

# A mikroRNS-ek patogenetikai szerepe és expressziós mintázata praeeclamsiában

Doktori tézisek

**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



## Bevezetés

A praeclampsia súlyos anyai és magzati szövődeményekkel járó kórkép, mely a terhességek 3–8%-át érinti világszerte. Legfőbb tünetei a 20. terhességi hét után jelentkező magas vérnyomás és a kóros fehérjevizelés. A betegség kialakulásának oka a mai napig vitatott, az általánosan elfogadott kétféle modell szerint a klinikai tünetegyüttes a placenta perfúziós zavarának következménye. Az elégtelen vérkeringéssel rendelkező, hipoperfundált placentából különböző káros anyagok (antiangiogén faktorok, proinflammatorikus mediátorok és extracelluláris vezikulák) szekretálódnak az anyai vérkeringésbe. Az anyában ennek hatására több szervrendszert érintő elváltozások alakulnak ki, melyeket endothel diszfunkció, szisztémás gyulladás és az immunrendszer egyensúlyának felborulása jellemez.

. Az extracelluláris vesiculák sejt-eredetű kettős foszfolipid membránnal határolt struktúrák. Vizsgálatokkal 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. A sejtekből való szekréciót követően modulálhatják a szomszédos sejtek aktivitását, vagy a szervezeten belül távoli pontokra jutva, nem-hormonális módon képesek intercelluláris kommunikációra. Különböző módon képesek befolyásolni a célsejtek működését, például receptorkötődést követően intracelluláris szignáltranszdukciós kaszkádokat aktiválhatnak, vagy szabályozó molekuláik internalizációja révén befolyásolhatják a génexpressziót. Élettani terhesség esetén a trophoblast-eredetű exoszómák a 6. gestációs héttől mutathatók ki az anyai keringésben. Számuk a terhesség folyamán fokozatosan növekszik, majd szülés után 48 órán belül eliminálódnak a vérkeringésből. 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.

A miRNS-ek rövid, nem kódoló RNS-molekulák, amelyek fontos szerepet töltenek be az eukaryota gének poszttranszkripciós szabályozásában. A miRNS-ek hatásukat negatív reguláció révén fejtik ki: az mRNS szekvenciák nem transzlálódó végéhez kötődve gátolják

annak translációját vagy teljes komplementaritás esetén degradálódást idéznek elő. A miRNS-ek komplex szabályozási hálózatok részei, expressziós mintázataikra tér- és időbeli specificitás jellemző. Egy mRNS számos miRNS kötőhelyet tartalmazhat, és egy miRNS több mRNS célponttal is rendelkezhet, mely a génexpresszió finomhangolását teszi lehetővé. Olyan alapvető élettani folyamatok finomhangolásában vesznek részt, mint a sejtciklus, a proliferáció, a differenciáció és a sejthalál.

Genomszintű vizsgálatok során a placentában több száz miRNS-t azonosítottak. A placentában expresszálódó miRNS-ek terhesség folyamán betöltött funkciója a mai napig tisztázatlan, feltehetően szerepet játszanak a placenta génjeinek dinamikus szabályozásában és szükségesek a terhesség zavartalan lefolyásához. Rendellenes expressziójuk hozzájárulhat különböző terhességi kórképek, köztük a praeclampsia kialakulásához. A placentában expresszálódó miRNS-ek jelentős része, a syncytiotrophoblast rétegből aktív vagy passzív szekréció révén kijut az anyai véráramba. A keringésben extracelluláris vesiculákba csomagolódva, lipoprotein vagy RNS-stabilizáló fehérjékhez (legfőképpen Ago2) kötötten fordulnak elő, melynek köszönhetően a közegre jellemző nagyfokú RNáz aktivitással szemben védeltséget élveznek. 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 kizárólag non-vesiculáris frakcióban jelenlévő miRNS-ek vélhetően az általános élettani folyamatok és sejthalál non-specifikus melléktermékei.

Praeclampsziában a placenta kóros fejlődése elhúzódó hypoxiás állapot kialakulásához vezet, ami befolyásolhatja a kibocsátott extracelluláris vesiculák mennyiségét és tartalmát is. A *miR-210* egy úgynevezett "hypoxamiR", neve az oxigénhiányos állapotra való érzékenységből adódik. Kifejeződését a hypoxiás válasz egyik fő jellemzőjeként tekintik, a jelenséget számos sejttípusban megfigyelték. Az emelkedett *hsa-miR-210* szint terhességre gyakorolt közvetlen hatása jelenleg ismeretlen, mindazonáltal több tanulmány megerősítette, hogy praeclampsia esetén mind a placentában, mind az anyai vérben fokozottan expresszálódik. Az intenzív kutatások ellenére még nem áll rendelkezésünkre bizonyíték arra vonatkozóan, hogy a miRNS 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.

## Célkitűzések

**I.** 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 praeeclampsia kialakulásához. A miRNS-ek patogenitásának felmérésére expressziós adatbázisból nyert adathalmazokon bioinformatikai elemzést hajtunk 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.** A placentában expresszáldó miRNS-ek jelentős része, a trophoblast rétegből aktív vagy passzív szekréció révén kijut az anyai vérkeringésbe. Praeeclampszában 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 magasvérnyomásos csoportokban, továbbá összefüggést keresése a kérdéses faktorok és a praeeclampsia súlyossága között.

**III.** A *hsa-miR-210* praeeclampsia 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 praeeclampszával 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.

## Módszerek

### Bioinformatikai analízis

A miRNS-mRNS hálózat felépítéséhez miRNS- és génexpressziós adathalmazokat kerestünk a Gene Expression Omnibus és ArrayExpress adatbázisokban. A kritériumok a következők voltak: praeclampsia 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.

A microarray adatok elemzését az R statisztikai csomag implementálásával végeztük el. A kapcsolódó Bioconductor projekt további R csomagokat biztosít a microarray adatelemzéshez. Az mRNS és miRNS expressziós adatok integrálására a MAGIA webes eszközt használtuk. Az elemzés azon az elgondoláson alapul, hogy a miRNS és célpontjai inverz módon fejeződnek ki. A beépített target predikciós elemzés lehetővé teszi a miRNS-ek és a célpont mRNS-ek közötti kísérletesen alátámasztott szabályozási kapcsolatok felderítését. 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.

A miRNS-mRNS hálózat megalkotásához a Cytoscape szoftvercsomagot alkalmaztuk. Bizonyos alhálózatokat a humán fehérje referencia adatbázis (HPRD) 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) használtuk, mely lehetővé tette a placentában termelődő fehérjék kiválasztását.

A szabályozott gének funkcionális analízisét DAVID bioinformatikai adatbázis segítségével végeztük el. Az online szoftver három gén-ontológia (GO) kategóriába sorolja a géneket: biológiai útvonat, molekuláris funkció és sejtkomponens.

## **Laboratóriumi vizsgálatok**

### **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 magasvérnyomással érintett várandósoktól: chronicus hypertonia (CHT), gestatio hypertonia (GHT) és praeclampsia (PE).

Placentaminták: A placenta mintákon elvégzett vizsgálatokba elektív illetve sürgősségi császármetszésre irányított várandós nők kerültek bevonásra. A betegcsoportot praeclampsia-ával érintett várandósok, a kontroll csoportot egészséges terhesek alkották.

### **Mintagyűjtés és előkészítés**

Vérminták gyűjtése és feldolgozása: Az anyai perifériás vérmintákat EDTA tartalmú csövekbe gyűjtöttük. 10 percig 2500 x g fordulatszámon, majd a leszívott felülúszót 10 percig 12500 x g fordulatszámon centrifugáltuk. Az ily módon kapott úgynevezett „vérlemezke mentes plazma” mintákat -80°C-on tároltuk a további feldolgozásig.

Placentaminták gyűjtése és feldolgozása: A placenta anyai felszínén a sérült, további vizsgálatra alkalmatlan területeket elkülönítettük. A bazális membránból 1–2 mm-t eltávolítottunk és a villusok alkotta lebenyekből borsónyi méretű szövetmintákat vettünk. A mintákat kétszer mostuk 4°C-os 1x foszfát-puffer oldatban, majd RNAlater stabilizáló oldatba helyeztük.

### **Sejtenyésztés és kezelés**

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 sejtenyészeteket standard körülmények között (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) termosztátban tartottuk. A JAR sejteket RPMI-1640, a HTR-8 sejteket pedig DMEM tápoldatban tartottuk, melyet mindkét esetben 10% FBS-sel, 1% L-Glutaminnal és antibiotikumokkal komplettáltunk.

A sejtek kezelését megelőzően sejt számlálást végeztünk, 6 lyukú plate-re lyukanként 4x10<sup>5</sup> sejtet raktunk ki 2 ml-es végtérfogatú exoszóma-mentes médiumban. A sejteket 24 óra

elteltével 100  $\mu$ M hypoxia-indukáló szerrel (DFO), vagy kontrollként DMSO-val kezeltük, majd standard körülmények között további 24 órán keresztül tenyésztettük.

## **RNS és miRNS izolálás**

### **Exoszómális miRNS izolálás precipitációs módszerrel**

A vérmintákból exoszóma izolálást végeztünk MN Exosome Precipitation Solution (Serum/Plasma) kit felhasználásával. Az exoszóma izolátumokból miRNS extrakciót végeztünk a NucleoSpin® miRNA Plasma kit felhasználásával, a gyártó leírásának megfelelően.

### **Extracelluláris miRNS izolálás membrán-alapú affinitásoszlop módszerrel**

A vérmintákból és a sejtenyészti tápoldatokból elválasztottuk az exoszómális és Ago-kötött frakciókat a QIAGEN ExoRNEasy kittel. Ezt követően, az extracelluláris miRNS-ek izolálásához a miRNeasy kitet alkalmaztuk.

### **Totál-RNS izolálás placentaszövetből és sejtenyészettelből**

A placentaszövetből és sejtenyészetekből való RNS izolálást TRIzol lízis reagenssel, a gyártó leírása szerint végeztük.

## **RNS és miRNS koncentráció meghatározás**

A vizsgált minták totál-RNS koncentrációját Nanodrop 1000 UV-VIS spektrofotométer segítségével határoztuk meg. A miRNS koncentráció specifikus meghatározáshoz a Qubit® microRNA Assay Kitet alkalmaztuk, mely fluoreszcens festékes jelöléssel teszi lehetővé a kis RNS-ek szelektív és pontos mérését. A leolvasáshoz a Qubit® 2.0 Fluorométert használtuk.

## **Valós idejű kvantitatív polimeráz lánreakció (RT-PCR)**

A vizsgálni kívánt miRNS-ek szintjét RT-PCR módszerrel határoztuk meg. Az RNS minták reverz transzkripcióját a miRCURY LNA™ Universal cDNA Synthesis Kit felhasználásával végeztük el, a gyártó leírásának megfelelően. A cDNS szintézis hatékonyságának ellenőrzéséhez az UniSp6 RNS spike-in-t alkalmaztuk. A RT-PCR reakciót az ExiLent SYBR® Green master mix kitet hajtuk végre a vizsgált miRNS-ekre specifikus LNA™ PCR primerek segítségével. Olvadásgörbe analízis segítségével azonosítottuk az amplifikált



termékeket és kizártuk a primerek nonspecifikus kötődését. A *hsa-miR-210* relatív expresszióját a ddCT módszerrel számoltuk ki, és a *hsa-miR-103a* belső kontroll miRNS-éhez normalizáltuk. A mérések során további miRNS-eket is vizsgáltunk: a *hsa-miR-16* egy a vérben abundáns, főleg a vörösvértestekből felszabaduló miRNS, míg a *hsa-mir-517c* a C19MC miRNS család tagja, és kizárólag a placentában expresszálódik.

## **Statisztika**

A statisztikai elemzések elvégzéséhez a STATISTICA analitikai szoftvercsomagot használtuk. A folytonos változók normalitásának felmérésére Shapiro-Wilk W tesztet alkalmaztunk.

## **II. Vizsgálat**

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 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 logaritmikus 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

## Eredmények

### I. miRNS-mRNS hálózat

A nyers miRNS és mRNS expressziós adathalmazok minőségi ellenőrzésével majd normalizálásával kapott adatok megfelelőnek bizonyultak a további elemzéshez. A normalizált adathalmazok további szűrése az 1105 humán érett miRNS-próba 704-re, és a 40716 gén-próba 26808-ra való leszűkítését eredményezte. A differenciális génexpressziós analízis elvégzésével megkaptuk a beteg- és kontrollcsoportban eltérően expresszáldó miRNS-ek listáját. A praeclampsias 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 ( $FC < 0,5$ ,  $p < 0,05$ ).

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. A legjelentősebb találatok 85 csomópontot (33 miRNS-t és 52 szabályozott gént) és 80 interakciót foglaltak magukban.

Az 52 gén közül 11-et korábban már összefüggésbe hoztak praeclampsiaival: ATG9A, BMPR2, DLG5, EMP2, FSTL3, KCNQ4, KLF6, TCF7L2, TIMP3, QSOX1 és XDH. Kilenc gén többszörös miRNS szabályozás alatt áll, ezek a QSOX1, BAIAP2, SESTD1, PRKAB2, TIMP3, CMTM4, DAND5, EMP2 és XDH csökkenő fokszámú sorrendben. A 33 miRNS közül 9 irodalmi adatok alapján szerepet játszik praeclampsiaiban: *hsa-miR-17\**, *hsa-miR-18a\**, *hsa-miR-193b\**, *hsa-miR-200b*, *hsa-miR-296-3p*, *hsa-miR-210*, *hsa-miR-27a\**, *hsa-miR-33b\** és *hsa-miR-637*. 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. A génontológiai annotáció elvégzése alapján az eltérően expresszáldó miRNS-ek főként fejlődési folyamatokban résztvevő géneket szabályoznak.

A *hsa-miR-210* által szabályozott fehérje-fehérje interakciós hálózatban 101 kölcsönhatásba lépő fehérje közül 70 expresszáldik a placentában. 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. 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.

## **II. Az exoszómális össz-miRNS koncentráció és a hsa-miR-210 expressziós profilja különböző típusú terhességi magasvérnyomásos kórképekben**

Az exoszómális össz-miRNS koncentráció medián értéke a kóros alcsoportokban és a kontrollcsoportban a következők voltak: N: 0,26 ng/μl (0,10-0,76 ng/μl); GHT: 0,28 ng/μl (0,16-0,91 ng/μl); CHT: 0,30 ng/μl (0,22-0,38 ng μl); mPE: 0,83 ng/μl (0,42-1,85 ng/μl); sPE: 1,57 ng/μl (0,25-8,21 ng/μl). 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 rárakódásos PE nem volt elkülöníthető az össz-miRNS koncentráció alapján, és a társult IUGR nem volt szignifikáns hatással az érintett csoportokra.

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 rárakódásos 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.

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.

### III. Exoszómális és Ago-kötött hsa-miR-210 szekréció praeclampsziában

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

A placentamintákban mért *hsa-miR-210* szint szignifikánsan magasabb volt PE-ban a kontrollcsoporthoz képest: 1,06 (0,84-1,62) vs. 3,26 (1,94-4,72),  $p < 0,05$ . 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),  $p < 0,05$ .

A placentáris *hsa-miR-517c* fokozott expressziót mutatott PE-ban a kontrollcsoporthoz képest: 0,82 (0,56-1,62) vs. 2,33 (1,28-4,50),  $p < 0,05$  (F1.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),  $p > 0,05$ ). A *hsa-mir-16* esetén sem a szöveti- (0,95 (0,58-1,86) vs. 1,31 (0,76-2,00),  $p > 0,05$ , F2.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),  $p > 0,05$ ).

#### 2. A *hsa-miR-210* hypoxia-indukált expressziója 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:  $1,02 \pm 0,11$  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 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:  $1,42 \pm 0,54$  vs.  $0,78 \pm 0,25$ ). A *hsa-miR-517c* nem expresszálódik ebben a sejtvonalban, így egyik vizsgált közegben sem tudtuk detektálni.

## 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 fokszámú csomópont, mely miRNS-t korábban már összefüggésbe hozták praeclampsiaival.

**II.** Laboratóriumi vizsgálatunkban összevetettük az exoszómális miRNS-ek összmenységét és a *hsa-miR-210* expressziós szintjét különböző típusú terhességi magasvérnyomásos 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 csomagolóódik, melynek szerepe lehet a betegség pathomechanizmusában.

**III/1.** A placentamintákban mért *hsa-miR-210* szint szignifikánsan magasabb volt praeclampsiaiban 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 szekrécija mellett az Ago-kötött miRNS-ek nagymértékű passzív felszabadulása is megjelenik praeclampsiaiban,

**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* szekréción eredményezett. Az elvégzett vizsgálatok eredményei arra engednek következtetni, hogy praeclampsiaiban 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.

## Saját publikációk jegyzéke

### 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 praeclampszában. *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\*

### 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.

**Eredeti közleményék összesített impakt faktora: 12,725**