRNS koncentráció

Az exoszómális össz-miRNS koncentráció medián értéke a kóros alcsoportokban és a kontrollcsoportban a következők voltak: N: 0,26 ng/ $\mu$ l (0,10-0,76 ng/ $\mu$ l); GHT: 0,28 ng/ $\mu$ l (0,16-0,91 ng/ $\mu$ l); CHT: 0,30 ng/ $\mu$ l (0,22-0,38 ng/ $\mu$ l); mPE: 0,83 ng/ $\mu$ l (0,42-1,85 ng/ $\mu$ l); sPE: 1,57 ng/ $\mu$ l (0,25-8,21 ng/ $\mu$ l). Az eredményeket az 14. ábrán box-plot diagram segítségével szemléltettük. Jelentős szintkülönbséget ( $FC > 2$ ) csak a PE csoportokban figyeltünk meg, az össz-miRNS koncentráció mPE esetén háromszorosa ( $FC = 3,19$ ,  $p < 0,001$ ), míg sPE esetén hatszor nagyobbak ( $FC = 6,03$ ,  $p < 0,001$ ) adódott, mint a normotenzív csoportban. Jelentős különbség mutatkozott továbbá a CHT és az mPE/sPE ( $p < 0,05/p < 0,001$ ), valamint a GHT és az sPE csoport között ( $p < 0,01$ ). A de novo és a ráarakódásos PE nem volt elkülöníthető az össz-miRNS koncentráció alapján, és a társult IUGR nem volt szignifikáns hatással az érintett csoportokra.

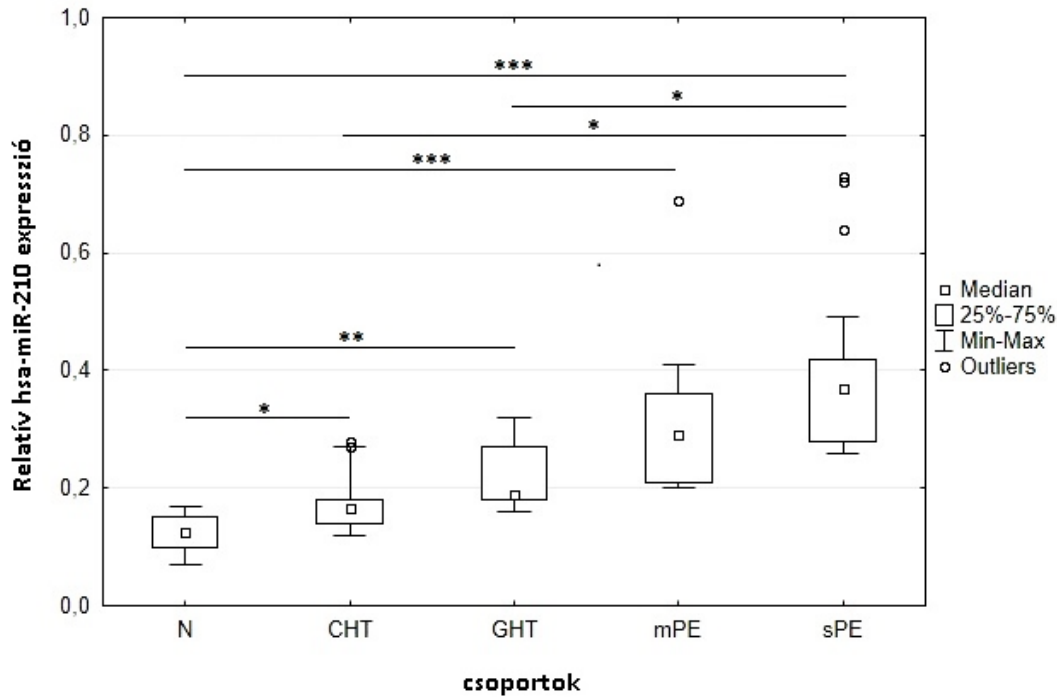




**14. ábra.** Az össz-miRNS koncentráció összehasonlítása a különböző csoportokban box-plot ábrázolással. A csoportok érték szerinti növekvő sorrendben: N: normotenzív, CHT: chronicus hypertonia, GHT: gestatos hypertonia, mPE: enyhe praeclampsia, sPE: súlyos praeclampsia. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ .

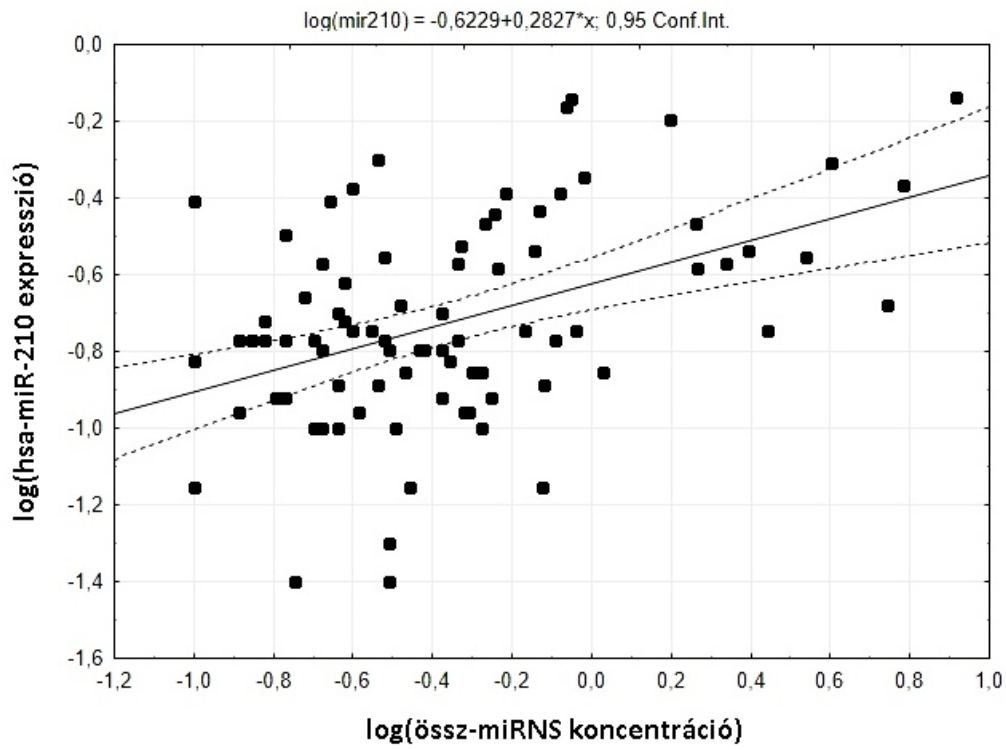
#### 4.2.2 Exoszómális *hsa-miR-210* expresszió

A relatív exoszómális *hsa-miR-210* expresszió jelentős eltérést mutatott a kóros és kontroll csoportok között: N: 0,13 (0,10-0,17); CHT: 0,17 (0,13-0,25); GHT: 0,23 (0,17-0,30); mPE: 0,29 (0,20-0,41); sPE: 0,37 (0,26-0,49). Az eredményeket az 15. ábrán box-plot diagram segítségével jelenítettük meg. Szignifikáns túlexpressziót az mPE (FC = 2,23,  $p < 0,001$ ) és az sPE csoportokban (FC = 2,85,  $p < 0,001$ ) figyeltünk meg, a másik két betegcsoportban enyhe emelkedés volt tapasztalható a kontrollcsoportéhoz képest (CHT: FC = 1,31,  $p < 0,05$ ; GHT: FC = 1,77,  $p < 0,01$ ). Jelentős különbség adódott a CHT illetve GHT és a sPE csoport között ( $p < 0,05$ ). A de novo és a ráakódásos PE nem volt megkülönböztethető a relatív *hsa-miR-210* expresszió alapján (0,34 (0,14-0,73) vs. 0,26 (0,16-0,64),  $p > 0,05$ ), és IUGR esetén nem volt tapasztalható szignifikáns eltérés.



**15. ábra.** A relatív *hsa-miR-210* expresszió összehasonlítása a különböző csoportokban box-plot ábrázolással. A csoportok érték szerinti növekvő sorrendben: N: normotenzív, CHT: chronicus hypertonia, GHT: gestatio hypertonia, mPE: enyhe praeclampsia, sPE: súlyos praeclampsia. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ .

Az exoszómális össz-miRNS koncentráció és a *hsa-miR-210* expresszió között pozitív korrelációt találtunk a betegcsoportokban ( $R = 0,41$ ,  $p < 0,05$ ), míg a kontroll csoportban nem volt kapcsolat a vizsgált tényezők között. Az összefüggést az adatok logaritmikus transzformációja után szórásdiagramon ábrázoltuk (16. ábra).



**16. ábra.** Pozitív korreláció az exoszómális össz-miRNS koncentráció és a *hsa-miR-210* expresszió között a vizsgált betegcsoportokban ( $R= 0,4073$ ,  $p= 0,002$ )

### 4.3 Exoszómális és Ago-kötött *hsa-miR-210* szekréció praeclampszában

A vizsgált placenta- és plazmaminták csoportonkénti anyai és magzati tényezői a 10. és 11. táblázatban kerültek részletezésre.

**10. táblázat.** A placentaminták beteg- és kontrollcsoport jellemzői. Az értékek átlag  $\pm$  SD formában szerepelnek.

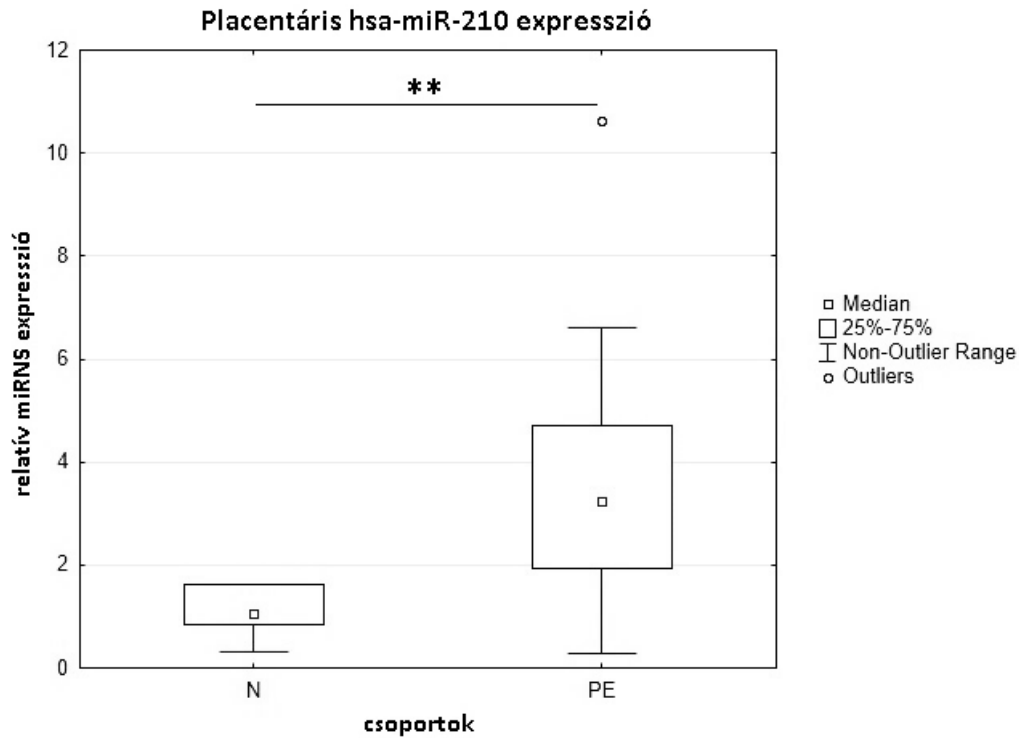
	<b>N</b>	<b>PE</b>	<b>p</b>
<b>mintaszám (n)</b>	7	13	
<b>anyai életkor (év)</b>	30,29 $\pm$ 6,16	33,67 $\pm$ 5,43	>0,05
<b>gesztációs kor szüléskor (hét)</b>	38,14 $\pm$ 0,69	30,39 $\pm$ 4,59	<0,05
<b>születési súly (g)</b>	3446,67 $\pm$ 525,23	1529,00 $\pm$ 990,75	<0,05

**11. táblázat.** A plazmaminták beteg- és kontrollcsoport jellemzői. Az értékek átlag  $\pm$  SD formában szerepelnek.

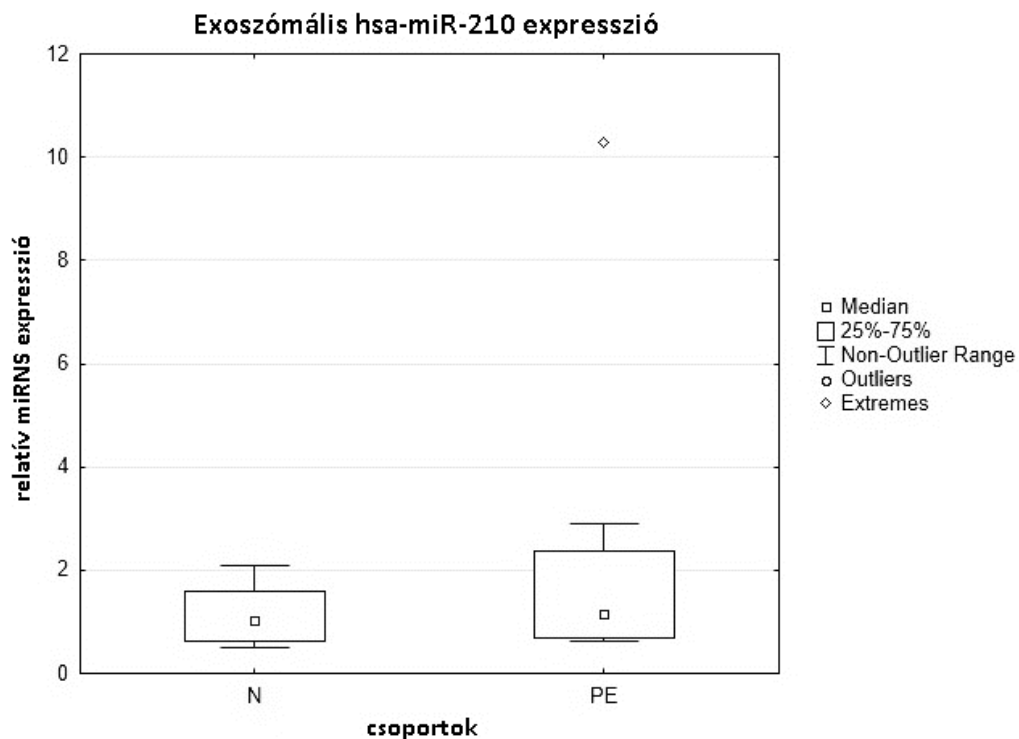
	<b>N</b>	<b>PE</b>	<b>p</b>
<b>mintaszám (n)</b>	8	8	
<b>anyai életkor (év)</b>	31,25 $\pm$ 5,80	33,43 $\pm$ 6,48	>0,05
<b>gesztációs kor vérvételkor (hét)</b>	36,13 $\pm$ 3,00	31,00 $\pm$ 5,07	<0,05
<b>gesztációs kor szüléskor (hét)</b>	37,38 $\pm$ 1,85	31,13 $\pm$ 5,17	<0,05
<b>születési súly (g)</b>	3313,75 $\pm$ 569,69	1798,29 $\pm$ 1254,50	<0,05

#### 4.3.1 *hsa-miR-210* expressziós profil placentában és különböző plazma frakciókban

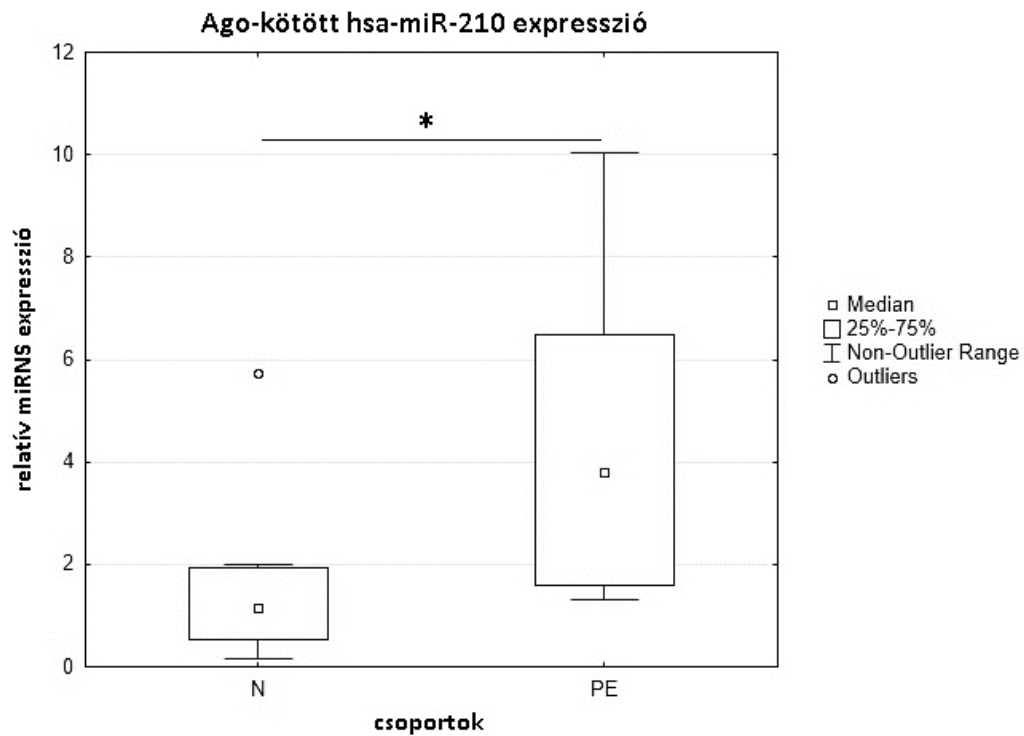
A placentamintákban mért *hsa-miR-210* szint szignifikánsan magasabb volt PE-ban a kontrollcsoportéhoz képest: 1,06 (0,84-1,62) vs. 3,26 (1,94-4,72),  $p < 0,05$  (17.A ábra). Az exoszómális *hsa-miR-210* expresszió enyhe emelkedést mutatott: 1,03 (0,62-1,60) vs. 1,14 (0,68-2,36),  $p > 0,05$  (17.B ábra), míg az Ago-kötött *hsa-miR-210* esetében szignifikáns túlexpressziót mértünk a betegcsoportban: 1,16 (0,54-1,93) vs. 3,80 (1,61-6,50),  $p < 0,05$  (17.C ábra).



**17.A ábra.** Placentáris *hsa-miR-210* expresszió N és PE csoportokban. N: normotenzív, PE: praeeclampsia, \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ .

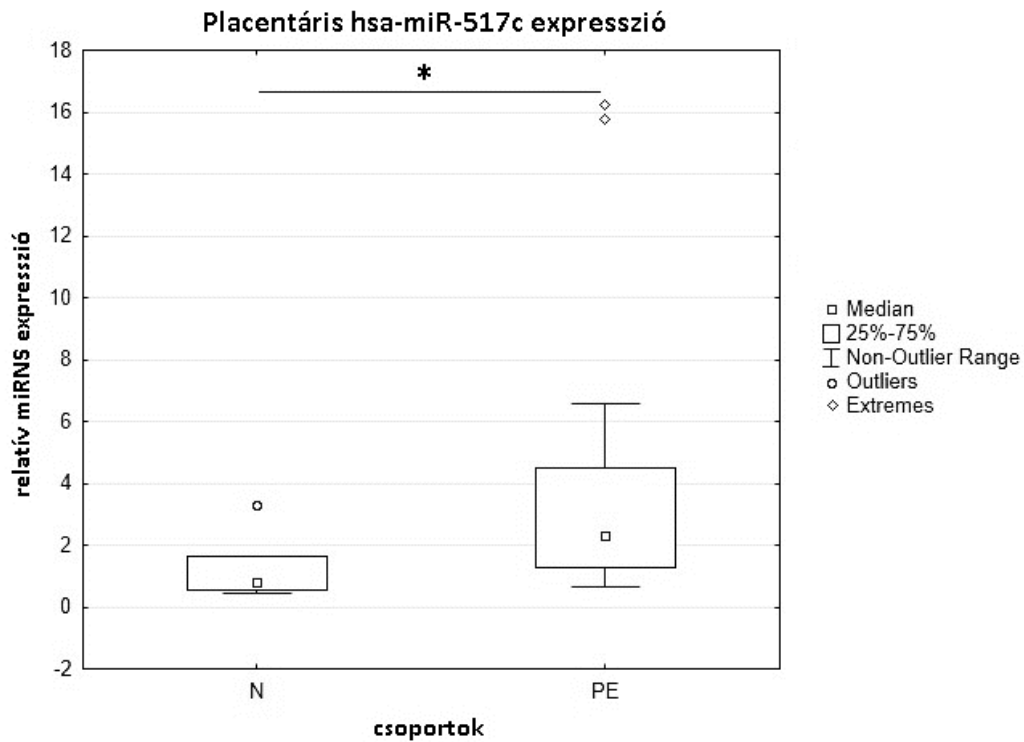


**17.B ábra.** Exoszómális *hsa-miR-210* expresszió N és PE csoportokban. N: normotenzív, PE: praeeclampsia, \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ .

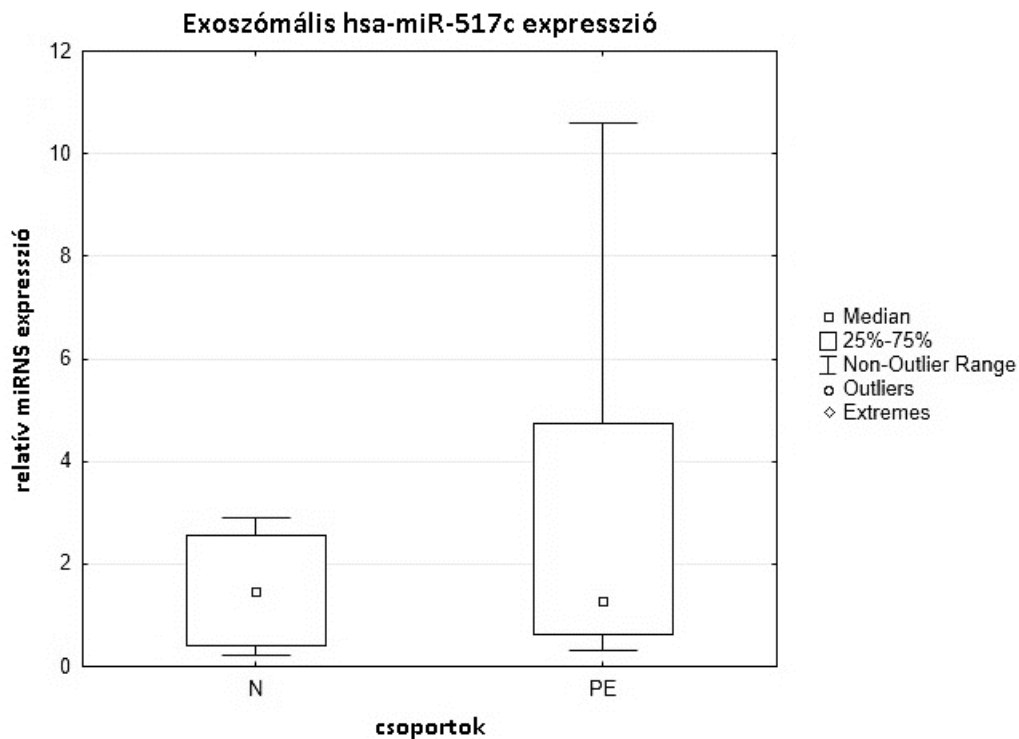


**17.C ábra.** Ago-kötött *hsa-miR-210* expresszió N és PE csoportokban. N: normotenzív, PE: praeeclampsia, \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ .

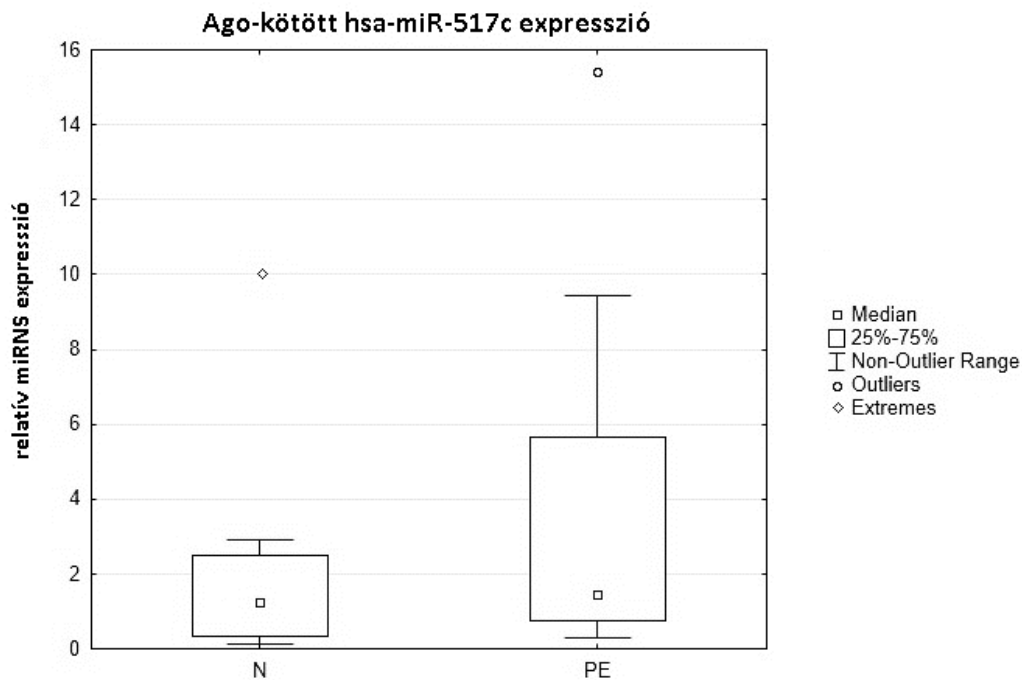
A placentáris *hsa-miR-517c* fokozott expressziót mutatott PE-ban a kontrollcsoportéhoz képest: 0,82 (0,56-1,62) vs. 2,33 (1,28-4,50),  $p < 0,05$  (18.A ábra), míg az extracelluláris miRNS expresszióban nem adódott jelentős eltérés (exoszómális: 1,46 (0,40-2,55) vs. 1,29 (0,63-4,75), Ago-kötött: 1,23 (0,35-2,50) vs. 1,45 (0,74-5,65),  $p > 0,05$  (18.B,C ábra)).



**18.A ábra.** Placentáris *hsa-miR-517c* expresszió N és PE csoportokban. N: normotenzív, PE: preeclampsia, \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ .



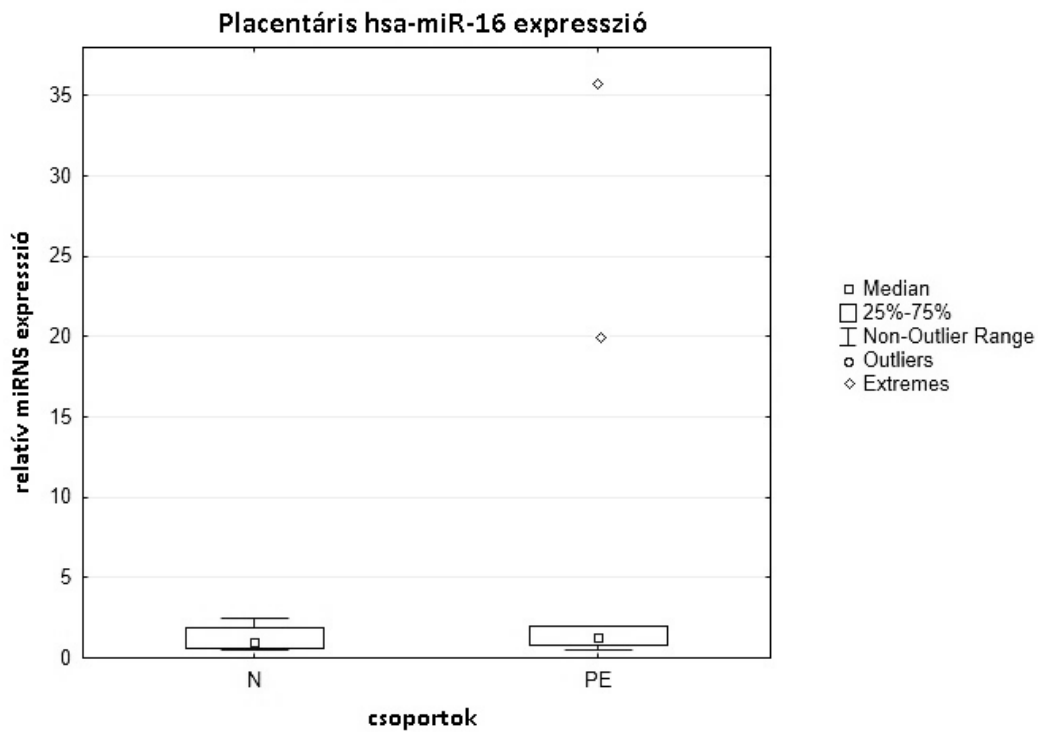
**18.B ábra.** Exoszómális *hsa-miR-517c* expresszió N és PE csoportokban. N: normotenzív, PE: preeclampsia, \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ .



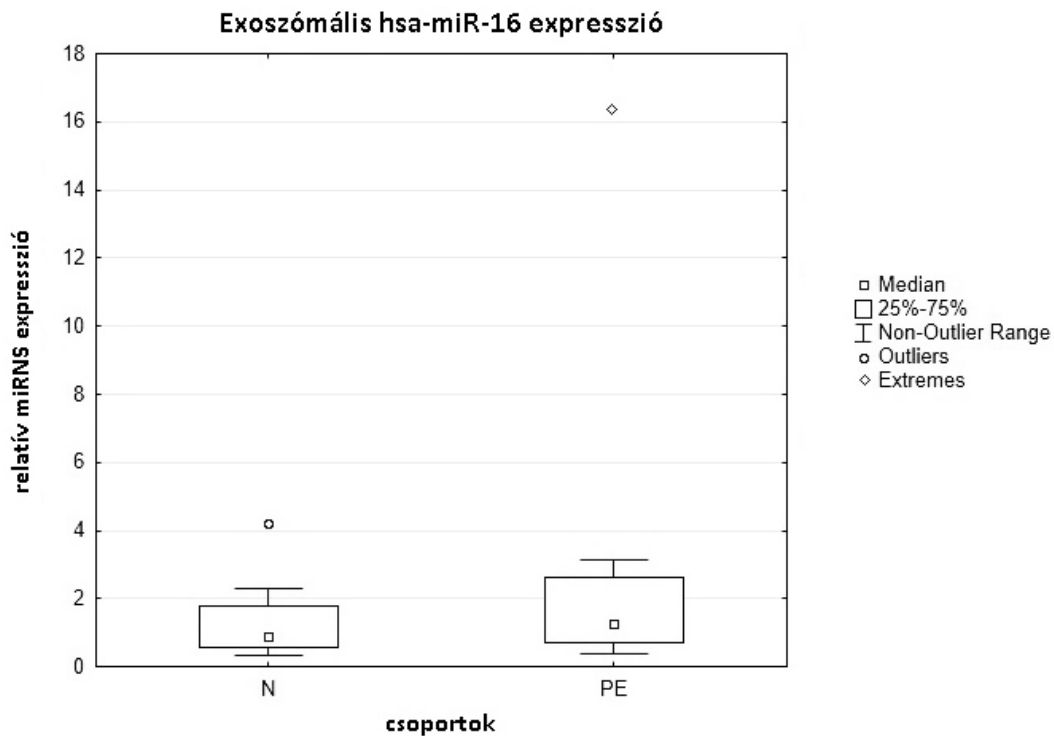
**18.C ábra.** Ago-kötött *hsa-miR-517c* expresszió N és PE csoportokban. N: normotenzív, PE: praeclampsia, \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ .

A *hsa-mir-16* esetén sem a szöveti- (0,95 (0,58-1,86) vs. 1,31 (0,76-2,00),  $p > 0,05$ , 19.A ábra), sem az extracelluláris expresszióban nem találtunk szignifikáns eltérést (exoszómális: 0,91 (0,55-1,79) vs. 1,26 (0,70-2,62), Ago-kötött: 0,97 (0,52-2,13) vs. 2,08 (0,99-3,52),  $p > 0,05$ , 19.B,C ábra)).

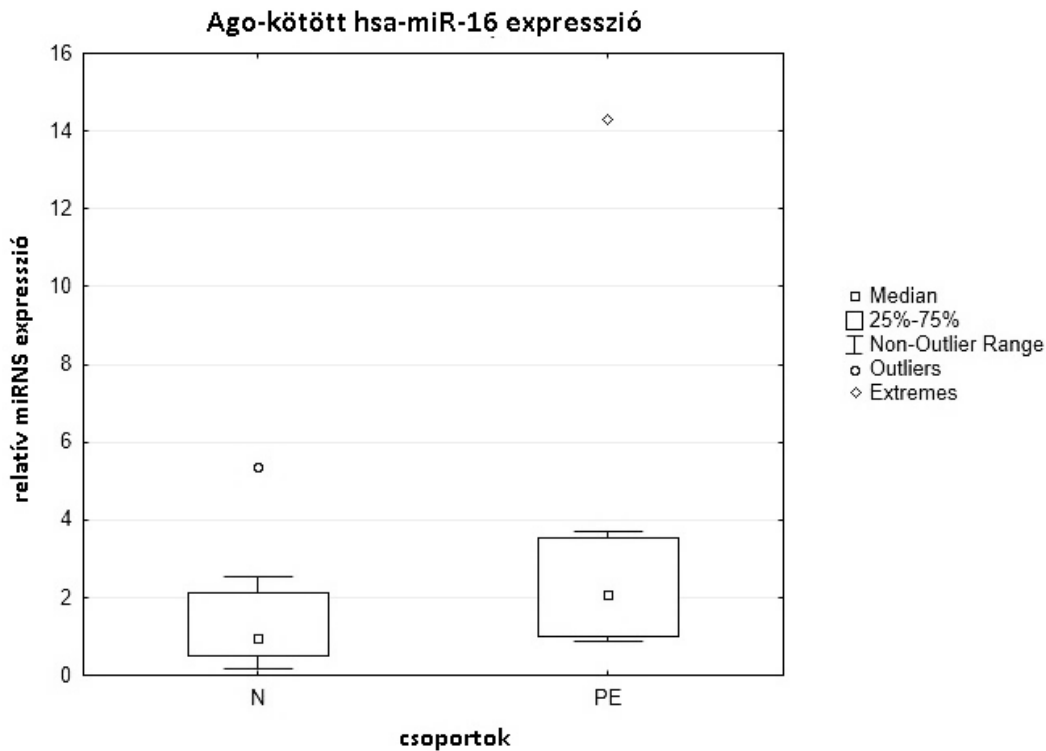




**19.A ábra.** Placentáris *hsa-miR-16* expresszió N és PE csoportokban. N: normotenzív, PE: praeclampsia, \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ .



**19.B ábra.** Exoszómális *hsa-miR-16* expresszió N és PE csoportokban. N: normotenzív, PE: praeclampsia, \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ .



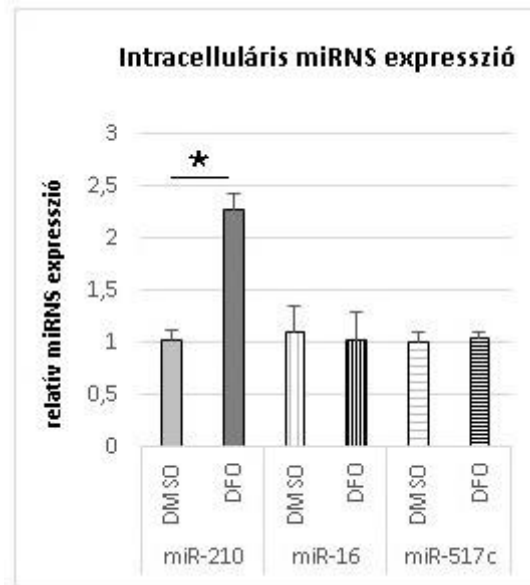
**19.C ábra.** Ago-kötött *hsa-miR-16* expresszió N és PE csoportokban. N: normotenzív, PE: praeeclampsia, \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ .

#### 4.3.2 A *hsa-miR-210* hypoxia-indukált intracelluláris expressziója és szekréciója trophoblast sejtkultúrákban

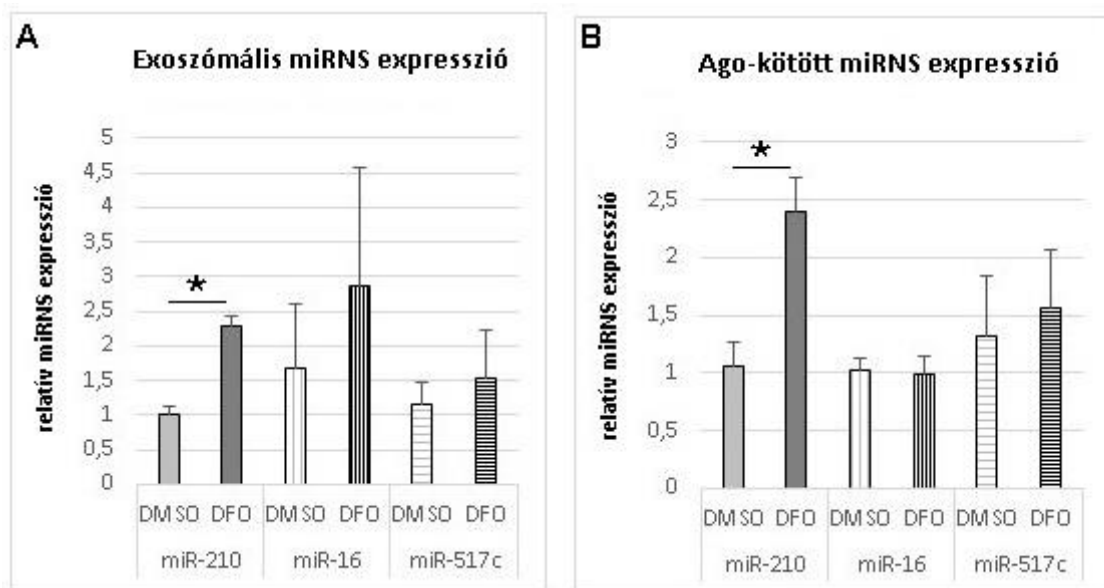
A VT sejtek (Jar) DFO-kezelése szelektíven indukálta a *hsa-miR-210* expresszióját ( $1,02 \pm 0,11$  vs.  $2,27 \pm 0,16$ ,  $p < 0,05$ ). A sejtmediumban megnövekedett exoszómális *hsa-miR-210* szintet ( $1,04 \pm 0,15$  vs.  $2,53 \pm 0,35$ ,  $p < 0,05$ ) és az Ago-kötött forma fokozott felszabadulását figyeltük meg ( $1,06 \pm 0,21$  vs.  $2,40 \pm 0,29$ ,  $p < 0,05$ ).

A *hsa-miR-16* és *hsa-miR-517c* esetén nem mutatkozott szignifikáns eltérés sem az intra-, sem az extracelluláris expresszió tekintetében (*hsa-miR-16* intracelluláris:  $1,10 \pm 0,26$  vs.  $1,04 \pm 0,26$ , exoszómális:  $1,69 \pm 0,92$  vs.  $2,87 \pm 1,72$ , Ago-kötött: RQ:  $1,02 \pm 0,11$  vs.  $0,99 \pm 0,16$ ; *hsa-miR-517c* intracelluláris:  $1,01 \pm 0,08$  vs.  $1,04 \pm 0,06$ , exoszómális:  $1,15 \pm 0,32$  vs.  $1,52 \pm 0,71$ , Ago-kötött:  $1,31 \pm 0,54$  vs.  $1,57 \pm 0,51$ ).

Az eredményeket oszlopdiagram segítségével a 20-21. ábrákon szemléltettük. A relatív expresszió a kontroll kezelés átlagához viszonyított linearizált értéknek felel meg.



**20. ábra.** Intracelluláris miRNS expresszió JAR sejtekben. DMSO: kontroll kezelés, DFO: hypoxiás állapot, \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ .



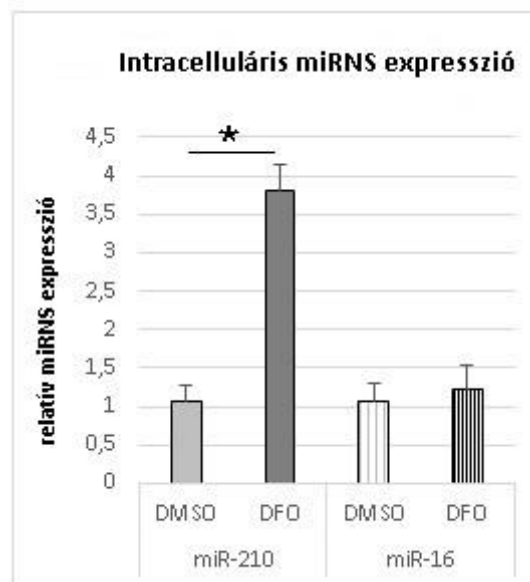
**21. ábra.** Exoszómális (A) és Ago-kötött (B) miRNS expresszió JAR sejtekben. DMSO: kontroll kezelés, DFO: hypoxiás állapot, \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ .

Az EVT sejtekben (Htr-8) a DFO-kezelés hatására jelentősen megemelkedett a *hsa-miR-210* expressziója ( $1,07 \pm 0,19$  vs.  $3,80 \pm 0,35$ ,  $p < 0,05$ ). A sejtekben megfigyelt eltérés sokkal hangsúlyosabban jelentkezett a szekretált exoszómális frakcióban

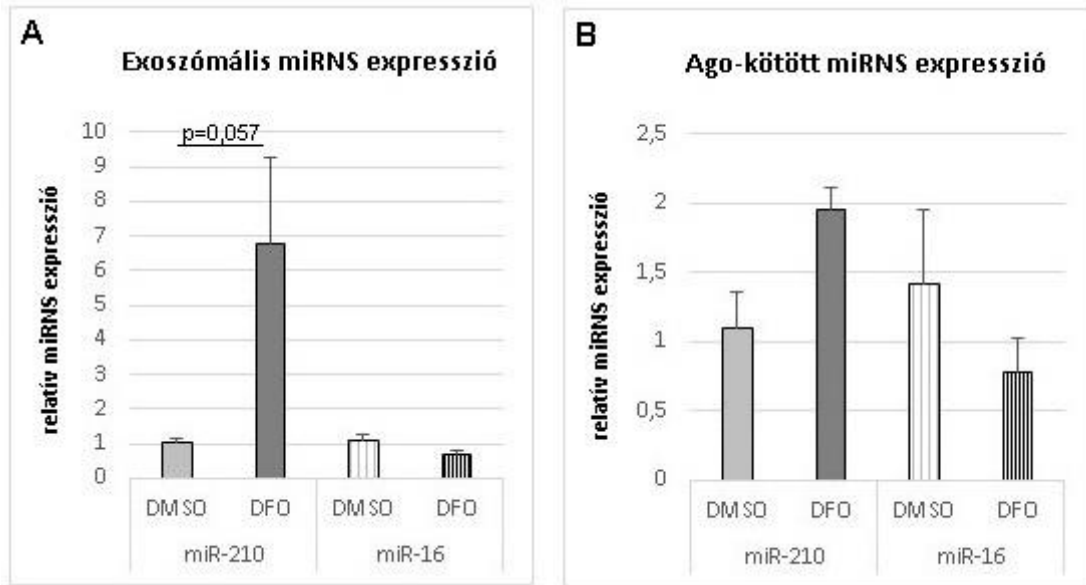
( $1,03 \pm 0,14$  vs.  $6,80 \pm 2,46$ ,  $p=0,057$ ), míg az Ago-kötött frakcióban enyhén emelkedett a *hsa-miR-210* szint: ( $1,10 \pm 0,26$  vs.  $1,95 \pm 0,16$ ).

A *hsa-miR-16* esetén nem mutatkozott szignifikáns eltérés sem az intra-, sem az extracelluláris expresszió tekintetében (intracelluláris:  $1,08 \pm 0,22$  vs.  $1,23 \pm 0,30$ , exoszómális:  $1,08 \pm 0,19$  vs.  $0,67 \pm 0,10$ , Ago-kötött: RQ:  $1,42 \pm 0,54$  vs.  $0,78 \pm 0,25$ ). A *hsa-miR-517c* nem expresszálódik ebben a sejtvonalban, így egyik vizsgált közegben sem tudtuk detektálni.

Az eredményeket oszlopdiagram segítségével a 22-23. ábrákon szemléltettük A relatív expresszió a kontroll kezelés átlagához viszonyított linearizált értéknek felel meg.



**22. ábra.** Intracelluláris, exoszómális és Ago-kötött miRNS expresszió Htr-8 sejtekben. DMSO: kontroll kezelés, DFO: hypoxiás állapot, \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ .



**23. ábra.** Exoszómális (A) és Ago-kötött (B) miRNS expresszió Htr-8 sejtekben. DMSO: kontroll kezelés, DFO: hypoxiás állapot, \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ .

## 5. Megbeszélés

A praeclampsia terhességre specifikus, több szervrendszert érintő kórkép, kialakulásának oka a mai napig vitatott. A placentában expresszálódó miRNS-ek feltehetően részt vesznek a placentáció szabályozásában, és szükségesek a terhesség zavartalan lefolyásához. Rendellenes expressziójuk hozzájárulhat különböző terhességi kórképek, köztük a praeclampsia kialakulásához.

A miRNS-ek patogenitásának felmérésére expressziós adatbázisból nyert adathalmazokon bioinformatikai elemzést hajtottunk végre. Az *in silico* analízis során olyan kulcsfontosságú miRNS-mRNS interakciók feltérképezését tűztük ki célul, amelyek lehetővé teszik a betegség hátterében álló folyamatok és ezáltal a betegséget kialakító molekuláris interakciók pontosabb megismerését.

Hálózatanalízisre számos példa akad onkológiai kutatásokban, fontos eredményekre derült fény többek között a petefészek- és a mellrák patogenezisével kapcsolatban. Praeclampsziát illetően csekély azoknak a tanulmányoknak a száma, amelyben a miRNS-ek vizsgálatára rendszerbiológiai megközelítést alkalmaztak (Betoni és mtsai 2013; Luo és mtsai 2017; Wen és mtsai 2017). Legjobb tudomásunk szerint mi végeztük el az első olyan vizsgálatot, ahol a miRNS- és génexpressziós adatok együttesen kerültek elemzésre, és a target predikció az antikorreláló miRNS-mRNS párok figyelembevételével történt. Nyilvános adatbázisokban szabadon elérhető microarray adathalmazokat dolgoztunk fel, és az expressziós profilok integrálásával interakciós hálózatot hoztunk létre. Számos olyan miRNS-mRNS szabályozó mechanizmust azonosítottunk, melyeknek szerepe lehet a praeclampsia patogenezisében (Bíró és mtsai 2017a).

A hálózat olyan, a placentában kifejeződő miRNS-mRNS párokból állt, melyek eltérően fejeződnek ki praeclampsia illetve élettani terhesség esetén. A kóros mintákban fokozottan expresszálódó miRNS-ek csoportjában, a *hsa-miR-210* kivételesnek bizonyult a szabályozott gének számát illetően. A *hsa-mir-210* által szabályozott fehérje-fehérje kapcsolatok vizualizációja alapján arra következtethetünk, hogy a BMPR2 gátlása sok más fehérje kifejeződésére hatással lehet. Nagashima és mtsai kimutatták, hogy a kódolt fehérje fontos funkciót lát el a posztimplantáció folyamatában, és szükséges a fiziológias terhesség fenntartásához. *Bmpr2* knockout egérmodelljünkben a humán placenta

diszfunkcióra jellemző tünetek jelentek meg. Eredményeik arra utalnak, hogy a BMP2 részt vesz a trophoblast invázió szabályozásában, és csökkent kifejeződése összefüggésben lehet a praeclampsia kialakulásával. (Nagashima és mtsai 2013). A DLG5 az epitélium-mesenchimális átmenet jól ismert szabályozója, melynek lépései a cytotrophoblast fúzióhoz hasonlóan mennek végbe. Saben és mtsai kimutatták, hogy a gén fokozottan expresszálódik placentában, azon belül is syncytium rétegre lokalizálódik. Feltehetően részt vesz a placentáció folyamatában, ezáltal patogenetikai tényezőként jelölhető meg (Saben és mtsai 2014). A KCNQ család feszültségfüggő káliumcsatornákat kódol, melyek fontos szerepet játszanak a foetoplacentaris keringés kontrollálásában (Wareing és Greenwood 2011). Mistry és mtsai azt találták, hogy a KCNQ4 izoforma csökkent mértékben expresszálódik praeclamptikus placentaszövetben (Mistry és mtsai 2011).

A *hsa-miR-33b\** által szabályozott fehérje interakciós hálózat kevesebb elemet tartalmazott az előhöz képest, de ezek között is szerepeltek olyanok, amelyeket a betegséggel korábban már összefüggésbe hoztak. A KLF6 a VT réteg fúzióját szabályozza, a fehérje elcsendesedése az STB réteg rendellenes kialakulását eredményezi (Racca és mtsai 2015). Az EMP2 egy az implantációhoz szükséges endometriális fehérje (Wadehra és mtsai 2006). Williams és mtsai bebizonyították, hogy ezen felül részt vesz trophoblast funkció szabályozásában, és placenta elégtelenség esetén mind a VT, mind az EVT rétegben alulexpresszált (Williams és mtsai 2017).

A gének közül a QSOX1-et szabályozta a legtöbb miRNS a hálózatban, amelyekből a *hsa-miR-296-5p* és a *hsa-mir-18a\** rendellenes expresszióját kimutatták preeclampsziában. Tejera és mtsai génprioritizációs vizsgálatot végeztek praeclampsziában, és azt találták, hogy a QSOX1 nagy intramoduláris konnektivitással rendelkezik, ami jelzi lehetséges szerepét a betegségben (Tejera és mtsai 2013). A BAIAP2-t szintén sok miRNS interakcióval rendelkezik, amelyek közül a *hsa-mir-27a\**, *hsa-mir-17\**, *hsa-mir-193b\**, *hsa-mir-296-5p* és a *hsa-mir-637* összefügg a betegséggel. Magáról a fehérjéről praeclampsziával kapcsolatban nem állt rendelkezésre szakirodalmi adat. A *hsa-miR-541* szignifikánsan alulexpresszáldott a kóros mintákban, ezzel egybehangzóan az általa szabályozott FSTL3 és a TIMP3 fokozott kifejeződését mutatták ki praeclamptikus placentamintákban (Guo és mtsai 2012; Yuen és mtsai 2010).

Az elemzés korlátját képezte, hogy az adatgyűjtéskor nem állt rendelkezésre olyan tanulmány, amelyben a miRNS és az mRNS expressziós mintázatok ugyanabból a biológiai mintákból származtak volna. További hátrányt jelentett, hogy a MAGIA bioinformatikai analízis azon az elgondoláson alapul, hogy a miRNS-ek általi szabályozás minden esetben mRNS szinten is megnyilvánul. Bizonyos miRNS-ek az mRNS-szint megváltoztatása nélkül, a fehérje transzláció gátlása révén fejtik ki hatásukat.

Az általunk elvégzett *in silico* vizsgálat alapján a *hsa-miR-210* központi szabályozó szerepet játszik praeclampsiaiban. Eddig több mint száz gént validáltak kísérletesen a *hsa-miR-210* célpontjaként, és ennél még több prediktált interakcióban vesz részt. A szabályozott fehérjék fontos szerepet játszanak különböző sejtfolyamatokban, például apoptózisban, proliferációban és metabolizmusban.

A KCMF1 protoonkogén fehérje, különböző epithel-eredetű daganatokban serkenti a proliferációt, migrációt és inváziót (Beilke és mtsai 2010). Luo és mtsai HTR8/SVneo trophoblast sejtvonalon végzett vizsgálatukban kimutatták, hogy a *hsa-miR-210* képes a KCMF1 lecsendesítésére, ami csökkent trophoblast invázióhoz vezet (Luo és mtsai 2014). Placéntában a *hsa-miR-210* upregulációja mitokondriális diszfunkcióhoz és oxidatív stresszhez vezethet egy az energia termelésben fontos szerepet játszó fehérje gátlása révén (Muralimanoharan és mtsai 2012). Lee és mtsai igazolták, hogy az ISCU fehérje a *hsa-miR-210* szabályozása alatt áll SWAN-71 trophoblast és BeWo choriocarcinoma sejtvonalakban, továbbá a miRNS-mRNS pár placéntában mért expressziója fordítottan arányos praeclampsias csoportban (Lee és mtsai 2011). A *hsa-miR-210* és *hsa-miR-518c* (C19MC tagja) célpontja a HSD17B1 gén által kódolt enzim, mely túlnyomórészt a placéntában fejeződik ki és szteroidhormonok bioszintézisében vesz részt. A fehérje szintjének csökkenése már a praeclampsia klinikai tüneteinek megjelenése előtt kimutatható, ezért potenciális prognosztikai markerként szolgálhat (Ishibashi és mtsai 2012). Az EFNA3 és a HOXA9 gének is a *hsa-miR-210* célpontjait képezik, melyek szintén fontos szerepet töltenek be a vascularizáció és a sejtek migrációja szempontjából, különösen a szív- és érrendszerben (Zhang és mtsai 2012). Kopriva és mtsai a terhességi kórkép immunológiai vonatkozásaira irányuló kutatásokat végeztek. Igazolták, hogy a TLR3 receptor aktivációja praeclampsiajára jellemző tünetek (endothel diszfunkció, hipertónia és proteinuria) megjelenését idézi elő terhes egerekben. SGHPL-4 típusú humán cytotrophoblast sejtvonalon azt is bizonyították, hogy a TLR3 aktiváció



*hsa-miR-210* expressziót indukál, ami a STAT6/IL-4 útvonal gátlása révén gyulladásos állapot kialakulásához vezet (Kopriva és mtsai 2013). Anton és mtsai primer EVT sejtkultúrában vizsgálták a *hsa-miR-210* túlexpresszió hatását. Eredményeik szerint önmagában a miRNS hatását modellező „mimic” transzfekciója is elegendő volt a trophoblast invázió gátlásához, mely szintén a patogén szerepet támasztja alá. Feltételezéseik szerint a *hsa-miR-210* hatását az ERK/MAPK jelátviteli útvonal mediálja. A miRNS biomarker szerepének meghatározására második trimeszteri szérummintákban prospektív kohort vizsgálatot végeztek, és azt találták, hogy a *hsa-miR-210* szintje már hónapokkal a betegség megjelenése előtt megemelkedik (Anton és mtsai 2013).

Az elégtelen vérkeringéssel rendelkező, hipoperfundált placentából a vérkeringésbe kerülő faktorok okozzák az anyában kialakuló klinikai szindrómát: a trophoblastrétegből különböző káros anyagok, antiangiogén faktorok, proinflammatorikus mediátorok és extracelluláris vesicuvesiculák szekretálódnak az anyai vérkeringésbe. Az elmúlt évtizedben több olyan kutatást végeztek, amelyben in vitro kísérletekkel tanulmányozták a placenta-eredetű vesiculák hatását különböző célsejteken. Bizonyítást nyert, hogy képesek modulálni a szomszédos sejtek aktivitását, mely szerepet játszhat az élettani terhesség kialakulásában és fenntartásában. A legtöbb kutatást e területen az ausztrál Carlos Salomon munkacsoportja végezte. Megmutatták, hogy az EVT-rétegből felszabaduló exoszómák a vaszkuláris simaizomsejtek vándorlásának serkentése révén hozzájárulhatnak a SpA remodellinghez. Feltételezésük szerint a placenta élettani fejlődése során, az EVT-eredetű exoszómák olyan specifikus szabályozó molekulákat közvetítenek (például miRNS-eket), melyek által elősegítik az érfalak simaizomrétegének feloldódását (Salomon és mtsai 2014b). További kutatásuk eredményeként azt találták, hogy oxigén tenzió változás hatására a cytotrophoblast sejtek módosítják a szekretált exoszómák bioaktivitását és fehérjetartalmát. Az ily módon „aktivált” exoszómák az EVT sejtekkel kapcsolatba lépve képesek annak fenotípusos megváltoztatására. Az EVT migráció exoszómális indukciója, mint egy a lepényi hypoxiára adott adaptív válaszreakcióként tekinthető. (Salomon és mtsai 2013a). Egy másik vizsgálatban placenta-eredetű exoszómák bioaktivitását tanulmányozták human köldökvéna endothel sejtenyészetben (HUVEC). Azt állapították meg, hogy az ilyen típusú vesiculákkal való inkubáció fokozza az endothel sejtek migrációját. Érdekes módon az exoszómák bioaktivitása az első trimeszterben volt a legnagyobb, és a terhesség

előrehaladtával csökkent. Ezek alapján feltételezhető, hogy a terhesség korai szakaszán a trophoblast-eredetű exoszómák elősegítik az anyai érrendszer adaptációját (Salomon és mtsai 2014a).

Azonban, kóros folyamatok révén megváltozhat a vesiculák száma és összetétele, ami különböző terhességi kórképek kialakulásához vezethet. Praeclampsziában az elhúzódó lepényi hypoxia és a felgyülemlett proinflammatorikus citokinek (például a TNF- $\alpha$ ) modulálhatják az exoszómák vaszkuláris sejtek migrációjára kifejtett kedvező hatását, ami nem megfelelő SpA remodellinghez vezethet. Truong és mtsai megmutatták, hogy az EVT-eredetű exoszómák szekrécija jelentősen fokozódik 1%-os O<sub>2</sub> környezetben a 8%-os O<sub>2</sub>-szinthez képest. A normoxiában tenyésztett EVT sejtmediumból izolált exoszómák olyan miRNS-eket tartalmaztak, amelyek a sejtek migrációját szabályozták, míg a hypoxiás állapotban kibocsátott exoszómák gyulladásos válasszal és citokintermeléssel kapcsolatos miRNS-eket foglaltak magukba. Eredményeik alapján arra a következtetésre jutottak, hogy az oxigén tenzió módosítja az EVT-eredetű exoszómák hatását az endothelsejteken: a hypoxiás állapot gátolja az EVT sejtek migrációját, és növeli a TNF- $\alpha$  koncentrációját a remodelling helyén. A rendellenes EVT-funkció a placenta perfúzió zavarához, és ezáltal terhességi szövődmények kialakulásához vezethet (Truong és mtsai 2017).

Egyre több bizonyíték áll rendelkezésre a STB-eredetű extracelluláris vesiculák funkciójára a terhesség immunológiai adaptációjával kapcsolatban (Nair és Salomon, 2018). A veleszületett immunrendszer aktiválásában betöltött szerepüket jelzi, hogy a monociták képesek megkötni és internalizálni az STB extracelluláris vesiculákat. Az STB extracelluláris vesiculák általi indukció eredményeként a monociták különböző citokineket (pl. TNF- $\alpha$  és IL-1 $\beta$ ) kezdenek termelni. Az in vitro vizsgálatokból származó adatok alapján feltételezhető, hogy a STB extracelluláris vesiculák hozzájárulhatnak a praecclampsziás terhességekben megfigyelt szisztémás gyulladásos állapot létrejöttéhez (Göhner és mtsai 2017).

A trophoblast-eredetű extracelluláris vesiculák szerepének megértése élettani és kóros terhességben hozzájárulhat az új terápiás szerek fejlesztéséhez, melyek elősegíthetik a káros elemek semlegesítését, illetve a jótékony hatású faktorok felszabadítását. Nadkarni és mtsai kimutatták, hogy a rekombináns humán plazma gelsolin korlátozza a spontán

vesicula- és a bennük lévő toxikus anyagok felszabadulását, beleértve az antiangiogén és proinflammatorikus tényezőket (Nadkarni és mtsai 2016). Xiao és mtsai vizsgálatukban praeclampsias terhesek szérum mintáival inkubáltak első trimeszteri placenta „explant” kultúrát, mely ennek hatására toxikus extracelluláris vesiculákat bocsátott ki. Endothel sejteket az így kapott extracelluláris vesiculákkal kezelve endothel-aktivációt váltott ki, amely hatás a praeclampsia kezelésére használt antihypertensív szerekkel (nifedipin vagy labetalol) visszafordítható volt (Xiao és mtsai 2017). A jövőben teret nyerhetnek a miRNS terápiás lehetőségek is: az úgynevezett miRNS „mimic”-ek növelik az előnyös tulajdonságú miRNS-ek szintjét, míg az „antagomiR”-ek csökkentik a káros miRNS-ek expresszióját. Ahhoz, hogy ezek az eszközök különböző terhességi kórképekben is alkalmazhatóak legyenek, a klinikai vizsgálatoknak kiemelt hangsúlyt kell fektetniük a lehetséges úgynevezett „off target” hatások minimalizálására, az időzítés és az adagolás pontos beállítására. A komoly mellékhatásokat elkerülendő rendkívül fontos a szervezetbe jutó miRNS-ek célba juttatásának optimalizálása és az egyéb szövetekben esetlegesen kiváltott károsodások kiküszöbölése.

A placentában expresszálódó miRNS-ek jelentős része, a trophoblast rétegből aktív vagy passzív szekréció révén kijut az anyai vérkeringésbe. Praeclampsiaiban a placenta diszfunkció a trophoblast-eredetű vesiculák rendellenes felszabadulását okozza, ami által megváltozik az exoszómális faktorok, köztük a miRNS-ek szintje is az anyai keringésben. Vizsgálatunkban meghatároztuk az exoszómális össz-miRNS koncentrációt és elvégeztük a *hsa-miR-210* expressziós analízisét gestatios hypertonia és chronicus hypertonia, illetve különböző súlyosságú praeclampsia csoportokban (Biró és mtsai 2017b).

Az össz-miRNS koncentráció medián értékei különböztek a kóros alcsoportokban, és szignifikánsan magasabbak voltak az praeclampsias csoportokban a kontrollcsoporthoz képest. PE és mPE esetében a N-hez képest. A relatív exoszómális *hsa-miR-210* expresszió szignifikáns különbséget mutatott a gestatios hypertonia, az enyhe és súlyos praeclampsia csoportban a normotenzív mintákhoz viszonyítva, azonban jelentős emelkedés csak a praeclampsia esetén volt megfigyelhető. Az össz-miRNS koncentráció pozitív korrelációt mutatott a *hsa-miR-210* expresszióval a hypertoniás csoportokban, de a normotenzív csoportban nem figyeltünk meg összefüggést. Ebből arra következtethetünk, hogy a kóros csoportokban a *hsa-miR-210*

nagyobb arányban járult hozzá a keringésben fellelhető össz-miRNS állományhoz, mint élettani terhesség esetén. A terhesség alatti trophoblast-eredetű *hsa-miR-210* szekréció mellett, más szövetekből történő felszabadulás is előfordulhat. Kimutatták például, hogy a miRNS a szív- és érrendszer több pontján is expresszálódik (Chan és mtsai 2012), ezért szintén lehetséges forrása az anyai keringésben fellelhető szabad *hsa-miR-210*-nek.

A placentához hasonlóan a rákos sejtek is aktívan bocsátanak ki specifikus szabályozó és jelző molekulákat hordozó exoszómákat, amelyek segítségével kommunikálni tudnak a tumor mikro környezetében lévő különböző sejtekkel. Jung és mtsai egy specifikus riporterrendszer alkalmazásával szemléltették a *hsa-miR-210* hypoxiás emlőráksejtekről szomszédos sejtekre való exoszómális transzportját (Jung és mtsai 2017). Megállapították, hogy a tumorsejtekből szekretált exoszómális *hsa-miR-210* bejut a környező sejtekbe, ahol az angiogenezis elősegítése érdekében szabályozza a kapcsolódó gének expresszióját. Ezek az eredmények jól mutatják, hogy a rákos sejtek képesek bizonyos miRNS-ek szelektív szekréciójára, amelyek exoszómális közvetítés révén átjuthatnak a proximális sejtekbe, és képesek befolyásolni a tumor progresszióját. Hale és mtsai a fehérjéhez kötött *hsa-miR-210* funkcióját vizsgálták különböző sejttípusokban. Eredményeik szerint az Ago-specifikus *hsa-miR-210* heterogén sejtpopulációkban képes a hypoxiás válasz szinkronizációjára, ami által elősegíti a recipiens szövetek hypoxiás állapothoz való adaptációját. Kimutatták, hogy a kibocsátott *hsa-miR-210* a célsejtekbe történő internalizáció után képes az ISCU gén csendesítésére, ezáltal gátolva a mitokondriális anyagcserét (Hale és mtsai 2014).

A *hsa-miR-210* praeclampsia esetén mind a placentában, mind az anyai vérben fokozottan expresszálódik, mindazonáltal kérdés tárgyát képezi, hogy ez a jelenség hozzájárul-e a betegség kialakulásához, vagy inkább annak következménye. Ezenfelül a miRNS szekréciójának módja és a különböző formák betegségben betöltött szerepe sem tisztázott. Kutatásunk során célkitűzésünk volt a *hsa-miR-210* expressziós analízise placentamintákban és anyai vérből izolált exoszómális és non-vesiculáris frakciókban, szignifikáns eltérések keresése praeclampsiaival szövődött és élettani terhességek között. A miRNS szekrécióját különböző típusú trophoblast sejtvonalak segítségével modelleztük. Az in vitro vizsgálat során VT és EVT sejtvonalakban hypoxiás állapotot idéztünk elő, majd a különböző extracelluláris frakcióban meghatároztuk a *hsa-miR-210* expressziós mintázatát (Biró és mtsai 2019).

A placentamintákban mért *hsa-miR-210* szint szignifikánsan magasabb volt praeeclampsiában a kontrollcsoporthoz képest. Az exoszómális *hsa-miR-210* expresszió enyhe emelkedést mutatott, míg az Ago-kötött *hsa-miR-210* esetében szignifikáns túlexpressziót mértünk a betegcsoportban. Az eredmények arra engednek következtetni, hogy praeeclampsiában, a miRNS-ek aktív exoszómális szekrécija mellett az Ago-kötött miRNS-ek nagymértékű passzív felszabadulása is megjelenik.

A DFO kezelés eltérő hatást gyakorolt a VT és az EVT sejtvonalakon. A villosus Jar sejtekben fellépő hypoxiás állapot szelektíven indukálta az intracelluláris *hsa-miR-210* expresszióját. A sejtmédiumban megnövekedett exoszómális-*hsa-miR-210* szintet és az Ago-kötött forma fokozott felszabadulását figyeltük meg. Az expressziós profil meglehetősen hasonló volt a placenta- és a plazmamintákban megfigyelt kifejeződési mintázathoz. A jelenségre az adhat magyarázatot, hogy a placentában ez a sejttípus érintkezik közvetlenül az anyai keringéssel. Az extravillosus Htr-8 sejtekben szintén jelentősen megemelkedett a sejten belüli *hsa-miR-210* expresszió. A megfigyelt eltérés sokkal hangsúlyosabban jelentkezett a kibocsátott exoszómális frakcióban, míg az Ago-kötött frakcióban a *hsa-miR-210* szint enyhén emelkedett. Tehát ebben az esetben a hypoxia-indukció szelektív exoszómális *hsa-miR-210* szekréción eredményezett. Mivel ez a sejttípus központi funkciót lát el a trophoblast invázióban, a megfigyelt jelenség szerepet játszhat a placenta diszfunkció kialakulásában.

Az eredmények alapján arra következtetünk, hogy praeeclampsiában az elhúzódó hypoxia hatására az exoszómális *hsa-miR-210* aktív sorting révén szekretálódik a placenta különböző részeiből. A terhesség elején szerepet játszhat az intercelluláris kommunikációban és a placenta kóros fejlődésében, míg a későbbiekben az anyai keringésbe jutó *hsa-miR-210* összefüggésben lehet a klinikai fázisra jellemző elváltozásokkal. Az Ago-kötött *hsa-miR-210* felszabadulása feltehetően a trophoblastsejtek fokozott apoptózisa által megvalósuló passzív folyamat, amely a sejthalál melléktermékeként a betegség egy lehetséges következménye.

A keringő mikroRNsek vizsgálata nagy lehetőségeket rejt magában, mivel potenciális diagnosztikai, prognosztikai markerekként szolgálhatnak különböző megbetegedések kimutatására. Egyre több tanulmányt közölnek a keringő miRNS-ek diagnosztikus jelentőségéről terhességi kórképekben. Az eredmények között azonban számos eltérés figyelhető meg, ugyanazon betegségek esetén különböző kutatócsoportok

eltérő miRNS mintázatokat írnak le, amiben a mintaválasztás, a metodika és normalizálás különbségei is szerepet játszhatnak. Általános probléma a mérési eredmények normalizálása, ami fokozottan érvényes a keringésben fellelhető miRNS-ekre. Jelenleg nem ismerünk olyan univerzális miRNS-t, amelynek az expressziója populációs szinten állandó lenne. Nehézséget jelentenek továbbá a miRNS-ek fizikai tulajdonságai, kis méretük és a szekvenciák közötti nagyfokú homológia. Ezek mind hátrányosan befolyásolhatják a kísérletek kimenetelét. Az általunk is használt, újonnan bevezetett „locked nucleic acid” (LNA)-módosított próbák nagyobb affinitással kötődnek az egyes miRNS-ekhez, ezáltal specifikusabb eredményt adnak.

A disszertációban leírt két exozómális miRNS-szint meghatározás az első esetben szignifikáns különbséget adott a kóros és kontroll terhességi csoportok között, míg az utóbbi vizsgálatban ez az eltérés nem volt jelentős. Az ellentmondásnak több oka is lehet, ezek közül kiemelendő az eltérő mintaszám és izolálási metodika. Az első vizsgálatban a különböző terhességi kórképek elkülönítésére több beteget vontunk be, míg a második, funkcionális vizsgálatban kis esetszámú csoportokat alkottunk. A két mérés során különböző módszereket alkalmaztunk az exozómák elválasztására, mind a kettőnek megvannak az előnyei és a hátrányai. Ez felhívja a figyelmet a területen általános problémaként jelentkező standardizálás hiányára. A megfelelő metodika választása kiemelkedő fontossággal bír a későbbi vizsgálatok és felhasználás tükrében. Saját tapasztalatunk alapján a precipitációs technika alkalmasabb biomarker kutatásra, mivel gyorsan és egyszerűen kivitelezhető, míg a membrán-affinitás oszlop módszer lehetővé teszi a vesiculáris és non-vesiculáris miRNS-ek funkcionális vizsgálatát.

## 6. Következtetések

**I.** A miRNS-ek patogenitásának felmérésére expressziós adatbázisból nyert adathalmazokon bioinformatikai elemzést hajtottunk végre. Nyilvánosan elérhető, lepényi miRNS- és génexpressziós profilok integrációjával miRNS szabályozási hálózatot építettünk és meghatároztuk a betegmintákban eltérő mintázatokat. Az azonosított miRNS-mRNS kölcsönhatásokból a *hsa-mir-210* volt a hálózat legnagyobb fokszerű csomópont, mely miRNS-t korábban már összefüggésbe hozták praeclampsiával.

**II.** Laboratóriumi vizsgálatunkban összevetettük az exoszómális miRNS-ek összmenységét és a *hsa-miR-210* expressziós szintjét különböző típusú terhességi magas vérnyomásos és kontroll csoportok keringésében. Azt találtuk, hogy mind az össz-miRNS koncentráció, mind a *hsa-miR-210*-szint emelkedett praeclampsia esetén, mely a kórkép súlyosságával tovább fokozódott. Eredményeink alapján elmondható, hogy a hypoxia-szenzitív miRNS exoszómákba csomagolódik, melynek szerepe lehet a betegség pathomechanizmusában.

**III/1.** A placentamintákban mért *hsa-miR-210* szint szignifikánsan magasabb volt praeclampsiában a kontrollcsoporthoz képest. Az exoszómális *hsa-miR-210* expresszió enyhe emelkedést mutatott, míg az Ago-kötött *hsa-miR-210* esetében szignifikáns túlexpressziót mértünk a betegcsoportban. Az eredmények alapján feltételezhető, hogy a miRNS-ek aktív exoszómális szekréciója mellett az Ago-kötött miRNS-ek nagymértékű passzív felszabadulása is megjelenik praeclampsiában,

**III/2.** A hypoxia-indukció mindkét vizsgált trophoblast sejtkultúrában fokozta az intracelluláris *hsa-miR-210* expressziót, míg az extracelluláris miRNS-szintekre eltérő hatást gyakorolt. A villosus Jar sejtek expressziós profilja meglehetősen hasonló volt a placenta- és a plazmamintákban megfigyelt kifejeződési mintázathoz. Az extravillosus Htr-8 sejtekben a hypoxiás állapot szelektív exoszómális *hsa-miR-210* szekréciót eredményezett.

Az elvégzett vizsgálatok eredményei arra engednek következtetni, hogy praeclampsiában az elhúzódó hypoxia hatására az exoszómális *hsa-miR-210* aktív sorting révén szekretálódik a placenta különböző részeiből. A terhesség elején szerepet játszhat az intercelluláris kommunikációban és a placenta kóros fejlődésében, míg a

későbbiekben az anyai keringésbe jutó *hsa-miR-210* összefüggésben lehet a klinikai fázisra jellemző elváltozásokkal. Az Ago-kötött *hsa-miR-210* felszabadulása feltehetően a trophoblastsejtek fokozott apoptózisa által megvalósuló passzív folyamat, amely a sejthalál melléktermékeként a betegség egy lehetséges következménye.



## 7. Összefoglalás

Genomszintű vizsgálatok során a placentában több száz miRNS-t azonosítottak, azonban a terhesség folyamán betöltött funkciójuk a mai napig tisztázatlan. Rendellenes expressziójuk hozzájárulhat különböző terhességi kórképek, köztük a praeclampsia kialakulásához. Nyilvánosan elérhető, lepényi miRNS- és génexpressziós profilok integrációjával miRNS szabályozási hálózatot építettünk, és meghatároztuk a betegmintákban eltérő mintázatokat. Az azonosított miRNS-mRNS kölcsönhatásokból a *hsa-mir-210* képviselte a hálózat legnagyobb fokszámú csomópontját, mely miRNS-t korábban már összefüggésbe hozták praeclampsiával. A placenta kóros fejlődése elhúzódó hypoxiás állapothoz vezet, ami befolyásolja a kibocsátott extracelluláris vesiculák mennyiségét és tartalmát is. Saját vizsgálatunkban az exoszómális miRNS-ek össz mennyiségét és a *hsa-miR-210* expresszióját vetettük össze különböző típusú terhességi magas vérnyomásos és kontroll csoportok keringésében. Azt találtuk, hogy mind az össz-miRNS koncentráció, mind a *hsa-miR-210*-szint emelkedett praeclampsia esetén, mely a kórkép súlyosságával tovább fokozódik.

Végezetül, felmértük a *hsa-miR-210* kifejeződési mintázatát placentamintákban és anyai vérből izolált exoszómális és Ago-kötött frakciókban, praeclampsiával szövődött illetve élettani terhességek esetén. A miRNS szekréciónak különböző típusú trophoblast sejtvonalakon, hypoxia-indukció segítségével modelleztük. A placentamintákban mért *hsa-miR-210* szint szignifikánsan magasabb volt praeclampsiában, ami enyhe exoszómális emelkedéssel és az Ago-kötött forma fokozott felszabadulásával társult. Hypoxia hatására mindkét vizsgált trophoblast sejtkultúrában fokozódott az intracelluláris *hsa-miR-210* expresszió. A villosus sejtek esetében mindkét extracelluláris frakcióban mérsékelt emelkedést tapasztaltunk, míg az extravillosus sejtekben a hypoxia-indukció nagymértékű, szelektív exoszómális *hsa-miR-210* szekréciónak eredményezett. Eredményeink alapján azt feltételezzük, hogy praeclampsiában az elhúzódó placentáris hypoxia az exoszómális *hsa-miR-210* aktív felszabadulásához vezet. Ez a jelenség a terhesség elején szerepet játszhat a placenta kóros fejlődésében, míg a későbbiekben az anyai keringésbe jutó *hsa-miR-210* összefüggésben lehet a klinikai fázisra jellemző elváltozásokkal. Az Ago-kötött *hsa-miR-210* felszabadulása feltehetően a trophoblastsejtek fokozott apoptózisa által megvalósuló passzív folyamat, amely a sejthalál melléktermékeként a betegség egy lehetséges következménye.

## 8. Summary

Genome-wide screening studies identified several hundreds of miRNA species expressed by human placenta, although their function is poorly understood. Abnormally expressed miRNAs contribute to pregnancy complications such as preeclampsia. In our study, we applied bioinformatics approaches to integrate high-throughput experimental data on miRNA and mRNA expression profiles in preeclampsia. The *hsa-mir-210* was the highest degree node in the network and it has been associated with preeclampsia before. Altered placental development leads to prolonged hypoxia, which can change the number and content of secreted extracellular vesicles. We concluded the first study that assessed the exosomal miRNA concentration and expression in pregnancy-related hypertension disorders. We found that the concentration of exosomal total-miRNA and *hsa-miR-210* was significantly higher in the circulation of women affected by preeclampsia, and it was correlated with the severity of the disease.

Next, we investigated placental, exosomal and Ago-bound *hsa-miR-210* expression profile in preeclamptic, and control pregnancies. We performed an in vitro analysis of extracellular miRNA secretion of different trophoblast cell cultures under normoxic and hypoxic conditions. The level of *hsa-miR-210* was significantly higher in affected placentas, which could be related to a minor increase of circulating exosomal and highly elevated Ago-bound *hsa-miR-210*. The DFO treatment had a different effect on the villous and extravillous trophoblast cell lines: Intracellular *hsa-miR-210* was upregulated in both cases, however, in extravillous cell media, only the level of exosomal *hsa-miR-210* was increased and no change on Ago-bound *hsa-miR-210* level was observed. Therefore, in this case, hypoxia resulted in the specific exosomal sorting of *hsa-miR-210*. As this cell type has a role in trophoblast invasion, this phenomenon may have a role in placental dysfunction. In villous cell media, the level of exosomal *hsa-miR-210* was increased and enhanced release of Ago-bound *hsa-miR-210* was also observed.

Based on our data, we postulate that in preeclampsia, exosomal *hsa-miR-210* are secreted actively from the trophoblast, and by intercellular communication, it may have a role in disease etiology. In addition, there is a passive release of Ago-bound *hsa-miR-210* into the circulation, which may represent by-products of cell-death and is thereby a possible consequence of the disease.

## 9. Irodalomjegyzék

Alasztics B, Kukor Z, Pánczél Z, Valent S (2012). A praeclampsia kórétana a kétlépcsős modell tükrében. *Orv. Hetil.* *153*, 1167–1176.

Alasztics B, Gullai N, Molvarec A, Rigó J (2014). Az angiogén faktorok szerepe praeclampsiaiban. *Orv. Hetil.* *155*, 1860–1866.

American College of Obstetricians and Gynecologists, Task Force on Hypertension in Pregnancy (2013). Hypertension in Pregnancy. *Obstet. Gynecol.* *122*, 1122–1131.

Anton L, Olarerin-George AO, Schwartz N, Srinivas S, Bastek J, Hogenesch JB, Elovitz MA (2013). miR-210 inhibits trophoblast invasion and is a serum biomarker for preeclampsia. *Am. J. Pathol.* *183*, 1437–1445.

Anton L, Olarerin-George AO, Hogenesch JB, Elovitz MA (2015). Placental expression of miR-517a/b and miR-517c contributes to trophoblast dysfunction and preeclampsia. *PLoS One* *10*, e0122707.

Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 5003–5008.

Beilke S, Oswald F, Genze F, Wirth T, Adler G, Wagner M (2010). The zinc-finger protein KCMF1 is overexpressed during pancreatic cancer development and downregulation of KCMF1 inhibits pancreatic cancer development in mice. *Oncogene* *29*, 4058–4067.

Betoni JS, Derr K, Pahl MC, Rogers L, Muller CL, Packard RE, Carey DJ, Kuivaniemi H, Tromp G (2013). MicroRNA analysis in placentas from patients with preeclampsia: comparison of new and published results. *Hypertens. Pregnancy* *32*, 321–339.

Biró O, Rigó J (2018). A mikro-RNS-ek patogenetikai szerepe és expressziós mintázata praeclampsiaiban. *Orv. Hetil.* *159*, 547–556.

Biró O, Nagy B, Rigó J (2017a). Identifying miRNA regulatory mechanisms in

preeclampsia by systems biology approaches. *Hypertens. Pregnancy* 36, 90–99.

Biró O, Alasztics B, Molvarec A, Joó J, Nagy B, Rigó J (2017b). Various levels of circulating exosomal total-miRNA and miR-210 hypoxamiR in different forms of pregnancy hypertension. *Pregnancy Hypertens.* 10, 207–212.

Biró O, Fóthi Á, Alasztics B, Nagy B, Orbán TI, Rigó J (2019). Circulating exosomal and Argonaute-bound microRNAs in preeclampsia. *Gene* 692, 138–144.

Bortolin-Cavaille ML, Noguier-Dance M, Weber M, Cavaille J (2009). C19MC microRNAs are processed from introns of large Pol-II, non-protein-coding transcripts. *Nucleic Acids Res.* 37, 3464–3473.

Bounds KR, Chiasson VL, Pan LJ, Gupta S, Chatterjee P (2017). MicroRNAs: New Players in the Pathobiology of Preeclampsia. *Front. Cardiovasc. Med.* 4, 60.

Butz H, Patócs A (2015). Technical Aspects Related to the Analysis of Circulating microRNAs. In EXS, P. Igaz, ed. (Springer, Basel), pp. 55–71.

Chaiwangyen W, Ospina-Prieto S, Photini SM, Schleussner E, Markert UR, Morales-Prieto DM (2015). Dissimilar microRNA-21 functions and targets in trophoblastic cell lines of different origin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 68, 187–196.

Chan SY, Loscalzo J (2010). MicroRNA-210: a unique and pleiotropic hypoxamir. *Cell Cycle* 9, 1072–1083.

Chan YC, Khanna S, Roy S, Sen CK (2011). MiR-200b targets Ets-1 and is down-regulated by hypoxia to induce angiogenic response of endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 286, 2047–2056.

Chan YC, Banerjee J, Choi SY, Sen CK (2012). miR-210: The Master Hypoxamir. *Microcirculation* 19, 215–223.

Chang G, Mouillet J-F, Mishima T, Chu T, Sadovsky E, Coyne CB, Parks WT, Surti U, Sadovsky Y (2017). Expression and trafficking of placental microRNAs at the fetomaternal interface. *FASEB J.* 31, 2760–2770.

Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MMW, Hannon GJ (2010). A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* 465, 584–589.

Chen S, Zhao G, Miao H, Tang R, Song Y, Hu Y, Wang Z, Hou Y (2015). MicroRNA-494 inhibits the growth and angiogenesis-regulating potential of mesenchymal stem cells. *FEBS Lett.* *589*, 710–717.

Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang C-Y (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* *18*, 997–1006.

Choo KB, Soon YL, Nguyen PNN, Hiew MSY, Huang C-J (2014). MicroRNA-5p and -3p co-expression and cross-targeting in colon cancer cells. *J. Biomed. Sci.* *21*, 95.

Colombo M, Raposo G, Théry C (2014). Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *30*, 255–289.

Craici I, Wagner S, Garovic VD (2008). Review: Preeclampsia and future cardiovascular risk: formal risk factor or failed stress test? *Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.* *2*, 249–259.

Cross CE, Tolba MF, Rondelli CM, Xu M, Abdel-Rahman SZ (2015). Oxidative Stress Alters miRNA and Gene Expression Profiles in Villous First Trimester Trophoblasts. *Biomed Res. Int.* *2015*, 257090.

Dai Y, Diao Z, Sun H, Li R, Qiu Z, Hu Y (2011). MicroRNA-155 is involved in the remodelling of human-trophoblast-derived HTR-8/SVneo cells induced by lipopolysaccharides. *Hum. Reprod.* *26*, 1882–1891.

Delorme-Axford E, Donker RB, Mouillet J-F, Chu T, Bayer A, Ouyang Y, Wang T, Stolz DB, Sarkar SN, Morelli AE, Sadovsky Y, Coyne CB (2013). Human placental trophoblasts confer viral resistance to recipient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 12048–12053.

Dennis G, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane C, Lempicki RA (2003). DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery.

Doridot L, Houry D, Gaillard H, Chelbi ST, Barboux S, Vaiman D (2014). miR-

34a expression, epigenetic regulation, and function in human placental diseases. *Epigenetics* 9, 142–151.

Duley L (2009). The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin. Perinatol.* 33, 130–137.

Dumont TMF, Mouillet J-F, Bayer A, Gardner CL, Klimstra WB, Wolf DG, Yagel S, Balmir F, Binstock A, Sanfilippo JS, Coyne CB, Larkin JC, Sadovsky Y (2017). The expression level of C19MC miRNAs in early pregnancy and in response to viral infection. *Placenta* 53, 23–29.

Enderle D, Spiel A, Coticchia CM, Berghoff E, Mueller R, Schlumpberger M, Sprenger-Haussels M, Shaffer JM, Lader E, Skog J, Noerholm M (2015). Characterization of RNA from Exosomes and Other Extracellular Vesicles Isolated by a Novel Spin Column-Based Method. *PLoS One* 10, e0136133.

Escudero CA, Herlitz K, Troncoso F, Acurio J, Aguayo C, Roberts JM, Truong G, Duncombe G, Rice G, Salomon C (2016). Role of extracellular vesicles and microRNAs on dysfunctional angiogenesis during preeclamptic pregnancies. *Front. Physiol.* 7, 98.

Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* 2008, 102–114.

Fu G, Brkić J, Hayder H, Peng C (2013a). MicroRNAs in Human Placental Development and Pregnancy Complications. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 5519–5544.

Fu G, Ye G, Nadeem L, Ji L, Manchanda T, Wang Y, Zhao Y, Qiao J, Wang Y-L, Lye S, Yang BB, Peng C (2013b). MicroRNA-376c Impairs Transforming Growth Factor- and Nodal Signaling to Promote Trophoblast Cell Proliferation and Invasion. *Hypertension* 61, 864–872.

Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, Benjamin H, Kushnir M, Cholakh H, Melamed N, Bentwich Z, Hod M, Goren Y, Chajut A (2008). Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One* 3, e3148.

Göhner C, Plösch T, Faas MM (2017). Immune-modulatory effects of syncytiotrophoblast extracellular vesicles in pregnancy and preeclampsia. *Placenta* 60,

S41–S51.

Gunel T, Zeybek YG, Akçakaya P, Kalelioğlu I, Benian A, Ermis H, Aydınli K (2011). Serum microRNA expression in pregnancies with preeclampsia. *Genet. Mol. Res.* *10*, 4034–4040.

Gunel T, Hosseini MK, Gumusoglu E, Kisakesen I, Benian A, Aydinli K (2017). Expression profiling of maternal plasma and placenta microRNAs in preeclamptic pregnancies by microarray technology. *Placenta* *52*, 77–85.

Guo J, Tian T, Lu D, Xia G, Wang H, Dong M (2012). Alterations of maternal serum and placental follistatin-like 3 and myostatin in pre-eclampsia. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* *38*, 988–996.

Hale A, Lee C, Annis S, Min P-K, Pande R, Creager MA, Julian CG, Moore LG, Mitsialis SA, Hwang SJ, Kourembanas S, Chan SY (2014). An Argonaute 2 switch regulates circulating miR-210 to coordinate hypoxic adaptation across cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1843*, 2528–2542.

Harapan H, Andalas M (2015). The role of microRNAs in the proliferation, differentiation, invasion, and apoptosis of trophoblasts during the occurrence of preeclampsia—A systematic review. *Tzu Chi Med. J.* *27*, 54–64.

Hromadnikova I, Kotlabova K, Doucha J, Dlouha K, Krofta L (2012). Absolute and Relative Quantification of Placenta-Specific MicroRNAs in Maternal Circulation with Placental Insufficiency–Related Complications. *J. Mol. Diagnostics* *14*, 160–167.

Hromadnikova I, Kotlabova K, Ondrackova M, Kestlerova A, Novotna V, Hympanova L, Doucha J, Krofta L (2013). Circulating C19MC microRNAs in preeclampsia, gestational hypertension, and fetal growth restriction. *Mediators Inflamm.* *2013*, 186041.

Hromadnikova I, Kotlabova K, Hympanova L, Doucha J, Krofta L (2014). First Trimester Screening of Circulating C19MC microRNAs Can Predict Subsequent Onset of Gestational Hypertension. *PLoS One* *9*, e113735.

Hromadnikova I, Kotlabova K, Ivankova K, Krofta L (2017). First trimester screening of circulating C19MC microRNAs and the evaluation of their potential to predict the onset of preeclampsia and IUGR. *PLoS One* *12*, e0171756.

Huang X, Ding L, Bennewith KL, Tong RT, Welford SM, Ang KK, Story M, Le Q-T, Giaccia AJ (2009). Hypoxia-inducible mir-210 regulates normoxic gene expression involved in tumor initiation. *Mol. Cell* 35, 856–867.

Huang X, Le Q-T, Giaccia AJ (2010). MiR-210-micromanager of the hypoxia pathway. *Trends Mol. Med.* 16, 230–237.

Ishibashi O, Ohkuchi A, Ali MM, Kurashina R, Luo SS, Ishikawa T, Takizawa T, Hirashima C, Takahashi K, Migita M, Ishikawa G, Yoneyama K, Asakura H, Izumi A, Matsubara S, Takeshita T (2012). Hydroxysteroid (17- $\beta$ ) dehydrogenase 1 is dysregulated by miR-210 and miR-518c that are aberrantly expressed in preeclamptic placentas: A novel marker for predicting preeclampsia. *Hypertension* 59, 265–273.

Jung KO, Youn H, Lee C-H, Kang KW, Chung J-K (2017). Visualization of exosome-mediated miR-210 transfer from hypoxic tumor cells. *Oncotarget* 8, 9899–9910.

Kelly TJ, Souza AL, Clish CB, Puigserver P (2011). A Hypoxia-Induced Positive Feedback Loop Promotes Hypoxia-Inducible Factor 1 Stability through miR-210 Suppression of Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 1-Like. *Mol. Cell. Biol.* 31, 2696–2706.

Kingdom JCP, Drewlo S (2011). Is heparin a placental anticoagulant in high-risk pregnancies? *Blood* 118, 4780–4788.

Klonoff-Cohen HS, Savitz DA, Cefalo RC, McCann MF (1989). An epidemiologic study of contraception and preeclampsia. *JAMA* 262, 3143–3147.

Kojima T, Yamada T, Akaishi R, Furuta I, Saitoh T, Nakabayashi K, Nakayama KI, Nakayama K, Akira S, Minakami H (2015). Role of the Atg9a gene in intrauterine growth and survival of fetal mice. *Reprod. Biol.* 15, 131–138.

Kopriva SE, Chiasson VL, Mitchell BM, Chatterjee P, Mitchell B (2013). TLR3-Induced Placental miR-210 Down-Regulates the STAT6/Interleukin-4 Pathway. *PLoS One* 8, e67760.

Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, Dingli F, Loew D, Tkach M, Théry C (2016). Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E968-77.



Kumar P, Luo Y, Tudela C, Alexander JM, Mendelson CR (2013). The c-Myc-regulated microRNA-17~92 (miR-17~92) and miR-106a~363 clusters target hCYP19A1 and hGCM1 to inhibit human trophoblast differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 33, 1782–1796.

Lee D-C, Romero R, Kim J-S, Tarca AL, Montenegro D, Pineles BL, Kim E, Lee J, Kim SY, Draghici S, Mittal P, Kusanovic JP, Chaiworapongsa T, Hassan SS, Kim CJ (2011). miR-210 Targets Iron-Sulfur Cluster Scaffold Homologue in Human Trophoblast Cell Lines. *Am. J. Pathol.* 179, 590–602.

Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, Epstein FH, Romero R, Thadhani R, Karumanchi SA (2006). Soluble Endoglin and Other Circulating Antiangiogenic Factors in Preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* 355, 992–1005.

Li DK, Wi S (2000). Changing paternity and the risk of preeclampsia/eclampsia in the subsequent pregnancy. *Am. J. Epidemiol.* 151, 57–62.

Li Q, Pan Z, Wang X, Gao Z, Ren C, Yang W (2014a). miR-125b-1-3p inhibits trophoblast cell invasion by targeting sphingosine-1-phosphate receptor 1 in preeclampsia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 453, 57–63.

Li X, Li C, Dong X, Gou W (2014b). MicroRNA-155 inhibits migration of trophoblast cells and contributes to the pathogenesis of severe preeclampsia by regulating endothelial nitric oxide synthase. *Mol. Med. Rep.* 10, 550–554.

Lian IA, Langaas M, Moses E, Johansson Å (2013). Differential gene expression at the maternal-fetal interface in preeclampsia is influenced by gestational age. *PLoS One* 8, e69848.

Liu L, Wang Y, Fan H, Zhao X, Liu D, Hu Y, Kidd AR, Bao J, Hou Y (2012). MicroRNA-181a Regulates Local Immune Balance by Inhibiting Proliferation and Immunosuppressive Properties of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 30, 1756–1770.

Liu L-Z, Li C, Chen Q, Jing Y, Carpenter R, Jiang Y, Kung H-F, Lai L, Jiang B-H (2011). MiR-21 Induced Angiogenesis through AKT and ERK Activation and HIF-1 $\alpha$  Expression. *PLoS One* 6, e19139.

Luo L, Ye G, Nadeem L, Fu G, Yang BB, Honarparvar E, Dunk C, Lye S, Peng C (2012). MicroRNA-378a-5p promotes trophoblast cell survival, migration and invasion by targeting Nodal. *J. Cell Sci.* 125, 3124–3132.

Luo R, Shao X, Xu P, Liu Y, Wang Y, Zhao Y, Liu M, Ji L, Li Y, Chang C, Qiao J, Peng C, Wang Y (2014). MicroRNA-210 Contributes to Preeclampsia by Downregulating Potassium Channel Modulatory Factor 1. *Hypertension* 64, 839–845.

Luo S, Cao N, Tang Y, Gu W (2017). Identification of key microRNAs and genes in preeclampsia by bioinformatics analysis. *PLoS One* 12, e0178549.

Lykke-Andersen K, Gilchrist MJ, Grabarek JB, Das P, Miska E, Zernicka-Goetz M (2008). Maternal Argonaute 2 Is Essential for Early Mouse Development at the Maternal-Zygotic Transition. *Mol. Biol. Cell* 19, 4383–4392.

Mannelli C, Ietta F, Avanzati AM, Skarzynski D, Paulesu L (2015). Biological Tools to Study the Effects of Environmental Contaminants at the Feto–Maternal Interface. *Dose-Response* 13, 155932581561190.

Many A, Hubel CA, Fisher SJ, Roberts JM, Zhou Y (2000). Invasive cytotrophoblasts manifest evidence of oxidative stress in preeclampsia. *Am. J. Pathol.* 156, 321–331.

Mistry HD, McCallum LA, Kurlak LO, Greenwood IA, Pipkin FB, Tribe RM (2011). Novel expression and regulation of voltage-dependent potassium channels in placentas from women with preeclampsia. *Hypertension* 58, 497–504.

Miura K, Higashijima A, Murakami Y, Fuchi N, Tsukamoto O, Abe S, Hasegawa Y, Miura S, Masuzaki H (2017). Circulating Levels of Pregnancy-Associated, Placenta-Specific microRNAs in Pregnant Women With Placental Abruption. *Reprod. Sci.* 24, 148–155.

Morales-Prieto DM, Chaiwangyen W, Ospina-Prieto S, Schneider U, Herrmann J, Gruhn B, Markert UR (2012). MicroRNA expression profiles of trophoblastic cells. *Placenta* 33, 725–734.

Morales-Prieto DM, Ospina-Prieto S, Schmidt A, Chaiwangyen W, Markert UR (2014). Elsevier Trophoblast Research Award Lecture: Origin, evolution and future of placenta miRNAs. *Placenta* 35, S39–S45.

Mouillet J-F, Chu T, Sadovsky Y (2011). Expression patterns of placental microRNAs. *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol.* 91, 737–743.

Mouillet J-F, Ouyang Y, Bayer A, Coyne CB, Sadovsky Y (2014). The role of trophoblastic microRNAs in placental viral infection. *Int. J. Dev. Biol.* 58, 281–289.

Mouillet J-F, Ouyang Y, Coyne CB, Sadovsky Y (2015). MicroRNAs in placental health and disease. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 213, S163–S172.

Muralimanoharan S, Maloyan A, Mele J, Guo C, Myatt LG, Myatt L (2012). MIR-210 modulates mitochondrial respiration in placenta with preeclampsia. *Placenta* 33, 816–823.

Murphy MSQ, Casselman RC, Tayade C, Smith GN (2015). Differential expression of plasma microRNA in preeclamptic patients at delivery and 1 year postpartum. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 213, 367.e1-367.e9.

Murphy MSQ, Tayade C, Smith GN (2017). Maternal Circulating microRNAs and Pre-Eclampsia: Challenges for Diagnostic Potential. *Mol. Diagn. Ther.* 21, 23–30.

Nadkarni NA, Rajakumar A, Mokhashi N, Burke SD, Rana S, Salahuddin S, Dang Q, Thadhani R, Krishnan R, Stossel TP, Karumanchi SA (2016). Gelsolin is an endogenous inhibitor of syncytiotrophoblast extracellular vesicle shedding in pregnancy. *Pregnancy Hypertens.* 6, 333–339.

Nagashima T, Li Q, Clementi C, Lydon JP, DeMayo FJ, Matzuk MM (2013). BMPR2 is required for postimplantation uterine function and pregnancy maintenance. *J. Clin. Invest.* 123, 2539–2550.

Nagy Z, Igaz P (2015). Introduction to microRNAs: Biogenesis, Action, Relevance of Tissue microRNAs in Disease Pathogenesis, Diagnosis and Therapy—The Concept of Circulating microRNAs. In Exs, P. Igaz, ed. (Springer, Basel), pp. 3–30.

Nair S, Salomon C (2018). Extracellular vesicles and their immunomodulatory functions in pregnancy. *Semin. Immunopathol.* 40, 425–437.

Noguer-Dance M, Abu-Amero S, Al-Khtib M, Lefèvre A, Coullin P, Moore GE, Cavallé J (2010). The primate-specific microRNA gene cluster (C19MC) is imprinted in the placenta. *Hum. Mol. Genet.* 19, 3566–3582.

Nothnick W (2017). MicroRNAs and Endometriosis: Distinguishing Drivers from Passengers in Disease Pathogenesis. *Semin. Reprod. Med.* 35, 173–180.

Pasupathy D, Dacey A, Cook E, Charnock-Jones DS, White IR, Smith GC (2008). Study protocol. A prospective cohort study of unselected primiparous women: the pregnancy outcome prediction study. *BMC Pregnancy Childbirth* 8, 51.

Poirier C, Desgagné V, Guérin R, Bouchard L (2017). MicroRNAs in Pregnancy and Gestational Diabetes Mellitus: Emerging Role in Maternal Metabolic Regulation. *Curr. Diab. Rep.* 17, 35.

Poon LC, Nicolaides KH (2014). First-trimester maternal factors and biomarker screening for preeclampsia. *Prenat. Diagn.* 34, 618–627.

Pritchard CC, Kroh E, Wood B, Arroyo JD, Dougherty KJ, Miyaji MM, Tait JF, Tewari M (2012). Blood Cell Origin of Circulating MicroRNAs: A Cautionary Note for Cancer Biomarker Studies. 5, 492–497.

Racca AC, Ridano ME, Camolotto S, Genti-Raimondi S, Panzetta-Dutari GM (2015). A novel regulator of human villous trophoblast fusion: the Krüppel-like factor 6. *Mol. Hum. Reprod.* 21, 347–358.

Raposo G, Stoorvogel W (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 200, 373–383.

Rappaport N, Twik M, Plaschkes I, Nudel R, Iny Stein T, Levitt J, Gershoni M, Morrey CP, Safran M, Lancet D (2017). MalaCards: an amalgamated human disease compendium with diverse clinical and genetic annotation and structured search. *Nucleic Acids Res.* 45, D877–D887.

Raymond D, Peterson E (2011). A Critical Review of Early-Onset and Late-Onset Preeclampsia. *Obstet. Gynecol. Surv.* 66, 497–506.

Redman CW (2017). Early and late onset preeclampsia: Two sides of the same coin. *Pregnancy Hypertens. An Int. J. Women's Cardiovasc. Heal.* 7, 58.

Saben J, Zhong Y, McKelvey S, Dajani NK, Andres A, Badger TM, Gomez-Acevedo H, Shankar K (2014). A comprehensive analysis of the human placenta transcriptome. *Placenta* 35, 125–131.

Sales G, Coppe A, Bisognin A, Biasiolo M, Bortoluzzi S, Romualdi C (2010). Magia, a web-based tool for miRNA and genes integrated analysis. *Nucleic Acids Res.*

38, 352–359.

Salha O, Sharma V, Dada T, Nugent D, Rutherford AJ, Tomlinson AJ, Philips S, Allgar V, Walker JJ (1999). The influence of donated gametes on the incidence of hypertensive disorders of pregnancy. *Hum. Reprod.* *14*, 2268–2273.

Salomon C, Kobayashi M, Ashman K, Sobrevia L, Mitchell MD, Rice GE (2013a). Hypoxia-Induced Changes in the Bioactivity of Cytotrophoblast-Derived Exosomes. *PLoS One* *8*, e79636.

Salomon C, Ryan J, Sobrevia L, Kobayashi M, Ashman K, Mitchell M, Rice GE (2013b). Exosomal Signaling during Hypoxia Mediates Microvascular Endothelial Cell Migration and Vasculogenesis. *PLoS One* *8*, e68451.

Salomon C, Torres MJ, Kobayashi M, Scholz-Romero K, Sobrevia L, Dobierzewska A, Illanes SE, Mitchell MD, Rice GE (2014a). A gestational profile of placental exosomes in maternal plasma and their effects on endothelial cell migration. *PLoS One* *9*, e98667.

Salomon C, Yee S, Scholz-Romero K, Kobayashi M, Vaswani K, Kvaskoff D, Illanes SE, Mitchell MD, Rice GE (2014b). Extravillous trophoblast cells-derived exosomes promote vascular smooth muscle cell migration. *Front. Pharmacol.* *5*, 175.

Salomon C, Guanzon D, Scholz-Romero K, Longo S, Correa P, Illanes SE, Rice GE (2017). Placental Exosomes as Early Biomarker of Preeclampsia: Potential Role of Exosomal MicroRNAs Across Gestation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *102*, 3182–3194.

Schönleben M, Morales-Prieto DM, Markert U, Groten T (2016). Association of the miR-371-3 cluster and trophoblast migration. *J. Reprod. Immunol.* *115*, 57.

Schwarzenbach H, Nishida N, Calin GA, Pantel K (2014). Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *11*, 145–156.

Seitz H, Royo H, Bortolin M-L, Lin S-P, Ferguson-Smith AC, Cavaillé J (2004). A Large Imprinted microRNA Gene Cluster at the Mouse Dlk1-Gtl2 Domain. *Genome Res.* *14*, 1741–1748.

Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T (2003). Cytoscape: a software environment for integrated

models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* *13*, 2498–2504.

Sheikh AM, Small HY, Currie G, Delles C, Xiao H-S, Chen C, Bugnicourt J-M (2016). Systematic Review of Micro-RNA Expression in Pre-Eclampsia Identifies a Number of Common Pathways Associated with the Disease. *PLoS One* *11*, e0160808.

Song J, Li Y, An RF (2015). Identification of Early-Onset Preeclampsia-Related Genes and MicroRNAs by Bioinformatics Approaches. *Reprod. Sci.* *22*, 1933719115570898.

Stelzer G, Plaschkes I, Oz-Levi D, Alkelai A, Olender T, Zimmerman S, Twik M, Belinky F, Fishilevich S, Nudel R, Guan-Golan Y, Warshawsky D, Dahary D, Kohn A, Mazor Y, Kaplan S, Iny Stein T, Baris HN, Rappaport N, Safran M, Lancet D (2016). VarElect: the phenotype-based variation prioritizer of the GeneCards Suite. *BMC Genomics* *17*, 444.

Tejera E, Bernardes J, Rebelo I (2013). Co-expression network analysis and genetic algorithms for gene prioritization in preeclampsia. *BMC Med. Genomics* *6*, 51.

Tranquilli AL, Dekker G, Magee L, Roberts J, Sibai BM, Steyn W, Zeeman GG, Brown MA (2014). The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the ISSHP. *Pregnancy Hypertens. An Int. J. Women's Cardiovasc. Heal.* *4*, 97–104.

Truong G, Guanzon D, Kinhal V, Elfeky O, Lai A, Longo S, Nuzhat Z, Palma C, Scholz-Romero K, Menon R, Mol BW, Rice GE, Salomon C (2017). Oxygen tension regulates the miRNA profile and bioactivity of exosomes released from extravillous trophoblast cells – Liquid biopsies for monitoring complications of pregnancy. *PLoS One* *12*, e0174514.

Turchinovich A, Burwinkel B (2012). Distinct AGO1 and AGO2 associated miRNA profiles in human cells and blood plasma. *RNA Biol.* *9*, 1066–1075.

Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B (2011). Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res.* *39*, 7223–7233.

Turchinovich A, Samatov TR, Tonevitsky AG, Burwinkel B (2013). Circulating miRNAs: cell-cell communication function? *Front Genet.* *4*, 119.

Ura B, Feriotto G, Monasta L, Bilel S, Zweyer M, Celeghini C (2014). Potential role of circulating microRNAs as early markers of preeclampsia. *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* 53, 232–234.

Wadehra M, Dayal M, Mainigi M, Ord T, Iyer R, Braun J, Williams CJ (2006). Knockdown of the tetraspan protein epithelial membrane protein-2 inhibits implantation in the mouse. *Dev. Biol.* 292, 430–441.

Wang W, Feng L, Zhang H, Hachy S, Satohisa S, Laurent LC, Parast M, Zheng J, Chen D (2012). Preeclampsia up-regulates angiogenesis-associated microRNA (i.e., miR-17, -20a, and -20b) that target ephrin-B2 and EPHB4 in human placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, E1051-9.

Wareing M, Greenwood SL (2011). Review: Potassium channels in the human fetoplacental vasculature. *Placenta* 32 *Suppl 2*, S203-6.

Wen H, Chen L, He J, Lin J (2017). MicroRNA expression profiles and networks in placentas complicated with selective intrauterine growth restriction. *Mol. Med. Rep.* 16, 6650–6673.

Williams CJ, Chu A, Jefferson WN, Casero D, Sudhakar D, Khurana N, Hogue CP, Aryasomayajula C, Patel P, Sullivan P, Padilla-Banks E, Mohandessi S, Janzen C, Wadehra M (2017). Epithelial membrane protein 2 (EMP2) deficiency alters placental angiogenesis, mimicking features of human placental insufficiency. *J. Pathol.* 242, 246–259.

Wu L, Zhou H, Lin H, Qi J, Zhu C, Gao Z, Wang H (2012). Circulating microRNAs are elevated in plasma from severe preeclamptic pregnancies. *Reproduction* 143, 389–397.

Xiang Y, Zhang X, Li Q, Xu J, Zhou X, Wang T, Xing Q, Liu Y, Wang L, He L, Zhao X (2013). Promoter hypomethylation of TIMP3 is associated with pre-eclampsia in a Chinese population. *Mol. Hum. Reprod.* 19, 153–159.

Xiao X, Xiao F, Zhao M, Tong M, Wise MR, Stone PR, Chamley LW, Chen Q (2017). Treating normal early gestation placentae with preeclamptic sera produces extracellular micro and nano vesicles that activate endothelial cells. *J. Reprod. Immunol.* 120, 34–41.

Xie L, Mouillet J-F, Chu T, Parks WT, Sadovsky E, Knöfler M, Sadovsky Y (2014). C19MC MicroRNAs Regulate the Migration of Human Trophoblasts. *Endocrinology* *155*, 4975–4985.

Xu P, Zhao Y, Liu M, Wang Y, Wang H, Li Y-X, Zhu X, Yao Y, Wang H, Qiao J, Ji L, Wang Y-L (2014). Variations of microRNAs in human placentas and plasma from preeclamptic pregnancy. *Hypertension* *63*, 1276–1284.

Xue P, Zheng M, Diao Z, Shen L, Liu M, Gong P, Sun H, Hu Y (2013). miR-155\* mediates suppressive effect of PTEN 3'-untranslated region on AP-1/NF- $\kappa$ B pathway in HTR-8/SVneo cells. *Placenta* *34*, 650–656.

Yang Q, Lu J, Wang S, Li H, Ge Q, Lu Z (2011). Application of next-generation sequencing technology to profile the circulating microRNAs in the serum of preeclampsia versus normal pregnant women. *Clin. Chim. Acta* *412*, 2167–2173.

Yang W, Wang A, Zhao C, Li Q, Pan Z, Han X, Zhang C, Wang G, Ji C, Wang G, Jia G, Ju J, Gao W, Yu W, Liu X, Chen X, Feng W, Gao Z, Li J, Ren C (2016). miR-125b Enhances IL-8 Production in Early-Onset Severe Preeclampsia by Targeting Sphingosine-1-Phosphate Lyase 1. *PLoS One* *11*, e0166940.

Yates LA, Norbury CJ, Gilbert RJC (2013). The Long and Short of MicroRNA. *Cell* *153*, 516–519.

Young BC, Karumanchi SA (2016). Toward a Better Diagnosis for Preeclampsia. *Clin. Chem.* *62*, 913–915.

Yuen RK, Peñaherrera MS, von Dadelszen P, McFadden DE, Robinson WP (2010). DNA methylation profiling of human placentas reveals promoter hypomethylation of multiple genes in early-onset preeclampsia. *Eur. J. Hum. Genet.* *18*, 1006–1012.

Zhang Y, Diao Z, Su L, Sun H, Li R, Cui H, Hu Y (2010). MicroRNA-155 contributes to preeclampsia by down-regulating CYR61. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *202*, 466.e1-466.e7.

Zhang Y, Fei M, Xue G, Zhou Q, Jia Y, Li L, Xin H, Sun S (2012). Elevated levels of hypoxia-inducible microRNA-210 in pre-eclampsia: new insights into molecular mechanisms for the disease. *J. Cell. Mol. Med.* *16*, 249–259.



Zhao G, Miao H, Li X, Chen S, Hu Y, Wang Z, Hou Y (2016). TGF- $\beta$ 3-induced miR-494 inhibits macrophage polarization via suppressing PGE2 secretion in mesenchymal stem cells. *FEBS Lett.* 590, 1602–1613.

Zhu S, Cao L, Zhu J, Kong L, Jin J, Qian L, Zhu C, Hu X, Li M, Guo X, Han S, Yu Z (2013). Identification of maternal serum microRNAs as novel non-invasive biomarkers for prenatal detection of fetal congenital heart defects. *Clin. Chim. Acta.* 424, 66–72.

Zhu X, Han T, Wang X, Li Y, Yang H, Luo Y, Yin G, Yao Y (2010). Overexpression of miR-152 leads to reduced expression of human leukocyte antigen-G and increased natural killer cell mediated cytotoxicity in JEG-3 cells. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 202, 592.e1-592.e7.

## 10. Saját publikációk jegyzéke

### 10.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. Biró O, Fóthi Á, Alasztics B, Nagy B, Orbán TI, Rigó J (2019). Circulating exosomal and Argonaute-bound microRNAs in preeclampsia. *Gene*. 69, 138-144.

IF: 2,498\*

2. Biró O, Rigó J (2018). A mikro-RNS-ek patogenetikai szerepe és expressziós mintázata praeeclampsziában. *Orv. Hetil.* 159, 547–556.

IF: 0,322

3. Biró O, Nagy B, Rigó J (2017a). Identifying miRNA regulatory mechanisms in preeclampsia by systems biology approaches. *Hypertens. Pregnancy*. 36, 90–99.

IF: 1,257\*

4. Biró O, Alasztics B, Molvarec A, Joó J, Nagy B, Rigó J (2017b). Various levels of circulating exosomal total-miRNA and miR-210 hypoxamiR in different forms of pregnancy hypertension. *Pregnancy Hypertens.* 10, 207–212.

IF: 2,011\*

### 10.2. A tudományos munkásságot megalapozó egyéb közlemények

1. Biró O, Rigó J, Nagy B (2018). Noninvasive prenatal testing for congenital heart disease – cell-free nucleic acid and protein biomarkers in maternal blood. *J. Matern. Neonatal Med.* 5, 1-11.

IF: 1,493

2. Biró O, Hajas O, Nagy-Baló E, Soltész B, Csanádi Z, Nagy B (2018). Relationship between cardiovascular diseases and circulating cell-free nucleic acids in human plasma. *Biomark. Med.* 12, 891-905.

IF: 2,346

3. Pös O, Biró O, Szemes T, Nagy B (2018). Circulating cell-free nucleic acids: characteristics and applications. *Eur. J. Hum. Genet.* 26, 937–945.

IF: 3,636

4. Chandrasekaran A, Avci HX, Ochalek A, Rösingh LN, Molnár K, László L, Bellák T, Téglási A, Pesti K, Mike A, Phanthong P, Bíró O, Hall V, Kitiyanant N, Krause K-H, Kobolák J, Dinnyés A (2017). Comparison of 2D and 3D neural induction methods for the generation of neural progenitor cells from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.* 25, 139-151.

IF: 3,902\*

5. Bíró O, Nagy B, Rigó J (2015). A let-7c mikro-RNS vizsgálata az anyai vérplazmában magzati szívfejlődési rendellenesség esetén. *MAGYAR NŐORVOSOK LAPJA.* 78, 193-199.

6. Kehler L, Bíró O, Lazar L, Rigo J, Nagy B (2015). Elevated hsa-miR-99a levels in maternal plasma may indicate congenital heart defects. *Biomed. Reports.* 3, 869–873.

7. Kehler L, Bíró O, Lázár L, Nagy B, Rigó J (2015). A miRNS-99a expressziója anyai perifériás vérben magzati szívfejlődési rendellenességek esetében. *MAGYAR NŐORVOSOK LAPJA.* 78, 151-156.

8. Minarik G, Repiska G, Hyblova M, Nagyova E, Soltys K, Budis J, Duris F, Sysak R, Bujalkova MG, Vlkova-Izrael B, Bíró O, Nagy B, Szemes T (2015). Utilization of benchtop next generation sequencing platforms ion torrent PGM and MiSeq in noninvasive prenatal testing for chromosome 21 trisomy and testing of impact of in silico and physical size selection on its analytical performance. *PLoS One.* 10, e0144811.

IF: 3,057\*

9. Brubel R, Bokor A, Bíró O, Rigó J (2014). Az endometriosis gyógyszeres kezelésének alapelvei. *NŐGYÓGYÁSZATI ONKOLÓGIA.* 19, 56-59.

### **10.3. Tudományos közlemények összesítése**

Közlemények: 13

Nemzetközi folyóiratban: 9

Magyar nyelvű folyóiratban: 4

Eredeti közleményék összesített impakt faktora: 12,725

## **11. Köszönetnyilvánítás**

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik szerepet játszottak abban, hogy a doktori értekezésem elkészülhessen.

Hálásan köszönöm témavezetőmnek, Dr. Rigó János Professor Úrnak a bizalmát, támogatását és a lehetőséget, hogy a Semmelweis Egyetem I. számú Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikán végezhessek kutatómunkát.

Hálásan köszönöm Dr. Nagy Bálint témavezetőmnek, a Genetikai Laboratórium egykori vezetőjének mindazt az emberi és szakmai támogatást, amelyet az elmúlt években nyújtott.

Köszönettel tartozom Dr. Orbán Tamásnak, az MTA-TTK Enzimológia Intézet, Biomembrán kutatócsoport vezetőjének a lehetőségért, hogy a vizsgálatok számottevő részét együttműködésben végezhessek el. Köszönöm Fóthi Ábelnek a folyamatos szakmai támogatást és töretlen lelkesedését, amit a közös munkánk során tanúsított.

Köszönöm Dr. Alasztics Bálintnak, hogy időt nem sajnálva részt vett a mintagyűjtés fáradtságos folyamatában, ezzel lehetővé téve a kutatások elvégzését. Köszönök minden segítséget a Genetikai Laboratórium munkatársainak, Oroszné Nagy Juditnak, Tóth Anikónak, Gnotek Editnek és Farkas Ceciliának, amelyet a több éves kutatómunkához, és e doktori értekezés elkészítéséhez kaptam tőlük.

Nem készülhetett el volna a disszertáció azok nélkül, akik egyetemi tanulmányaim során útmutatást nyújtottak, hiszen az ő segítségük és támogatásuk alapozta meg a későbbi tudományos kutatói pályám alapját.

Hálával tartozom Dr. Szabad János egyetemi tanáromnak, akinek nagyfokú szakmai ismerete és kiváló pedagógiai jelleme nagyban hozzájárult ahhoz, hogy tanulmányaimat a molekuláris biológia és genetika területén folytassam.

Köszönettel tartozom Dr. Gáspári Zoltánnak, egyetemi témavezetőmnek, aki felkeltette az érdeklődésem a tudományos kutatások iránt, és szakmai elhivatottságára mindvégig példaként tekinthettem.

Végezetül, de nem utolsó sorban, hálásan köszönöm családomnak és barátaimnak mindazt a támogatást és bátorítást, amellyel átsegítettek a nehézségeken.