

Rendszerbiológia: génexpressziós mintázatok és a transzkripció szabályozása

Dr. Gyórfy András
Doktori (Ph.D) értekezés

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Tulassay Zsolt egyetemi tanár
Dr. Gyórfy Balázs, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Prohászka Zoltán, Ph.D.
Dr. Treszl András, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Rácz Károly egyetemi tanár, az MTA tagja
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Nagy Gábor, Ph.D.
Dr. Hermann Róbert, Ph.D.
Dr. Banai János egyetemi tanár

Budapest
2007

Összefoglalás

A microarray technológiák elterjedésének köszönhetően hatalmas ismeretanyag birtokába kerültünk az egészséges és beteg sejtekben és szövetekben folyó transzkripció mértékéről. A technológiai eszközök által szolgáltatott adattömegek statisztikai módszerekkel történő feldolgozásával az egyes gének relatív expresszióváltozásáról ugyan pontos információink vannak, a szerteágazó folyamatokat összefogó közös irányító rendszerekről azonban keveset tudunk.

Ph.D. munkám célja e génexpressziós szabályozó mechanizmusok tanulmányozása volt, amelynek keretében két alternatív in silico kutatási feladattal foglalkoztam. Ennek során a transzkripció *cisz* és *transz* szabályozását egyaránt vizsgáltam. A vizsgált *transz* szabályozó elemekhez tartoznak a transzkripció befolyásolásáért felelős transzkripciós faktorok. Hatásukat korábbi kutatások során doxorubicin és 5-fluorouracil kemoterápiás gyógyszerekkel szembeni rezisztenciával összefüggésbe hozott gének listáján keresztül vizsgáltam. Emlőrákban a doxorubicin rezisztenciával kapcsolatba hozott, együtt szabályozott gének közös expressziós rajzolatainak kialakulásában vizsgálataim alapján az E47 transzkripciós faktornak fontos szerepe van. Az 5-fluorouracil rezisztencia kialakulásában kulcsfontosságú az apoptotikus mechanizmusok modulálásának felfedezése.

A *cisz* szabályozás módjait az antiszenz transzkripció elemzésén keresztül, a génexpressziós mechanizmusokat adott expressziós adatok alapján kutattam. Az antiszenz transzkripciót 1182 egér gén expressziós adatainak értékelésén keresztül mértem és a kapott adatok alapján a teljes genomra kiterjedő gyakoriságát 43%-ra becsültem. A 14-es és 1-es kromoszómán magas szintű relatív antiszenz expressziót találtam más kromoszómákhoz viszonyítva. Magas expressziós értékeknél a szenz-antiszenz génexpresszió inverz korrelációját fedeztem fel. Ezek az adatok egér genomban az antiszenz transzkripció szabályozó karakterisztikáját támasztják alá.

Munkám során a kutatási feladatok mellett olyan technológai fejlesztést valósítottam meg, amellyel a kapott és egyszerűsített eredmények diagnosztikai szintű alkalmazása lehetővé válik. Pozícionáló rendszert és kereskedelmi forgalomban kapható egyszer használatos pipettahegyeket alkalmazó pipettázó automata rendszert fejlesztettem. Bár az

effektív munka jelentős része e fejlesztés és a hozzá kapcsolódó mintaoltalmak és szabadalmak létrehozását jelentette, eredményeit a módszerekben és eredményekben foglalom röviden össze. Ennek oka, hogy ezek az eredményektől függetlenül a Ph.D. fokozatszerzés értékelésében jelentőséggel nem bírnak.

cím: Rendszerbiológia: génexpressziós mintázatok és a transzkripció szabályozása

szerző: Dr. Gyórfy András

témavezető: Dr. Tulassay Zsolt és Dr. Gyórfy Balázs SE II. Belgyógyászati Klinika, 2007.

Summary

Title: Systems biology: gene expression signatures and the regulation of transcription

Author: Dr. Gyórfy András

Consultants: Dr. Tulassay Zsolt and Dr. Gyórfy Balázs SE II. Dept of Internal Medicine 2007

Microarray technologies provide tremendous information about the transcription activity in normal and diseased cells and tissues. The resulting databanks can be mined by appropriate statistical methods to get insight into the expression changes of single genes. However, our knowledge regarding the common controlling networks for all of these genes as a biological complex is relatively scarce.

During my PhD studies I focused on these regulatory systems using in silico systems biology tools. I have investigated both cis and trans transcription regulation. Among the trans transcription regulatory elements I have investigated the role of transcription factors. Their role was investigated in correlation with doxorubicin and 5-fluorouracil resistance using previously published chemotherapy-resistance associated gene lists. The E47 transcription factor was identified as common transcription factors responsible for co-regulation of gene expression signatures associated with doxorubicin resistance in breast cancer. The modulation of the apoptotic machinery was identified as a key mechanism of 5-fluoruracil resistance.

The cis regulation was investigated focusing on antisense transcription. The antisense expression was measured in 1182 mouse genes. Here, 43% genome-wide frequency of antisense transcription was measured. The chromosomes 14 and 1 have relatively high level of antisense transcription compared to the other chromosomes. At high expression levels an inverse sense-antisense gene expression correlation was observed. These results support the regulatory characteristics of antisense transcription in mouse genomes.

During these studies I have also executed a technological development for the diagnostic measurement of microarray results. Here, a positioning system and an automated pipetting system was developed. The positioning system has a 99% accuracy for spotting oligo drops on a microscopic glass slide. The achieved results are briefly summarized in the results section and are also included in two submitted patent applications.

Tartalomjegyzék

Összefoglalás	1
Summary	4
Tartalomjegyzék	5
Rövidítésjegyzék	7
1 Irodalmi áttekintés	9
1.1 Génexpresszió és szabályozása, a transzkripciós faktorok	9
1.1.1 Promóterrégió	9
1.1.2 A transzkripció fő elvei	9
1.1.3 Transzkripciós faktorok	10
1.1.3.1 Faktorok kapcsolódása	10
1.1.3.2 Faktorok aktiválása, aktiváció jelentősége	11
1.1.4 RNS-polimeráz működése	12
1.1.5 A transzkripciós faktorok az expressziót szabályozó fiziológias folyamatokban	13
1.1.5.1 A transzkripciós faktorok önszabályozó funkciója	13
1.1.5.2 A transzkripciós faktorok és a sejtöregedés	13
1.1.6 A transzkripciós faktorok és az onkogenitás	14
1.1.7 A transzkripciós faktorok a multidrog-rezisztencia kialakulásában, a multidrog-rezisztencia komplexitása	15
1.1.7.1 A multidrog-rezisztencia és az apoptózissal kapcsolatban álló transzkripciós faktorok	16
1.1.7.2 A topoizomeráz II-represszor gátlási mechanizmusai: doxorubicin, etopozid	16
1.2 Antiszenz transzkripció	17
1.2.1 Az antiszenz párok és az antiszenz transzkripció módjai	17
1.2.2 Antiszenz gyakoriság, általános antiszenz expresszió	18
1.2.3 Az antiszenz szabályozási funkciók	19
1.2.3.1 A kis interferáló RNS-ek, mikro RNS-ek és az RNS interferencia	20
1.3 Szabályozási mechanizmusok kutatásának alapjai, technológiai feltételei és eredményei ..	22
1.3.1 Affymetrix chippek a transzkripció és az antiszenz expresszió tanulmányozásában ..	22
1.3.2 A génexpressziós mintázat a multidrog rezisztencia vizsgálatában	22
1.3.3 Génexpressziós adatbázisok	23
1.3.4 Transzkripciós faktor-kötőhely-kereső programok	24
1.4 Az automata pipettázó berendezés és a technika állása releváns szabadalmak tükrében ..	26
2 Célkitűzések	29
2.1 Microarray adatok alapján konszenzus génlista létrehozása	29
2.2 Transzkripciós faktorok identifikálása	29
2.3 Antiszenz transzkripció génexpressziós mintázatokban	29
2.4 Technológiai fejlesztés	30
3 Módszerek	31
3.1 Forrás adatok összeállítása a transzkripciós faktorok keresésére	31
3.2 Transzkripciós faktorok meghatározása	33
3.2.1 Szekvenciák kinyerése	33
3.2.2 A transzkripciós faktor-kötőhely meghatározása	34

3.3	Antiszenz transzkripció mértékének meghatározása.....	37
3.4	Szabadalmak, az automata mérőrendszer és pozicionáló leírása	38
3.5	Szabadalmak, az automata mérőrendszer és pozicionáló működése.....	44
4	Eredmények	47
4.1	Rezisztenciával kapcsolatban álló konszenzus génlista	47
4.2	Közös transzkripció faktor meghatározása a kapott génlistában	49
4.3	Antiszenz transzkripció mértékének meghatározása.....	49
4.4	Az automata mérőrendszer és pozicionáló eljárás.....	63
4.4.1	A készülék működése	63
4.4.2	A pozicionáló automata pontossága	66
5	Megbeszélés	67
5.1	Transzkripció faktorok mint a génexpresszió kulcselemei	67
5.1.1	Az E47 transzkripció faktor	68
5.2	Az antiszenz transzkriptumok	71
5.2.1	Az antiszenz szabályozási funkciók	71
5.2.2	Antiszenz expresszió és az MHC II.....	72
5.2.3	Antiszenz expresszió és a dystrophinhiány	73
5.2.4	Kromoszómák és az antiszenz transzkripció	74
5.3	Találmányok a DNS-chip fejlesztésben	75
6	Összefoglalás	77
6.1	A génexpresszió transz szabályzó elemeinek vizsgálata	77
6.2	A génexpresszió cisz szabályzásának vizsgálata.....	78
6.3	Oligo spottoló technológia fejlesztése.....	79
	Irodalomjegyzék	81
	Köszönetnyilvánítás.....	94

Rövidítésjegyzék

AS:	antiszenz
Bp:	bázispár
CDK :	ciklindependens kináz
ChIP:	kromatin immunprecipitáció
CIS:	ciszplatin
DHMEQ:	dehidroximetil-epoxikinomicin
DOX:	doxorubicin
dszRNS:	duplaszálú RNS
EMSA :	elektroforetikus mobilitás eltolódás vizsgálatok
EPD:	eukarióta promóter-adatbázis
EST:	expresszált szekvencia szakasz
HLH:	hélix-loop-hélix
IKK:	I κ B-kináz
Il-6, IL-8:	interleukin-6, interleukin-8
Kb:	kilobázis
miRNS	mikro RNS
MDR:	multidrog rezisztencia
NCBI:	National Center for Biotechnology
NF- κ B:	nukleáris faktor- κ B
PAM:	Prediction Analysis for Microarray
PBC:	primer biliáris cirrhosis
RB:	retinoblasztóma tumorszuppresszor protein
RFLP:	restrikciós fragmens hossz-polimorfizmus
RISC:	RNS által indukált elcsendesítő enzim komplex
SA:	szenz-antiszenz
siRNS:	kis interferáló RNS
SNP:	egyetlen nukleotidot érintő polimorfizmus
TF:	transzkripció faktor

TFKH :	transzkripciós faktor-kötőhely
TNF- α :	tumor-nekrózis faktor α -receptor
TRED:	transzkripciós szabályozó elem adatbázis
UTR:	át nem írt régió
VCR:	vinkrisztin
5FU:	5-fluorouracil

1 Irodalmi áttekintés

1.1 *Génexpresszió és szabályozása, a transzkripciós faktorok*

Az Eumetazoák valamennyi sejtjében 35-50 ezer gén van. A sejtspecializáció minden egyes sejt (szövet) esetében a gének megfelelő csoportjainak kiválasztásán, expresszióján, illetve annak szabályozásán alapul. Az adott sejt fiziológiai és egyéb környezeti hatásokra adott válaszai ezeknek a génproduktumoknak a finom válasz-regulációjában rejlik.

Valamennyi gén expressziójának elsődleges szabályozása a transzkripciós faktorok által valósul meg, amelyek a DNS-szabályozó szekvenciához kapcsolódva indítják el a DNS átírást RNS-sé.

1.1.1 Promóterrégió

A szabályozó szekvenciák olyan szekvenciaszakaszokat jelentenek, amelyek az átírnivaló gén előtti szekvenciaregióban, az úgynevezett promóteren helyezkednek el. A legtöbb promóteren több szabályozó szekvencia helyezkedik el, és általában több transzkripciós faktor együttes kapcsolódása szükséges az átírás megindításához. A transzkripciós faktorok aktivitása kapcsolatfüggő, és más szomszédos kapcsolódó szabályozó molekulák által is befolyásolt. Ennek megfelelően egy aktivált transzkripciós faktor egy gén transzkripcióját indukálhatja, mialatt egy másikat gátolhatja (Ogata és mtsai 2003). Így lehetséges, hogy valamennyi gén több jelátviteli folyamathoz kapcsolódik, és átírása finom szabályozási hálózaton keresztül valósul meg (Lefstin és Yamamoto 1998; McKenna és O'Malley 2002). Az eltérő típusú transzkripciós faktorok bevonása a génregulációba lehetővé teszi a különböző szignálok összehangolását a nukleuszban (Ogata és mtsai 2003).

1.1.2 A transzkripció fő elvei

Három általános elv érvényesül a transzkripció során:

1. Fehérjefaktorok felelősek minden egyes lépésért, amelyek egymással funkcionálisan és gyakran fizikálisan is kapcsolatban vannak.

2. A komplex folyamat szabályozása több szintű. A transzkripció valamennyi lépése a következő lépés alárendeltje, minden egyes fázis fizikailag és funkcionálisan is a következőhöz kapcsolódik.

3. Nincs általános szabály a komplex folyamat szabályozására: különböző osztályokba tartozó gének szabályozása különböző lépéseknél történik (Orphanides és mtsai 2002).

1.1.3 Transzkripciós faktorok

Az összes gén több mint 5%-a transzkripciós faktorok fehérjéit kódolja, ami sejtbioológiai jelentőségüket jelzi (Tupler és mtsai 2001). Ezen fehérjéknek a transzkripcióra gyakorolt kontrollja szerteágazó szabályozó utakon keresztül valósul meg.

Aktivált transzkripciós faktorok a transzkripciós faktorkötőhelyekhez (TFKH) történő kapcsolódását követően más egységekkel együtt (pl. más transzkripciós faktorokkal) elősegítik a DNS-hez való hozzáférést, az RNS-polimeráz enzim kapcsolódását a transzkripcionális indító helyhez és az átírás beindítását (Orphanides és mtsai 2002).

1.1.3.1 Faktorok kapcsolódása

Transzkripciós faktorok nemcsak egy DNS-szekvenciához kötődnek, hanem bizonyos fokú aspecifitással is rendelkeznek a felismerő szekvencia tekintetében. Ezért a promóterszekvencián elhelyezkedő TFKH-et nem lehet egyszerűen csak a szimpla „egy-az-egyben” szekvenciapár kapcsolódás alapján meghatározni. Ma ezért a kutatók sokkal inkább mátrixokat használnak, amelyekben különböző súllyal jellemzik az egyes nukleotidok jelentőségét a transzkripciós faktor kötésében betöltött szerepük szerint (Wingender és mtsai, 2001). Ezeknek a mintázatoknak a gyűjteménye megtalálható a TRANSFAC adatbázisban (www.gene-regulation.com/pub/databases.html#transfac).

Bizonyos transzkripciós faktorok helyi kromatin újraalakulást, fellazulást indukálnak, még akkor, amikor az nukleosómákba csomagoltan található. E faktorok nukleosómális

DNS-hez való kötődési képessége a kötődési hely pontos lokalizációjától függ (Urnov és Wolffe 2001). További transzkripciót aktiváló fehérjék a kitömörített és fellazított kromatinstruktúrájú DNS-hez tudnak csak kötődni a transzkripció beindításához (Narlikar és mtsai 2002). Az aktivátoroknak a koregulátorok széles családjával való együttműködése szükséges a kívánt hatás (transzkripció elindításának) eléréséhez (McKenna és O'Malley 2002).

Számos transzkripciós faktor dimer vagy tetramer formában kötődik a DNS-hez, ennek megfelelően a DNS-kötőhely gyakran módosul: fél-helyek egymástól különböző hosszúságú részekkel választódnak el (Marinescu és mtsai 2005).

1.1.3.2 Faktorok aktiválása, aktiváció jelentősége

A DNS-promóteren létrejövő transzkripciós szabályozó faktorok interakciója egy úgynevezett „kombinatorikus transzkripciós regulációs egységet” hoz létre 3-féle mód valamelyikén. A kapcsolat kialakulhat DNS-kötő faktorok és nem DNS-kötő faktorok között, vagy olyan DNS-kötő faktorok között, amelyek a promóteren a szomszédos DNS-szakaszok között helyezkednek el, esetleg olyan DNS-kötő faktorok között, amelyek a promóterhez képest távoli szakaszon, attól függetlenül helyezkednek el. A DNS-promóteren a faktorok kapcsolódási módja sztereospecifikus multiprotein kapcsolódás, amely létrehozza vagy stabilizálja a DNS-hurkot. A létrejövő DNS-hurok számos genetikai eseményt von maga után a transzkripcionális szabályozásban, úgymint aktivációt, repressziót, terminációt, DNS-replikációt, DNS-rekombinációt és DNS-reparációt (Ogata és mtsai 2003).

A DNS-kötő faktorok és nem DNS-kötő faktorok közötti interakcióra tipikus példa a Runx1 aktiváció. A Runx1 és CBF β transzkripciós faktorok a magzati májban a haemopoézisben játszanak fontos szerepet. E proteinek kódoló gének gyakran sérülnek, a ma ismert leukémiás megbetegedések 30%-a ezekre az elváltozásokra vezethető vissza. A CBF β körülbelül ötszörösére növeli a Runx-család DNS-hez történő kapcsolódását anélkül, hogy közvetlenül kötődne a DNS-hez. A létrejövő Runx1-CBF β -DNS-komplex hőstabilitása nagyobb, mint a sima Runx1-DNS-komplexé. Ennek oka a fehérjeképződés allosztérikus szabályozásában keresendő: hidrogénhíd-kötésrendszer alakul ki az Runx1-CBF β -DNS-

komplexben. A betegség során a létrejövő mutációk hatására a hidrogén-kötésrendszer megváltozik, a kisebb kötési stabilitás a rendszer sérüléséhez és leukémiához vezet (Ogata és mtsai 2003).

A c-Myb transzkripciós faktor a haemopoetikus sejtekben a proliferációt és a differenciálódást szabályozza. Ennek során a granulociták differenciálódásához szükséges *mim-1* promóteréhez is kötődik a C/EBP transzkripciós faktoral együtt. Leukémiás megbetegedés esetén a c-Myb mutációjának köszönhetően a C/EBP nem tud kapcsolódni a promóterhez, az átírás gátlódik, megakadályozva a granulociták differenciálódását. Az elemzések során kiderült, hogy a két transzkripciós faktor egymástól függetlenül kapcsolódik a natív DNS-hez, és az egymáshoz való megfelelő kapcsolódásuk eredménye a DNS-hurok kialakulása, valamint a sikeres transzkripció beindítása (Ogata és mtsai 2003; Friedman 2002).

1.1.4 RNS-polimeráz működése

A prokarióta enzimekkel ellentétben az eukarióta RNS-polimeráz nem képes a célgén promóterszekvenciáját felismerni, ezért ehhez általános transzkripciós faktorok sorozata szükséges (Orphanides 1996; Roeder 1996; Woychik és Hampsey 2002). Ezek a proteinfaktorok együtt ismerik fel a konzervatív TATA-boxot valamint az indító (iniciátor) szekvenciát, és odavonzzák az RNS-polimerázt a transzkripciós start-helyre. A háromféle RNS-polimeráz közül az RNS-polimeráz II felelős a fehérjekódoló gének átírásáért. A transzkripciót az RNS-polimeráz II az előbb említett általános transzkripciós faktorok, és egyéb regulációs faktorok együttesével képzett „holoenzim” formájában indítja be. Amint az RNS-polimeráz II elindítja a transzkripciót, a csupasz RNS módosul: 5' végére egy CAP struktúra kerül, ami az új transzkriptumot védi a nukleázoktól és később kapcsolódási helyet biztosít a szállítófehérjéknek. Ezeknek feladata a kész mRNS transzportja a citoplazmába (Proudfoot és mtsai 2002).

1.1.5 A transzkripciós faktorok az expressziót szabályozó fiziológias folyamatokban

1.1.5.1 A transzkripciós faktorok önszabályozó funkciója

Változó inger hatására a sejtnak képesnek kell lennie a transzkripcionális aktivátorok gyors hatástalanítására. A transzkripciós faktorok egységes működése azok aktivitásával és összekapcsolt inaktiválásával valósul meg (Salghetti és mtsai 2001). A promóterhez kötődött aktivált transzkripciós faktorok gyors lebomlása újraindítja a szignál-kaszkárendszer, lehetővé téve a sejtnak a környezet folyamatos felügyeletét. Ha az indukció elnyújtott, egy újonnan aktivált protein cseréli le a lebomlott transzkripciós faktort. A jel hiányában a transzkripció leáll (McNally és mtsai 2000).

Számos poszttranszlációs módosulás jelentős szerepet tölt be a transzkripciós faktorok aktivitásának szabályozásában. Ide tartoznak a proteinfoszforiláció, a -acetiláció, a lizin-rezidumok és a metiláció az arginin és lizin oldalláncokban (Zhang és Reninberg 2001).

1.1.5.2 A transzkripciós faktorok és a sejtöregedés

Egy molekuláris program korlátozza a nem őssejtek proliferatív potenciálját, ami védi a szervezetet a daganatos megbetegedésektől. Ez a folyamat a sejtöregedés. Hardy és munkatársai microarray-technológiával azon transzkripciós faktorokat keresték, amelyek segítségével az öregedésért felelős gének csoportját szabályozó szignálhálózat megfejthető. A talált gének öregedésben betöltött szerepét, a szabályozott géneken a TFKH-k előfordulási gyakoriságát vizsgálták. Az öregedésben szerepet betöltő eddig ismert gének mellett új génekre is rámutattak. Egyik legfontosabb következtetésük arra, hogy ugyanazon gének különböző körülmények között aktiválódnak, valószínűleg különböző transzkripciós faktorok által. Valamennyi gén *in silico* promóteranalízise rámutatott, hogy az NF- κ B és a C/EBP transzkripciós faktorok aktiválódnak a sejtöregedés során, azaz kulcsszerepet töltenek be az öregedési szignálhálózatban (Hardy és mtsai 2005).

1.1.6 A transzkripciós faktorok és az onkogenitás

a., E2F transzkripciós faktor család

Az E2F1 egyrészt onkogén, másrészt tumorszuppresszor gén, sejttípustól és genomiális változások jelenlététől függően. Az E2F1 géntranszkripciót aktiváló funkciójának hatására a sejt a DNS-szintézis S-fázisába kerül, hiányában fokozott tumorgenezis alakul ki. Az E2F1 ugyanis nemcsak a tumorszuppresszióért felelős ciklin E-t aktiválja, hanem onkogénként a ráksejtekben alulregulált topoizomeráz II.β represszoraként is szolgál. E2F1-deficiens egerekben a daganatképződés fokozott, ami tumorszuppresszor funkcióját hangsúlyozza.

Hasonló ambivalenciát mutat a családba tartozó E2F3 transzkripciós faktor, mert onkogénként működik pajzsmirigyrákoknál a metasztázisképződést segíti, de tumorszuppresszorként hat hipofizeális tumoroknál (Jiao és mtsai 2005).

b., NF-κB

Az NF-κB transzkripciós faktor egy heterodimer fehérje, amely a gyulladáshoz kapcsolódó citokinek transzkripcióját segíti, az apoptózisasszociált proteinekét gátolja. Az NF-κB a legtöbb emlő-, prosztata-, hólyagkarcinómában és melanómákban folyamatosan aktív. Bizonyított, hogy a NF-κB hozzájárul az emlőrákok hormonfüggetlen növekedéséhez, progressziójához. Az NF-κB gátlása a terápia eredményességét növeli, miszerint jó célpont a daganatellenes terápiában. Az epoxikinomicin C antibiotikumból fejlesztették ki a nukleáris faktor-κB (NF-κB) inhibitorát, a dehidroximetilepoxikinomicint (DHMEQ). A DHMEQ a NF-κB nukleáris transzlokációját akadályozza a p65/p50 és a RelB/p52 útján. A DHMEQ egy olyan potenciális gyógyszer ösztrogénfüggő és ösztrogénfüggetlen emlőrákoknál, ami a NF-κB-aktivitás gátlásán keresztül fejt ki hatását, emellett kifejezett érzékelést gátló és apoptózist indukáló hatással is rendelkezik (Matsumoto és mtsai 2005).

1.1.7 A transzkripciós faktorok a multidrog-rezisztencia kialakulásában, a multidrog-rezisztencia komplexitása

Egy transzkripciós faktor - előbb bemutatott tulajdonságainál fogva - szerteágazó szabályozási mechanizmusok teljesítésére, számtalan gén párhuzamos aktivációjára és gátlására képes. Sok gén szabályozásának egyidejű vizsgálata, azaz teljes genomiális génexpressziós változások nyomonkövetése jelenleg nagy denzitású microchipekkel (például Affymetrix) lehetséges. A géncsoportok egyidejű expresszióváltozásainak egyik jellemző példája a daganatok kemoterapeutikumokkal szemben kialakuló rezisztenciájának megszerzése során tapasztalható expresszióváltozás.

A kemoterápia sikertelenségének legfőbb oka lehet az elsődleges, genetikailag meghatározott, a sejtek „veleszületett” ellenállóképessége, vagy a másodlagos, szerzett antineoplasztikus gyógyszerrezisztencia. Multidrog rezisztencia (MDR) a daganatsejtek azon képessége, hogy szimultán rezisztenciát sajátítsanak el a különböző gyógyszerekkel szemben, akadályozva ezzel a sikeres kemoterápiát. Az MDR okai összetettek és még nem kellően ismertek. A klinikumban jelenleg a kellő ismeretek hiányában a különböző gyógyszerkezeltési protokollok közül a terápia megkezdése előtt gyógyszerrezisztens státusz felmérése nélkül választanak (Győrffy és mtsai 2006).

A mechanizmusok bonyolultságára jellemző példa az adriamycinnel szemben kialakuló rezisztencia. Már bizonyított, hogy a rezisztencia az ABC-transzporterek által a gyógyszerek extracelluláris térbe való leadásával, a minőségi és mennyiségi topoizomeráz-2-expresszió változásával, valamint a glutation-S-transzferáz felülexpressziójával történik. A legújabb kutatások szerint az Bsd2 gén által kiváltott adriamycin rezisztencia részben az Smf2 fémtranszporter proteinek szabályozásával és részben más, ezidáig még további ismeretlen mechanizmusok útján jön létre (Takahashi és mtsai 2005).

1.1.7.1 A multidrog-rezisztencia és az apoptózissal kapcsolatban álló transzkripciósfaktorok

Az MDR és a sikertelen kemoterápia egyik típusa során az apoptózissal szemben alakul ki rezisztencia. Az NF- κ B transzkripciósfaktor emelkedett aktivitását találták bizonyos daganatoknál, aktivitásának gátlása növelte az apoptózist és a kemoterápia sikerességét. A BAY 11-7082 irreverzibilisen gátolja az NF- κ B foszforilációját, ezáltal segít legyőzni az MDR-t. Ha ugyanis a rezisztens sejtvonalakhoz hozzáadják a BAY 11-7082-t, fokozottabb apoptózis tapasztalható, mint a kemoszenzitív sejteknél a gyógyszerek hatására. Az NF- κ B gátló nem a DOX-ra, vagy VCR-re érzékenyíti a sejteket, hanem önmagában is az apoptózist indítja el (Garcia és mtsai 2005).

Más MDR mechanizmus során a daganatsejt elkerüli a gyógyszer által kiváltott apoptózis eliminációs útját. Ennek oka a DNS-t leépítő kaszkádrendszer regulátorainak károsodására vezethető vissza (Győrffy és mtsai 2005).

1.1.7.2 A topoizomeráz II-represszor gátlási mechanizmusai: doxorubicin, etopozid

A topoizomeráz II proteinek kritikus szabályozói a DNS topológiájának és a kromatinstruktúrának, amelyek a DNS-replikációt, a géntszkripciót, a kromatin szegregációját és a mitózist befolyásolják. A topoizomeráz II inhibitorokat, bár eltérő sikerrel, mégis széles körben alkalmaznak melanómás megbetegedésekben.

A kutatási eredmények szerint az E2F1 transzkripciósfaktor és topoizomeráz II. által vezetett reorganizáció megelőzi a gyógyszerindukált apoptózist, biztosítva a hatékony gyógyszeres beavatkozást. Gyógyszerkezelés (DOX vagy etopozid) hatására a sejtek nem képesek a topoizomeráz II promóterén az E2F1 represszort megkötni. Ez megemelt topoizomeráz II szinthez és a sejt fokozott apoptotikus érzékenységéhez vezet. Az apoptózis első szakaszában az emelkedett topoizomeráz II szint teszi lehetővé azokat a DNS-topológiai változásokat, amelyek elősegítik a heterokromatin szerkezet kialakulását, ezáltal a gének elnémítását. A fenti mechanizmusok jól magyarázzák az (anti)topoizomeráz II kemoterapeutikumok és a sejtciklus-antagonisták szinergista hatását (Jiao és mtsai 2005).

1.2 *Antiszenz transzkripció*

1.2.1 **Az antiszenz párok és az antiszenz transzkripció módjai**

Több mint egy nagyságrenddel több genomikus szekvencia íródik át RNS-sé, mint amennyi a humán exonok száma alapján várható lenne (Kampa és mtsai 2004). Fehérjét kódoló mRNS-ek az RNS-transzkripció során egyrészt a DNS-lokuszek mindkét száláról (Labrador és mtsai 2002), másrészt introntartalmú génekről (Levinson és mtsai 1992; Conrad és mtsai 2002), harmadrészt különböző funkciójú gének hosszabbított, vagy rövidített exonjaiból is képződhetnek. Természetes cisz-antiszenz transzkriptumok általában a szenz egység ugyanazon genomikus lokusz ellenoldali DNS-száláról, elkülönült transzkripciós aktivációt követően keletkeznek. Az érett szenz RNS-sel, vagy csak az elsődleges nyers másolattal (csak intront tartalmazó, vagy az 5-UTR, vagy 3-UTR régióba is belenyúló szekvenciák) komplementer antiszenz transzkriptumok lehetnek kódoló, vagy nem kódoló RNS-szekvenciák.

Egyre több jel utal arra, hogy az emberi és más eukarióta genomban széles körű az antiszenz transzkripció (Shendure és Church 2002). Yelin és mtsai microarray-k alkalmazásával 246 szenz-antiszenz transzkripciós pár közül 112-ben, azaz 42,5%-ban antiszenz transzkripciót mutattak ki (Yelin és mtsai 2003). Legújabb eredmények szerint 1340 lehetséges szenz-antiszenz (SA) párt találtak az *Arabidopsis thaliana* genomban (Wang és mtsai 2005). 60 000 cDNS klón közül több mint 2000 lehetséges szenz-antiszenz transzkripciós párt találtak egér genomban. Számszerűleg a transzkriptumoknak 2-8%-a képes szenz-antiszenz párt alkotni (Lehner és mtsai 2002; Shendure és Church 2002; Yelin és mtsai 2003). Az irodalmi adatokat extrapolálva az emberi 40 000 transzkriptumra 800 és 3200 közötti természetes antiszenz egységet kapunk. A közelmúltban megjelent irodalmi adatok nagyságrendekkel több SA párról számolnak be, mint ahogyan azt korábban becsülték. E tények emlősökben egy potenciális szereppel bíró mechanizmus jelenlétét feltételezik (Kiyosawa és mtsai 2003).

Fontos, hogy különbséget tegyünk az antiszenz transzkripció és a szenz-antiszenz párok között. Míg az SA párokat például az RNS-interferenciában rendszeresen használnak, addig a teljes genom valamennyi génjére kiterjedő antiszenz expresszió alig ismert.

1.2.2 Antiszenz gyakoriság, általános antiszenz expresszió

Az antiszenz transzkripciót eredetileg a prokariótáknál írták le, ahol az antiszenz transzkripció szintje magasabb lehet, mint maga a szenz transzkripció szintje. *Bacillus subtilis* antiszenz microarray 70% körüli transzkripciót mutatott ki az eddig ismert kódoló régiókban (Lee és mtsai 2001). A *Bacillus subtilis* genom a többi bakteriofág genomhoz hasonlóan tartalmaz géneket a DNS mindkét szálán.

Az endogén antiszenz RNS-ek két csoportja ismert eukariótákban. Az első csoportba a cisz-kódolt antiszenz transzkriptumok tartoznak, amelyek a DNS azon ellenoldali száláról íródnak át, amelyről maga a szenz RNS is keletkezik, és pontos átfedésben állnak a szenz transzkriptumokkal. A második csoportba a transz-kódolt antiszenz transzkriptumokat soroljuk, amelyek eltérő genomikai helyszekvenciákról íródnak át, mint a szenz RNS-ek. Chen és mtsai becslései szerint a humán gének 22%-ának van szenz-antiszenz párja (Chen és mtsai 2004). Orientáció-specifikus RT-PCR reakciót alkalmazva 90% feletti (25-ből 23) volt az emberi agyszövetben detektálható mindkét (szenz és antiszenz) transzkripció (Lee és mtsai 2001). Kampa és mtsai 20%-os antiszenz transzkripciót mutattak ki a 21. és 22. kromoszómán (Kampa és mtsai 2004). Korábban Yelin és mtsai a 8,4%-ra extrapolálták a szenz-antiszenz párok mennyiségét (Yelin és mtsai 2003). Nyilvános expresszált szekvenciadarabok elemzése alapján Shendure és Church 217 szenz-antiszenz transzkripcionális párt talált az exonokat vizsgálva (Shendure és Church 2002). Az egér és emberi genom bevésődött génei között a szenz-antiszenz gének aránya 24-47% (Zhang és mtsai 2006). Bár valamennyi adat azt sugallja, hogy a természetes antiszenz transzkriptumok sokkal gyakoribbak a humán genomban, mint ahogyan azt korábban becsülték, figyelembe kell venni, hogy valamennyi fenti vizsgálatban általában kis számú célzott gént elemeztek.

1.2.3 Az antiszenz szabályozási funkciók

Az antiszenz transzkripció pontos funkciója jelenleg még ismeretlen. Különböző organizmusokon végzett vizsgálatok alapján az antiszenz transzkriptumok szabályozási hálózatokban, mint a transzkripció lezárása a szenz-antiszenz RNS-ek reciprok expressziója következtében (Farrel és mtsai 1995), alternatív hasítás (Enrely és mtsai 2005; Sureau és mtsai 1997), DNS-metiláció (Tufarrel és mtsai 2003) játszanak szerepet. A szenz-antiszenz pároknak az emlős génszabályozásban is több jelentős funkcióját bizonyították. Ide tartoznak a genomikai imprinting (Moore és mtsai 1997; Yamasaki és mtsai 2003; Thakur és mtsai 2004), az RNS-interferencia (Billy és mtsai 2001), a translációs szabályozás (Li és Murphy 2000), az alternatív hasítás (Munroe és Lazar 1991), és az RNS-módosítás (Kumar és Carmichael 1997; Peters és mtsai 2003). In vivo nem kódoló jelzett antiszenz transzkriptumok korai terminációja következtében a szenz pár jelzésében zavar keletkezhet (Sleutels és mtsai 2002).

Az antiszenz géneknek jelentősen rövidebb intronjaik vannak, mint a szenz géneknek (Chen és mtsai 2005). Az antiszenz RNS-ek féléletideje rövidebb, mint a szenz eredetű RNS-eké, vagy proteineké (Hildebrandt és Nellen 1992). Ezek az adatok alátámasztják az antiszenz transzkriptumok szabályozó feladatát szenz partnereik irányában. Ha ugyanis az antiszenz gének feladata, hogy szenz partnereiket szabályozzák, akkor feltehető, hogy relatíve rövid intronjaik segítségével gyors válaszadási képességgel bírnak, éppen akkor, ha kevés transzkriptum áll rendelkezésre nem magasan expresszált szenz társaikhoz viszonyítva.

A szenz és antiszenz transzkriptumok koexpressziója ugyanabban a sejtben komplementaritásuk miatt lehetővé teszi hosszú, duplaszálú RNS-ek kialakulását, (Carmichael 2003), vagy az RNS maszkolását (Lavorgna és mtsai 2004), ami az antiszenz génreguláció, a „fordított szabályozás” gondolatát tovább erősíti.

Összehasonlítva azokat a géneket, amelyeknél a szenz transzkriptum száma tízszerese az antiszenz transzkriptuménak a gyorsan lebomló kis mennyiségű duplexeknek kevés jelentősége van. De lecsökkentve ezt az arányt kétszeres, vagy háromszoros szorzóra, az arányosan vele járó antiszenz transzkripció nagyobb, és vele párhuzamosan azonos mértékben az mRNS dramatikus instabilitása és lebomlása tapasztalható (Lipman 1997). Rövid

féléletidejű mRNS-eknél a szenz-antiszenz transzkripció arány mindig közelebb van egymáshoz, mint a hosszabb féléletidejű társaiknál. Az antiszenz transzkriptumok szabályozó szerepe bizonyított Wilms-tumor szuppresszióban (Malik és mtsai 1995) és a myc onkogén szabályozásában (Chang és mtsai 1995).

A legtöbb szenz-antiszenz clusterpár (72,5 %) átfedő régiót tartalmaz, amely a külső 5' 3' exonvégeken túlnyúlik, legtöbbször az UTR régióba. Ez további bizonyítékul szolgál az antiszenz transzkripció génexpresszió szabályozásában betöltött szerepére (Yelin és mtsai 2003; Kiyosava és mtsai 2003; Lehner és mtsai 2002).

Figyelembe véve az antiszenz RNS-ek szenz expressziót szabályozó mechanizmusait, fordított karakterisztikájuk tükrében egyértelmű, hogy a szenz és antiszenz szekvenciák jelenléte potencióális szabályozói a poszttranszkripcionális szabályozásnak (Bass 2000). Mindez alátámasztja azt a hipotézist, hogy az antiszenz transzkripció közreműködik az emlős transzkripcionális kontrollban (Katayama és mtsai 2005). Mások azonban az RNS poszttranszkripcionális képzése során jelentéktelenebb alakító hatást tulajdonítanak a humán és egér antiszenz régióknak. Véleményük szerint normális körülmények között a nukleuszban a transzkripciót követően nem képződnek az RNS módosulásáért felelős szenz-antiszenz párok, csak abban az esetben, ha azok degradációra, vagy a nukleuszban való visszatartásra vannak ítélve (Neeman és mtsai 2005).

1.2.3.1 A kis interferáló RNS-ek, mikro RNS-ek és az RNS interferencia

A mikro RNS-ek (miRNS), kis interferáló RNS-ek (siRNS) és szabályozó funkcióik vizsgálatára fókuszáltak a legújabb nagyeredményű kutatások (2007. évi orvosi Nobel díjat a mikro RNS-ek felfedezéséért osztották ki). A poszttranszkripcionális szabályozás egyik mechanizmusában a szenz transzkriptumok degradációja történik a miRNS-ek és siRNS-ek által. Az RNS interferenciának nevezett folyamat a poszttranszkripciós génelcsendesítés olyan formája, melynek során a DNS-ről képződő rövid specifikus RNS molekulák elnyomják a gének kifejeződésében kulcsszerepet játszó mRNS-ek működését (Sharp 1999). Az RNS interferencia élettani funkciói közé tartozik a vírusok és transzpozonok elleni védekezés

(Waterhouse és mtsai 1998), valamint a génkifejeződés szabályozása (Engels és Hutvanger 2006).

A mechanizmus kialakulásában hosszú dsRNS-ek (>200 bp) vesznek részt, amelyek a sejten belüli folyamatokhoz kapcsolódva fajoként eltérő hosszúságú, általában 20-25 nukleotid hosszúságú RNS-ekre bomlanak (siRNS). Az siRNS-ek képződéséért egy ATP-független enzim, a Dicer felelős, amely RNáz aktivitással rendelkezik (Bernstein és mtsai 2001). Miután a Dicer specifikusan hasítja a dsRNS-eket, a keletkező dupla szálú siRNS-ek beépülnek az siRNS által indukált elcsendesítő komplexbe (RISC) (Hammond és mtsai 2000). A komplexben található enzimek egyszálúvá alakítják az siRNS-t. Ezután ez az egyszálú siRNS a vele komplementer részeket tartalmazó mRNS-ekhez irányítja a komplexet, amiket a RISC enzimek feldarabolnak. A génről így nem a normál hosszúságú és adott funkciójú felelős fehérje képződik; az adott gén tehát nem tud kifejeződni.

Az siRNS-ekre nagyon hasonlítanak a mikro RNS-ek, mert mindkét transzkriptum a transzkripcionális szabályozásért felelős a RISC-en keresztül. A kettő különbsége a biogenezisben rejlik: az miRNS-ek a transzkripcionális RNS-hurok duplaszálú részeiből többlépcsős érési folyamaton keresztül jönnek létre, az siRNS-ek pedig a dsRNS-ekből Dicer hasítása révén képződnek. Az miRNS-indukált RNS-elcsendesítés során az miRNS az mRNS 3' értelmezhetetlen régióhoz kapcsolódik, ezért alacsony specifitással, de széles hatásspektrummal rendelkezik. Ezzel szemben az siRNS az mRNS csak nagyon specifikus részeivel képez duplexet, beindítva ezáltal az RNS lebomlását.

Mivel a cisz antiszenz transzkripció során a gének komplementer ellenoldali szekvenciáiról íródik át az RNS, a képződő szálak a megfelelő szenz szállal kapcsolódni tudnak. A kapcsolódás eredményeképpen létrejövő hosszú dupla szálú RNS-ek az RNS interferencia kiinduló molekulái is lehetnek (Billy és mtsai).

Reprezentatív példa duplaszálú RNS általi RNS-expressziós szabályozásra a Hoxa 11 transzkriptum: ha ugyanis a szenz transzkriptum van nagy és ehhez képest az antiszenz kis szinten, az RNS kevésbé bomlékony és fordítva. Ha sok antiszenz transzkriptum van jelen a legtöbb szenz duplexet képezve könnyen bomlik (Hsieh-Li és mtsai 1995).

1.3 Szabályozási mechanizmusok kutatásának alapjai, technológiai feltételei és eredményei

1.3.1 Affymetrix chipek a transzkripció és az antiszensz expresszió tanulmányozásában

Egy Affymetrix expressziós chip elegendő mennyiségű próbát tartalmaz több ezer transzkriptum expressziójának egyidejű vizsgálatához, mivel a lineáris detekció dinamikus tartománya egészen az 500-szoros expressziós különbségig terjed. Az expressziós array-k minden transzkriptumot 16 különböző 25-ös oligo-próbával fednek le. A tökéletesen kapcsolódó próbák mellett úgynevezett partnerpróbák helyezkednek el. Ezek a partnerpróbák az eredeti próbákhoz képest centrális pozícióban 1 nukleotidtranszverziót tartalmaznak. A rövid egyszálú oligonukleotid array-k ilyen irányú felépítettsége teszi lehetővé, hogy kereszthibridizáció nélkül rövid DNS-szekvenciákkal az expressziót vizsgálni lehessen.

Az Affymetrix egér expressziós chip MGU74v2 körülbelül 36 000 transzkriptumot tartalmaz. Rövid ideig forgalomban levő elődjén, a MGU74v1 chipen a próbák egy része a gének reverz komplementer szekvenciáját tartalmazta. Az UniGene adatbázisból letölthetőek azok a szekvenciák, amelyekből a szekvenciaclustert készítették, és az MGU74v2 és v1 közötti szensz-antiszensz párok is azonosíthatóak.

1.3.2 A génexpressziós mintázat a multidrog rezisztencia vizsgálatában

Chang és munkatársai bemutatták, hogy az emlődaganat génexpressziós mintázata meghatározza a docetaxelre adott választ. A rezisztens sejtek fokozott transzkripcionális és szignáltranszdukcióért felelős géneket expresszáltak. Microarray vizsgálataik segítségével bebizonyították, hogy nem bizonyos gének, hanem sok gén expresszióváltozásának rajzolata adhat kielégítő választ a gyógykezelés sikerességét illetően (Chang és mtsai 2003). Több hasonló tanulmány igazolta, hogy a sejtvonalak (Scherf és mtsai 2000; Szakacs és mtsai 2004) és elsődleges neoplazmák (Hofmann és mtsai 2002; Holleman és mtsai 2004) komplex génexpressziós mintázatával előre lehet jelezni a sejtek kemoterápiára adott válaszát.

Kang és mtsai 5-fluorouracilra, ciszplatinra, doxorubicinra (5FU, CIS, DOX) rezisztens és szenzitív gyomorráksejtek expressziós mintázatát hasonlították össze. Arra következtettek, hogy a legkonstansabb molekuláris változásokon mennek át a sejtek a topoizomeráz II célpontú DOX-kezelés esetén a rezisztencia megszerzésében. A legtöbb felülexpresszált gén a sejtproliferációban, metabolikus utakban, DNS regulációjában, sejtnövekedésben, és sejtorganizációban vesz részt, kisebb csoport pedig a jelátvitelben és a külső inger-válaszban, valamint a sejt kapcsolódásban játszik szerepet, egyes gének pedig a stressz-válaszért, sejt-sejt kapcsolódásért, és transzportfunkciókért felelős (Kang és mtsai 2004). Hasonló eredmények születtek a szintén topoizomeráz II célpontú etopozid-rezisztencia vizsgálatoknál melanoma sejtvonalakban (Witting és mtsai 2002). A közös célpont miatt összefüggő a rezisztencia a különböző sejtípusoknál (Kang és mtsai 2004).

A sejtciklus komponenseiben bekövetkező mutációk is fontos jellemzői a ráksejteknek, ide tartozik a ciklinek túlexpressziója, a CDK aktivációja, a CDK-inhibitorok inaktivációja vagy a retinoblasztóma tumorsuppresszor protein expressziójának hiánya (Jiao és mtsai 2005).

A fentiek tükrében a DNS array technológia segítségével a rákos sejtek RNS-expressziós profilja meghatározható; az adatok ismeretében a leghatékonyabb kemoterápia kiválasztása elvileg lehetséges.

1.3.3 Génexpressziós adatbázisok

Az expressziós elemzések által szolgáltatott szekvencia-, és adatállományt számtalan adatbázis rendszerezi. Az adatbázisok jelentősen különböznek az adatok feldolgozási módjában, a rendezési paraméterek megválasztásában. A tématerülethez kapcsolódó legfontosabb adatbázisokat emeltem ki röviden az alábbiakban.

A **TRED** olyan adatbázis, amely tartalmazza a teljes humán, patkány, egér genomra vonatkozó promóterszekvenciákat és transzkripciós faktorokat, ezek tanulmányozására külön-külön és párhuzamosan is alkalmas. A TRED-ben lehetséges a géntranszkripciót szabályozó mechanizmusok keresése, beleértve a transzkripciós faktorokat, TFKH-eket, a transzkripciós start-helyeket, és a mag-promóterekeket is (Zhao és mtsai 2005).

A **MAPPER** adatbázis több genomot átfogó potenciális transzkripciós faktor-kötőhely térkép, amely kísérletes transzkripciós faktor-kötőhely meghatározáson alapul. TRANSFAC és JASPAR adatbázist alapul véve 1134 transzkripciós faktor-kötőhely 3-organizmusú (emberi, Drosophila és egér) katalógusát készítették el (Marinescu és mtsai, 2005).

A **JASPAR** a többsejtű eukarióták olyan nyitott hozzáférhetőségű adatbázisa, amely annotált, mátrix alapú, biológiai ismeretek alapján kiválasztott TF-okat és TFKH-profilokat tartalmaz. Az adatbázis tartalmazza a célszekvenciák aktuális gyűjteményét is (Sandelin és mtsai 2004).

A National Center for Biotechnology (NCBI) weboldalán keresztül elérhető adatbázisok közé tartoznak az **Entrez, LocusLink, Unigene és a RefSeq**. Az Entrez DNS- és fehérjeszekvenciákat tartalmaz számtalan forrásból, mint az NCBI taxonómiából, genomtérképekből, populációs állományokból, génexpressziós adatokból, összesen 12 millió referenciától. Az adatok mellett 12 online könyvet és több mint 3000 folyóirat elérhetőségét is tartalmazza. A RefSeq adatbázis a legfrissebb mRNS, genomikai, számítógép-modellezett referenciaszekvenciákat tartalmazó adatbázis humán és további 1700 más organizmus számára (Wheeler és mtsai 2002). A TRANSFAC, LocusLink, Unigene adatbázisokkal a módszerek fejezetben részletesen foglalkozom, ezért itt csak megemlítem a teljesség kedvéért.

1.3.4 Transzkripciós faktor-kötőhely-kereső programok

A különböző adatbázisokban található adatállomány megfelelő szűrésére, kigyűjtésére számtalan program áll rendelkezésre. A kereső programok különböző pontossággal működnek, igen gyakoriak a biológiai vizsgálatokkal igazolt pontatlanságok. A TFKH-eket meghatározó programok pontatlanságának több oka közül elsődleges, hogy a biológiai szabályozási mechanizmusok ismerete egyelőre alacsony szintű, valamint, hogy a legtöbb program a vizsgált adatállományonként maximálisan csak 1 motívumot határozhat meg, holott már jól ismert, hogy egy transzkripciós faktor több motívum-helyhez is kapcsolódhat (Tompá és mtsai 2005). Tovább nehezíti a problémát, hogy az adatbázisok maguk is „pontatlanok”. Például a TRANSFAC adatbázisban található pozíció-súlyozott mátrixszal meghatározott

TFKH-k közül sok álpozitív, nem funkcionálisan működő TFKH van. Összehasonlító genomika, vagy filogenetikai ujjlenyomat-analízis alapján a nem működő TFKH-k egy része kiszűrhető. A szűrés alapja, hogy a nemkódoló, ám génexpresszióban fontos szerepet betöltő szekvenciák igen konzervatívak (Karanam és mtsai 2004). A jó programok figyelembe veszik, hogy a többszörös transzkripció faktorok gyakran közel (átfedésben) kötődnek egymáshoz. Az eredményesség tovább növelhető, ha nem egy, hanem több adatbázis használatával határozzuk meg kérdésselvetésünknek megfelelő TF-okat. Ez fordítva is igaz, több program együttes használata javasolt a kutatóknak a megfelelő transzkripció faktor-kötőhely pontos meghatározásához (Tompá és mtsai 2005).

Az szabályozó szekvenciák vizsgálatára leggyakrabban használt Confac és TOUCAN programok jellemvonásait és az elemző szoftverek sajátosságait alábbiakban foglaltam össze:

Konzervatív transzkripció faktor-kötőhely meghatározását végző szoftver a **CONFAC**, amely egyidejűleg több száz gén szabályozó régióinak vizsgálatát végzi. A szoftver nemkódoló humán és egér szabályozó szekvenciákat hasonlít össze. A program célja, hogy olyan TFKH-et találjon, amelyek szignifikánsan gyakoribbak a microarray-analízisnek alávetett géncsoportok promóterrégióin, mint a nem változó, kontrollgéneknél. A transzkripció faktorok 6-12 bp hosszú kötődési motívumokhoz kapcsolódnak, amelyek önmagukban és degenerált formájukban is igen gyakoriak a genomban. A CONFAC szoftver jelenleg a pozíciósúlyozott mátrix (TRANSFAC 4.0-s mátrix) beállításai szerint limitált, és bár az ortológ szekvenciák összehasonlítása alapján szűri ki a nemkódoló faktorokat, egyelőre csak humán microarray-adatállományok analizálására alkalmas (Karanam és Moreno 2004).

A **TOUCAN**-ot koregulált vagy koexpresszált gének cisz-szabályozó elemeinek vizsgálatára fejlesztették ki. Segítségével gének és intergenetikai régiók kinyerhetők, lehetséges szabályozó régiók, TFKH-k szekvenciái, ismeretlen kötőhelyek motívumai kereshetőek, és meghatározhatóak azok a génpromóterek, ahol a kötőhelyek felülreprezentáltak fordulnak elő (Aerts és mtsai 2003). A program a géneket és intergenetikai régiókat az Ensembl vagy EMBL adatbázisból nyeri ki valamennyi ortológ és kísérő információval együtt. Az ortológ szekvenciákat összehasonlítja és a szabályozó régiókat kiemeli. Ismert transzkripció faktor lehetséges kötőhelyeit a MotifScanner segítségével határozza meg, amely pozíciósúlyozott matrix modellt alkalmaz. Az új motívumokat a

MotifSampler alprogrammal határozza meg, aminek elve a Gibbs mintavételezésen alapul. A TOUCAN a géncsoportokra jellemző kötési karakterisztikát a felülreprezentált szekvenciahalmazt binominális teszt alkalmazásával határozza meg. A TOUCAN segítségével az ismert kötési szekvenciák a gének közötti szakaszokon könnyen megtalálhatóak, ismert, vagy lehetséges TFKH-ek és motívumok kimutathatók (www.esat.kuleuven.ac.be/~dna/Biol/Sowftware.html) (Aerts és mtsai 2003).

1.4 Az automata pipettázó berendezés és a technika állása releváns szabadalmak tükrében

A technika állásából számos különböző automata pipettázó berendezés, mérőrendszer ismert, amelyeket többnyire valamilyen specifikus feladat ellátására alakítottak ki. Az US 6,656,724 számú szabadalmi leírásból megismerhető berendezés például kémiai és biológiai eljárások automatikus kivitelezésére alkalmas, főleg nukleinsavszekvenciák amplifikációjára és szekvenálására használható. Az US 5,139,744 számú szabadalmi leírásban bemutatott automatikus laboratóriumi munkaállomásban a felcserélhető nem-digitális modulazonosítókat elektronikus áramkörökkel látták el. Az ismert megoldások nagy részénél mind a mérőhelyek, mind a pipettahegy, illetve a mérőfej koordinátái ismertek. Előfordulhatnak azonban olyan alkalmazások, amelyeknél akár a mérőhelyek, akár a pipettahegyek pontos koordinátái ismeretlenek.

Mivel a modern laboratóriumi reakciókban a vizsgált reagensek mennyisége μl -es nagyságrendbe esik, ezért μm -es pontossággal kell ismerni a pipettahegy helyzetét, és a mérőhelyeket ahhoz, hogy egymás után ugyanabba a pontba lehessen pipettázni a mintákat és a reagenseket. Az iparban rendszerint rögzített mérőhelyeket alakítanak ki, és újrafelhasználható fém pipettahegyekkel dolgoznak, amelyeknek elég egyszer - például a berendezés gyártása során - meghatározni a pontos koordinátáit a pipettahegyet mozgató mechanizmus (például robotkar) egy adott helyzetében. Mivel a mintatartók és a mérőhelyek helyzete szintén nem változik az ilyen berendezésekben, elegendő a robotkar mozgatását megfelelő pontossággal irányítani számítógéppel vezérelt finommenetes csigahajtású léptetőmotorok révén. Az újrafelhasználható pipettahegyek és a rögzített mérőhelyek

hátránya, hogy az egyes vizsgálatok befejeztével meg kell tisztítani a pipettahegyeket, illetve a mérőhelyeket. Ehhez nagyon komoly fertőtlenítő és mosó eszközzel kell ellátni a pipettázó berendezést, amely lényegesen megnöveli a gyártási költségeket és a berendezés méretét is. Megjegyzendő, hogy a fertőtlenítés, illetve a mosás nem csak költséges, de ráadásul időigényes művelet is.

Az eldobható pipettahegy és egy teljes felületében kihasználható folytonos mérőpad alkalmazása kiküszöböli az említett hátrányokat, azonban új problémákat is felvet. Mivel a használat során újabb és újabb pipettahegyek kerülnek a robotkarba, ezeket a befogás után minden esetben pozicionálni kell, hogy kellő pontossággal lehessen a mintatartókhöz, illetve a mintapadra pipettázott reagenscseppecskékhez visszatalálni. Tovább bonyolítja a helyzetet, hogy a különböző gyártóktól származó pipettahegyek más-más kialakításúak, de még azonos termék esetén sem valószínű, hogy sikerül két egymást követő alkalommal μm pontossággal azonos helyzetbe befogni a pipettahegyeket a robotkarba.

Az eldobható pipettahegyekkel kapcsolatos másik nehézség, hogy a mintacseppeket nem lehet az újrafelhasználható pipettahegyeknél megszokott eljárással a mintapadra pipettázni. Újrafelhasználható pipettahegyeknél a pipettázás úgy történik, hogy a pipettahegyet ahhoz a felülethez közelítik, ahová szeretnék pipettázni a kapilláris elven felszívott reagenst vagy oldatot, és amikor a pipettahegy vagy az annak végén lévő folyadék csepp eléri a felületet, akkor a csepp leválik a pipettahegyről, és ott marad a mérőfelületen, miközben a pipettahegyet eltávolítják. Egy ilyen csepplhelyező művelet végrehajtásához tized μm pontossággal kell ismerni a pipettahegy és a mérőfelület relatív helyzetét. Ez azt jelenti, hogy ismeretlen, különösen egyenetlen felületű mérőlap, vagy eldobható pipettahegyek használata esetén ez a módszer nem alkalmazható. Az US 5,443,791 szabadalomban az automata készülék a pipettázás során kondenzátoros érzékelők segítségével állapítja meg, hogy a pipettahegy mikor érintkezik a mérőfelülettel, és ekkor a mérőfelület melyik pontjánál van a pipettahegy. Ez azonban speciális mérőfelület kialakítást tesz szükségessé, ami megdrágítja a berendezés előállítását.

Automatizált gyártási folyamatoknál gyakori, hogy az egyes alkatrészeket úgy kell finoman egymás mellé illeszteni, hogy közben az alkatrészeket nem szabad egymásnak nyomni. Az ilyen pozicionáló műveletek során rendszerint több irányból elrendezett két vagy

több videokamerát használnak. A kamerák által készített digitális képeket számítógép segítségével dolgozzák fel, és az alkatrészek így meghatározott egymáshoz viszonyított helyzetéből állapítják meg, hogy még mekkora és milyen irányú mozgítás szükséges az alkatrészek helyes összeillesztéséhez. A több kamera használata nemcsak drágább, hanem pontatlanabb is, mivel nem kiküszöbölhetők az egyes kamerákhoz tartozó optikai és áramköri elemekből fakadó képhibák, amelyeket a későbbi képfeldolgozás során nem lehet tökéletesen összehangolni. Az US 4,668,095 számú szabadalmi leírásban két tárgy fedésbe hozása, illetve pozicionálása a cél. A hagyományos megoldásból ismert két optikai eszköz és az optikai út. A két kamera alkalmazásából származó hibákat úgy küszöbölik ki, hogy két egyenlőszárú, ferde felületei mentén összeillesztett prizmat használnak a két tárgy képének azonos optikai úton, ugyanazon irányba történő kialakításához. A prizma felületének tökéletlensége miatt azonban az összeillesztésnél mindig lesznek pontatlanságok, ami kismértékben eltérő optikai utakat eredményezhet, így továbbra sem biztosított a képhibák megfelelő mértékű kiküszöbölése.

2 Célkitűzések

2.1 *Microarray adatok alapján konszenzus génlista létrehozása*

Egyes microarray kísérletek során ugyanazt a problémát különböző platformok és modellek összehasonlításával próbálhatjuk megközelíteni. Logikus a felvetés, hogy az adott problémával összefüggésbe hozható gének valamennyi kísérletben szignifikánsként fognak jelentkezni. Ezért elsődleges célom egy kiválasztott problémával (doxorubicin-rezisztencia daganat kemoterápia során) kapcsolatba hozott génexpressziós mintázatok alapján egy olyan konszenzus génlista felállítása volt, ahol az egyes gének oki szerepét további, a teljes genomot felölelő kísérletek során igazolták.

2.2 *Transzkripciós faktorok identifikálása*

A gének regulációja transzkripcionális szinten dől el, hiszen semmilyen további szabályozás nem működhet, ha nem képződött elsődleges transzkriptum. A primer transzkripció indításáért a transzkripciós faktorok felelősek, amelyek a transzkripciós faktor-kötőhelyekhez kapcsolódva fejtik ki hatásukat. Feltételezhetjük, hogy az együttregulált konszenzus génlista elemei hasonló transzkripciós faktorok kötőhelyeit tartalmazzák. Célul tűztem ki, hogy a korábban létrehozott (a doxorubicin-rezisztenciával összefüggésbe hozott) konszenzus génlista közös szabályozó elemeit azonosítsam, és ezek segítségével a rezisztencia rendszerbiológiai modelljét felállítsam.

2.3 *Antiszenz transzkripció génexpressziós mintázatokban*

A *transz* és *cisz* regulációs elemek együtt szabályozzák az egyes gének aktivitását. Tanulmányomban a reverz komplementer szekvenciák expressziójának microarray alapú tanulmányozását tűztem ki a célból, hogy a szenz és antiszenz transzkripciót vizsgáljam minél

átfogóbb genomiális szinten. Céлом volt, hogy leírjam az antiszenz transzkripció gyakoriságát és a kapott adatok alapján lehetséges szabályozó jellegzetességét. További gondolata volt vizsgálódásomnak a regulációs elemek esetleges specifikus eloszlási rajzolatának kutatása, aminek érdekében a szenz és antiszenz transzkripció kromoszóma-specifikus expressziós rajzolatát és arányát vizsgáltam.

2.4 *Technológiai fejlesztés*

Az alkalmazott microarray technológiák áruk és komplexitásuk miatt ma rutinszerűen nem alkalmazhatóak. Céлом olyan automata mérőrendszer, automata pipettázó berendezés biztosítása volt, amellyel olcsón és egyszerűen lehet tetszőleges felületre pipettázni, illetve egy ilyen felületen elektrokémiai és molekuláris méréseket végrehajtani. Az eldobható pipettahegyek pozicionálásának célszerű módja a pipettahegyeket egy ismert koordinátájú pontba szállítani, ahonnan kiindulva az eldobható pipettahegy éppúgy mozgatható számítógép-vezérelt robotkarral, mint az újrafelhasználható pipettahegyek. Céлом volt, hogy olyan pozicionáló egységet hozzak létre, amelynek segítségével nagy pontossággal lehet tárgyak relatív és abszolút helyzetét meghatározni. Fejlesztési feladatomban a pipettahegyek helyzetének megállapítása kiemelt fontosságú volt.

3 Módszerek

3.1 *Forrás adatok összeállítása a transzkripció faktorok keresésére*

A PubMed adatbázisban (<http://www.pubmed.com>) olyan közleményeket kerestem, amelyekben a vizsgálódás középpontjában a doxorubicin-rezisztencia áll. Kereséshez a „doxorubicin”, „rák”, „génexpresszió”, és „microarray” megfelelő angol szavait használtam fel. A keresés eredményéből (56 cikket jelentett 2006 márciusában) kizártam azokat a publikációkat, amelyek specifikus sejtvonalakra korlátozódtak (24 darab), mivel ezekben a rezisztenciamodellekben leszűkítve, csak adott sejtvonal-specifikus rezisztenciamechanizmust mutatnak be. A heterogenitás csökkentése érdekében azokat a közleményeket is kirekesztettem, amelyek klinikai mintákon több kezelésre adott választ vizsgáltak (15 darab) illetve, amelyek nem szorosan kapcsolódtak a vizsgálat anyagához (például review cikkek). Mindezzel együtt 3 különböző doxorubicin-rezisztenciával kapcsolatos elemzést, valamint az ezekhez tartozó génlistákat és microarray-platformokat vettem figyelembe. Az alábbiakban röviden összefoglalom e három közleményt.

Az első közleményben gyomor- (EPG85-257), hasnyálmirigy- (EPP85-181), colon- (HT29) és emlődaganat-eredetű (MDA-MB-231) különböző humán daganat-sejtvonalakat vizsgáltak (Gyórfy és mtsai 2005). Az eredeti érzékeny sejteket a topoizomeráz-inhibitor daunorubicinnal, doxorubicinnal vagy mitoxantronnal addig kezelték, míg rezisztens sejtvonalakat nem kaptak. A szenzitív és rezisztens sejtvonalakat a Stanford Egyetem cDNS array-jel vizsgálták, és körülbelül 30000 gén (43 000 cDNS klón) expresszióváltozását követték nyomon. 79 gén korrelált doxorubicin-, és 70 gén mitoxantron-rezisztenciával. A 149 gén közül 89 felül-, 60 alulregulált volt, ami alátámasztja azt, hogy az MDR igen komplex mechanizmusokon alapul. Nagy arányban találtak az ismert funkciójú proteinek mellett ismeretlen vagy funkció nélküli szekvenciákat. 49%-ban DOX- és 44%-ban az mitoxantron-rezisztenciáért felelős szekvencia EST volt, ami új gének szerepét sejteti az MDR-ben. Sejtvonal alapú modellüket 44 korábban meghatározott emlőrákmintával vetették össze. Azok a betegek, akiknek a génexpressziós profilja azonos volt a doxorubicin-érzékeny

sejtvonalával, tovább éltek (átlag 49,7 hónap), mint azok, akiknek az expressziós rajzolata a rezisztens sejtvonaléhoz hasonlított (32,9 hónap). Más szóval, a sejtvonalakon végzett vizsgálatok alapján a génexpressziós profillal előre jelezhető a klinikai terápia effektivitása és a túlélés doxorubicin-monoterápia esetén.

A második közleményben Kang és munkatársai Affymetrix HG-U133A microarray-jel globális génexpressziós analízist hajtottak végre és a gyógykezelés során leggyakrabban használt 5-fluorouracillal, doxorubicinnal és ciszplatinnal szembeni rezisztencia megszerzésében szereppel bíró géneket határozták meg. 10 kemorezisztens humán gyomorrák (4 5FU-rezisztens, 3 DOX-, 3 CIS-rezisztens) sejtvonal génexpressziós rajzolatát hasonlították össze 4 szülői sejtvonallal. 38 gént találtak az első, 200 felettit a második és 27 gént a harmadik esetben. A megváltozott expressziót mutató 250 génből 9 génnek legalább kettő, egy esetben mindhárom gyógyszerrezisztenciánál egyidejűleg fokozott expresszióját tapasztalták. Az általuk publikált 250 gént más predikciós profillal és génlistával is összehasonlították, de nem találtak átfedést. Ennek oka egyrészt az, hogy a különböző gén szignálsorozatok hasonló predikciós eredményt hoznak, másrészt különböző microarray-plattformok eltérő eredményt adnak (Tan és mtsai 2003). A szerzők végül 74 gént határoztak meg, amelyek szignifikánsan különbözően expresszáálódtak a rezisztens, mint a szülői sejtvonalakban (Kang és mtsai 2004).

Az utolsó közleményben 30 daganatos sejtvonalat teszteltek 5-fluorouracillal, doxorubicinnal, cyclophosphamiddal, etoposiddal, methotrexattal, mitoxantronnal, mitomycin C-vel, ciszplatinnal, topotecannal, vinblastinnal és placitaxellel szembeni érzékenység meghatározására, miközben a gyógyszereket a klinikumban is alkalmazott koncentrációban használták. Ilyen darabszám mellett biztosított volt a szövetfüggetlen vizsgálódás. Először rezisztencia-indexet használva szétválasztották a sejteket adott gyógyszerre érzékeny és rezisztens csoportokra, majd a rezisztens sejtvonalakat szenzitív társaikkal hasonlították össze. Affymetrix U133A array-jel vizsgálták valamennyi sejtvonal expressziós mintázatát, végül minden gyógyszerre egyedi kemoterápiás érzékenységi profilt állapítottak meg. Összesen 1781 gént találtak, amelyből 271 minimum kettő, 110 minimum három, és 67 minimum négy vagy több tumorelles szernél kapcsolatban hozható volt a rezisztenciával. Ezekben az esetekben feltehetően azonos mechanizmusok játszanak szerepet a gyógyszerválasz

kialakításában. A 67 génből mindezidáig 2 volt ismert mint a gyógyszerrezisztenciával kapcsolatban lévő gén. Ugyan az adott elváltozást mutató gének vagy az MDR következményeként, vagy aktív résztvevőként játszanak szerepet az MDR kialakításában, ez az adott tumor MDR státuszának meghatározásakor a gyógyszerválasz predikciójának szempontjából nem lényeges. Fontos meghatározása a szerzőknek, hogy nem találtak univerzális rezisztenciagént, hiszen nem volt olyan marker, amely valamennyi gyógyszerrezisztens sejtvonalnál elváltozást mutatott volna. Ez is azt bizonyítja, hogy különböző irányító mechanizmusok együtthatása alakítja ki az MDR-t, következésképp ezekben az esetekben a sikeres kemoterápia is a megfelelő gyógyszerek kombinációja lehet. A doxorubicin-rezisztenciával kapcsolatban 253 gént állapítottak meg (Gyorffy és mtsai 2006).

Ezekben a közleményekben Affymetrix és Stanford chipeket használtak. A két platformon levő géneket a Genebank Accession Number alapján (amelyet a Netaffx adatbázisból töltöttem le) kapcsoltam össze. Az ismétlődő géneket Microsoft Access segítségével választottam ki. A továbbiakban csak az ismétlődő génekkel foglalkoztam (1. és 2. táblázat).

3.2 *Transzkripciós faktorok meghatározása*

3.2.1 Szekvenciák kinyerése

A transzkripciós faktor kapcsolódási helyeinek meghatározásához az együttszabályozott gének regulációs régióit kellett először kigyűjteni. Először a proximális promóter-szekvenciákat (1 kb felfelé és 0,005 kb lefelé a transzkripcionális start helytől) töltöttem le a genomikai adatbázisból EZ-Retrieve-et használva (Zhang és mtsai 2002).

EZ-Retrieve az NCBI UniGene és LocusLink, TRANSFAC, és TFSEARCH adatbázisokat használja. Szerkezetük áttekintésére ezen adatbázisok jellemző vonásait kiemeltem.

Az együttszabályozott gének promóterelemzése során bizonyítást nyert, hogy a transzkripciós faktorok nem csak egy DNS-szekvenciához kapcsolódnak, hanem bizonyos fokú aszpecificitással ismerik fel a kapcsoló motívumokat. Ezért a promóterrégió „egy-az-

egyben” szekvenciaelemzése nem elegendő az összes TFKH felismeréséhez. A probléma kiküszöbölésére úgynevezett mátrixokat alkalmaznak, amelyben a különböző nukleotidoknak különböző súlyozottságot, „nyomosságot” rendelnek attól függően, hogy mekkora jelentősége van a transzkripciós faktor megkötésében. Ennek a feltételnek megfelelően készült transzkripciós faktorokat és kötőhelyek motívumait tartalmazó adatbázis a **TRANSFAC**, amely kapcsolatban van más külső adatbázisokkal is, így az EMBL, PubMed, FlyBase, PIR-rel is (Wingender és mtsai 2001).

LocusLink kérdéses szekvenciák és gének információinak összegyűjtő platformot biztosító adatbázisa, beleértve az NCBI Map Viewer térképolvasóját, Evidence Viewer-t, Model Maker-t, Blast Link-et, az NCBI protein domén adatbázisát, és számtalan egyéb génkapcsolt információforrást is. Az **UniGene** a GeneBank és EST szekvenciák automatikus felosztását lehetővé tevő rendszer. 10 állatfaj és 7 növényfaj állományát foglalja magában. Az UniGene hálózata tartalmazza az egyes gének szekvenciáit, a hozzájuk kapcsolt információkkal együtt, mint például a szövettípus, amelyben a gén expresszálódik, a proteinegyezőségeket mutató organizmusok, a géntérképen való elhelyezkedés. A GenBankban 3,6 millió humán expresszált szekvenciaszakasz található, amely a humán UniGene adatbázisban 104 000 csoportba osztottak fel. Éppen ezért az UniGene a legalkalmasabb egyes szekvenciák kiválasztására, mint például a microarray-k tervezésekor a megfelelő oligonukleotidok meghatározása. Az UniGene adatbázist hetente frissítik az új EST szekvenciákkal (Wheeler és mtsai 2002).

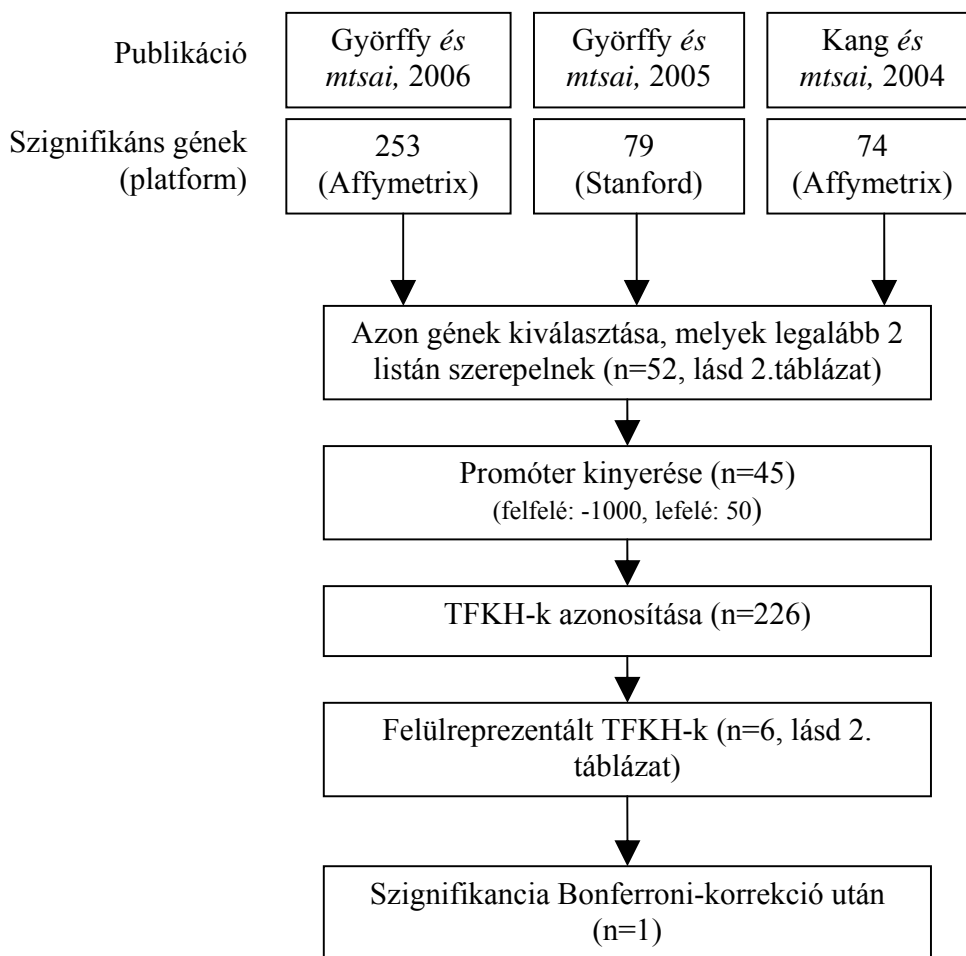
A kivont szekvenciákat FASTA formátumban mentettem el, majd importáltam a TOUCAN-ba (a szekvenciaadatok a Gyorffy és mtsai: *Comparative promoter analysis of doxorubicin resistance-associated genes suggests E47 as a key regulatory element* című cikk függelékében elérhetőek).

3.2.2 A transzkripciós faktor-kötőhely meghatározása

Következő lépésben a promóterszekvenciákon a felülexpresszált rövid DNS-motívumokat kerestem meg számítógépes programok segítségével. Ezeknek a motívumoknak a keresése nem könnyű, mert a gének feletti körülbelül 1000 bp hosszú szabályozó régióban a

10 bp hosszú szakaszok akárhol elhelyezkedhetnek, amit tovább nehezít, hogy az adott transzkripciós faktor kapcsolódási helyei jelentős szekvencia-variabilitást mutatnak (Tompa és mtsai 2005).

A TOUCAN (Java alapú) programot használtam a kiválasztott gének összehasonlító promóteranalízisének elvégzésére (Aerts és mtsai 2003). A TOUCAN program részét képező MotifScanner eszközzel, amely a TRANSFAC adatbázisban keres (Wingender és mtsai, 2001) határoztam meg a TFKH-eket szekvenciahalmazomban. Az Eukarióta Promóter Adatbázis (EPD) humán promótercsoportját választottam, mint háttérmodellt. A TOUCAN statisztikai eszközét alkalmaztam a MotifScanner és vele kombinációban a megfelelő várt frekvencia fájlok (humán EPD) által létrehozott adatok elemzésére, hogy a felül-reprezentált motívumokat megtaláljam (1. táblázat). Végezetül Bonferroni-korrekciónak hajtottam végre a többszörös teszt hatásának kompenzációjára (1. ábra).



1. ábra: Áttekintés a bejövő adatokról és az alkalmazott statisztikai analízisekről

	Alkalmazott adatbázis, program	Internetes cím	Funkció
1.	PubMed adatbázis	http://www.pubmed.com	doxorubicin-rezisztenciával kapcsolatos közlemények keresése
2.	EZ-Retrieve (NCBI UniGene LocusLink, TRANSFAC, TFSEARCH adatbázisokat használja)	http://www.cag.icph.org/bioinformatics.html (http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene)	promóter-szekvenciák letöltése a genomikai adatbázisokból
3.	TOUCAN (MotifScanner, Analízis alprogramok)	http://www.esat.kuleuven.ac.be/~dna/BioI/Software.html .	1., kiválasztott gének összehasonlító promóteranalízisének 2., TFKH-k meghatározása
4.	Eukariota Promoter Adatbázis	http://www.epd.isb-sib.ch/	háttérmodell: humán promótercsoport letöltése
5.	Matchprobe R	http://www.bioconductor.org	Szenz és antiszenz szekvenciák összehasonlítása
6.	NetAffx Analysis Centert	https://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/index.affx	Szenz-antiszenz transzkriptumok annotációja, Genebank Accession Number meghatározása
7.	Mouse Genome Informatics adatbázis	http://www.informatics.jax.org	egér genom nomenklatura meghatározása
8.	R könyvtárak Biobase, Annotate és Geneploer programjai	http://www.bioconductor.org	kromoszomális lokalizáció vizsgálatára
9.	Gene Expression Omnibus (GEO)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/	Szenz komplementáris expressziós adatátállomány letöltése

1. táblázat: Doxorubicin-rezisztenciával rendelkező gének kiválasztásához, a transzkripciós faktorok meghatározásakor (1-5) és az antiszenz expresszió vizsgálata során (6-10) alkalmazott adatbázisok, programok megnevezése, internetes elérhetősége és fő funkciójuk.

3.3 *Antiszensz transzkripció mértékének meghatározása*

Az elsődleges cél olyan gének azonosítása volt, ahol a szensz és antiszensz expressziós adat is rendelkezésre áll. Ennek érdekében az MGU74A egyes verziójú chipet az MGU74A kettes verziójú chippel hasonlítottam össze a Matchprobe R könyvtár segítségével [<http://www.bioconductor.org>]. A komplementáris megfelelő expressziós adatállományt a Gene Expression Omnibus (GEO) webes adatbázisból töltöttem le [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/>]. Minden egyes próbaszekvenciát kivontam, és belőlük ellenoldali komplementer szekvenciát képeztem, majd a másik chip vele megegyező szekvenciáját azonosítottam Microsoft Access segítségével. Összesen 8688 megfelelő szekvenciapárt találtam. A félreérthetősége elkerülése érdekében, és hogy biztos legyek abban, hogy a cisz-antiszensz transzkriptum pontos megfelelői a szensznek, a halmazból kivettem azokat a szekvenciákat, amelyek több transzkriptumra is rámutattak a másik MGU74A chipen. Azaz listámat azokra a próbákra csökkentettem, amelyeknek egyetlen elérhetőségi számuk volt. Így 1182 transzkriptum maradt, amelyeknek komplementer szekvenciái és expressziós szintje ismert volt. E szekvenciák a génexpressziós adatokkal együtt a Computational Analysis Reveals 43% Antisense Transcription in 1182 Transcripts in Mouse Muscle című cikk függelékének I. táblájában feltalálhatóak.

Első vizsgálódásomban Porter és mtsai (Porter és mtsai 2003) által közölt adatállományt választottam, mivel ugyanazon mintákat a MGU74A egyes és kettes verziójú chipre is hibridizálták (GEO elérhetőségi számok: GDS614, GSD639 és GDS703). Második adathalmazként pedig a Wong és mtsai (Wong és mtsai 2003) által publikált szekvenciahalmazt választottam (adathalmaz : GDS431 és GDS432). Kihagytam valamennyi egyéb transzkriptumot, és csak a fent kiválasztott 1182 transzkriptumra fókuszáltam. Mivel az Affymetrix adatok szemikvantitatívak, az antiszensz partnerek relatív szintjét alapul vehettem az analízishez. A statisztikai szignifikancia szintet $p < 0,05$ -nek választottam.

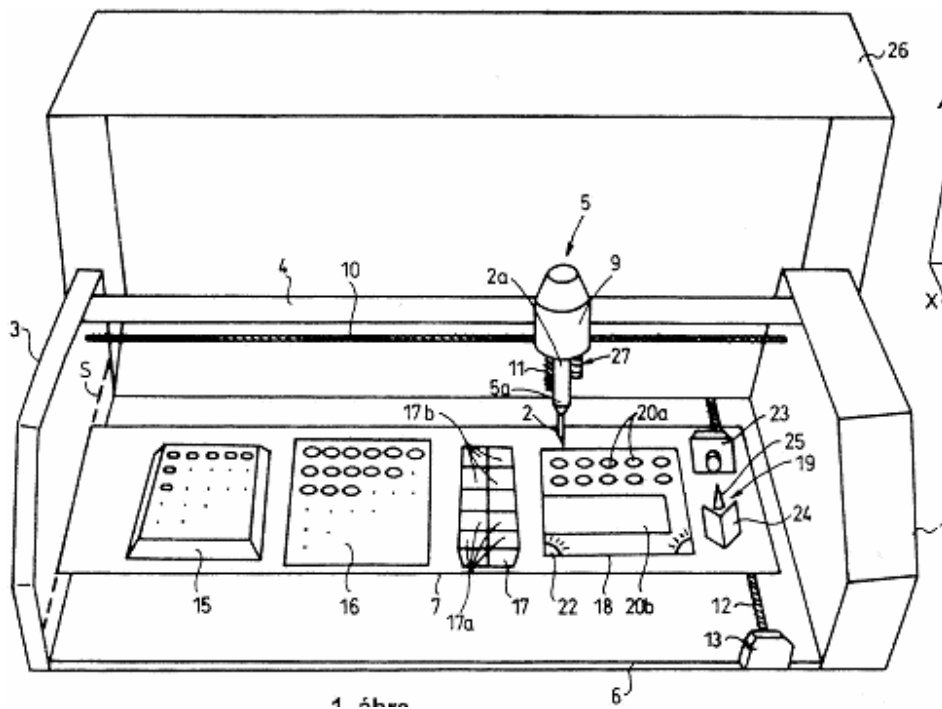
A transzkriptumok annotációjára az Affymetrix és NetAffx Analysis Centert alkalmaztam [<https://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/index.affx>] az egér genom nomenklaturát a Mouse Genome Informatics adatbázis adatainak megfelelően használtam [<http://www.informatics.jax.org/>]. Pearson-korrelációt számoltam a fent említett specifikus

szenz és antiszenz expresszió arányának meghatározásakor. A kromoszomális lokalizáció vizsgálatára az R könyvtárak Biobase, Annotate és Geneplotter programjait alkalmaztam [(Gentleman és Carey), <http://www.bioconductor.org>].

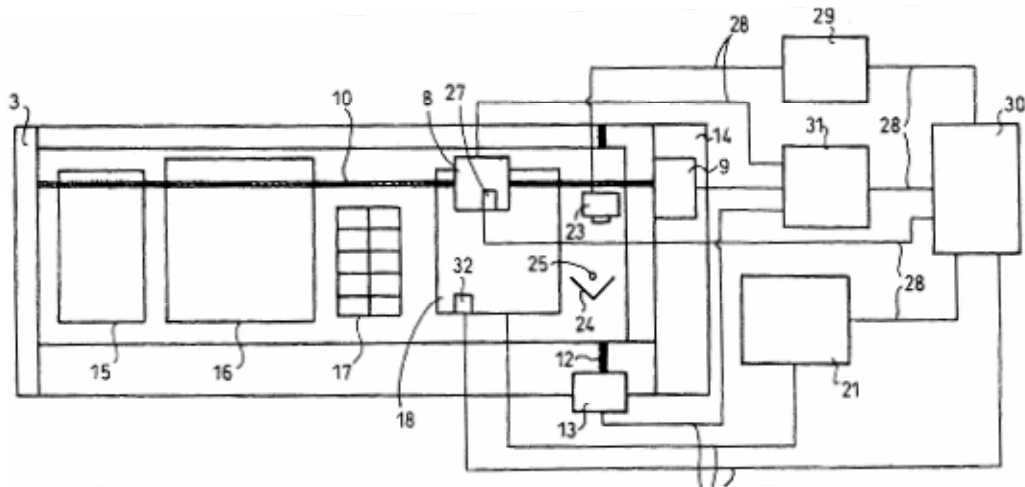
3.4 Szabadalmak, az automata mérőrendszer és pozicionáló leírása

A találmány (Patent pend: Györffy és mtsai, #101204) részleteit rajz segítségével ismertetem. A rajzon a 2.A ábrán az automata mérőrendszer kiviteli alakjának perspektivikus felülnézeti képe, az 2.B ábrán a mérőrendszer és a hozzá kapcsolódó elektronikus vezérlés vázlatos blokkdiagramja látható.

A.



B.



2. ábra: **A.** Az automata mérőrendszer egy lehetséges kiviteli alakjának perspektívikus képe
B. A mérőrendszer és a hozzákapcsolódó elektronikus vezérlés vázlatos blokkdiagramja (1 automata mérőrendszer; 2 eldobható pipettahegy; 2a egy elektromos-pipetta; 3 fémváz; 4 felső keresztthidas szerkezet; 5 tárgymozgató eszköz; 5a pipettahegy befogója; 6 fémváz alaplapja; 7 munkalap; 8, 9, 13, léptetőmotorok; 10, 11, 12, finommenetes csigahajtások; 14 fémváz jobboldali zárt doboza; 15 pipettahegytartó; 16 mintatartó; 17 hulladékgyűjtő; 18 mérőfelület; 19 pozicionáló egység; 20a mérőhelyek; 20b lemezke (chip); 21 hűtő/fűtő egység; 22 világító egység; 23 kamera; 24 tükrök; 25 referenciacsúcs; 26 tető; 27 aktív pumpa; 28 vezetékek; 29 jelfeldolgozó egység; 30 vezérlőközpont; 31 vezérlőegység; 32 hőérzékelők)

A 2. A ábrán az automata mérőrendszer egy eldobható pipettahegyekkel dolgozó automata pipettázó berendezés, amelyet erősített fémvázzal és felső keresztthidas szerkezettel alakítottam ki. Ez utóbbira függesztettem fel egy, a pipettahegyek mozgatására szolgáló tárgymozgató eszközt, amely Y és Z tengely irányában képes elmozdulni. A fémváz alaplapja felett található munkalap csúsztatható el az X tengely mentén, így tehát a tárgymozgató eszközbe befogott pipettahegyek a munkalaphoz képest mind Y és Z, mind X tengely irányában mozgathatók finommenetes csigahajtásokon keresztül léptetőmotorok segítségével. A három léptetőmotor közül az Y tengely irányú az automata mérőrendszer fémvázának

jobboldali zárt dobozában, az X tengely irányú a mozgó munkalap előtt vagy mögött, az alaplapon, a Z tengely irányú a tárgymozgató egység mellett helyezkedik el.

A tárgymozgató eszköz nemcsak a pipettahegyek mozgatására alkalmas, hanem a mérésekhez használt mikroelektródák vagy mérőfejek szállítására is szolgál. Az ábrákon külön nem tüntettem fel ezt az esetet, de a tárgymozgató eszközön a pipettahegy-befogó egy mikroelektróda vagy más a vizsgált mintával érintkezésbe hozandó mérőfej rögzítésére alkalmas befogóra cserélhető.

A pipettahegytartó egy süllyesztett, cserélhető pipettahegyek tárolására szolgáló pad. A cserélhető pipettahegyek 0,1 - 20 μ l-esek. A pipettahegytartó szabványos, 96 darabos, egyszerhasználatos, kereskedelmi forgalomban kapható, kivehető és kattintással behelyezhető egység. A pipettahegytartó egy része lecserélhető mikroelektróda-tartóra is, vagy külön mikroelektróda-tartó rendezhető el a munkalapon. A tárgymozgató eszköz egy robotkar, amely a pipettahegytartó fölé érve képes a pipettahegyet, illetve a mikroelektródát megfogni és kiemelni a pipettahegytartóból. A tárgymozgató eszközön a pipettahegybefogó mellett - amennyiben van külön - a mikroelektróda-befogót alumínium bilincs rögzíti a vízszintes (Y tengely) irányban és függőleges (Z tengely) irányban elmozduló törzsön.

A mintatartó a mérés során használt minták (oldatok, reagensek, biológiai minták, stb.) tárolására szolgál. A pipettahegytartóhoz hasonlóan a mintatartó is egyszerhasználatos, kereskedelmi forgalomban kapható kivehető és kattintással behelyezhető, 96 darab mintaoldal-tároló mélyedéssel rendelkező fröccsöntött tálca, vagy bármilyen más, a molekuláris-, vagy sejtbiológiában ismert tárolóedény-együttes.

A hulladékgyűjtő használtpipettahegy-tartót és folyadéktartót tartalmaz, amelyek az elhasznált pipettahegyek és szennyezett minták tárolására és ürítésére szolgáló tároló-ürítő edénykéék. Maga a hulladékgyűjtő olyan rozsdamentes lemezből hajlított tégely, amelybe külön behelyezhetők a folyadéktartók is.

A mérőfelület hűthető és/vagy fűthető mérőhelyekből és lemezekből (chipből) áll, amelyet az arra kijelölt területre erősíték a mérés megkezdése előtt. A mérőhelyek edényke formájú bemélyedéseit úgy alakítottam ki, hogy huszonegy darab 0,5 ml-es, vagy ugyanennyi 0,2 ml térfogatú egyszerhasználatos tubus tárolására alkalmas legyen. Elöl lefogó kallantyús lemezketartó részt építettem a mérőfelületre, ide a szintén mérőfelszínként szolgáló lemezkét

(chipet) fogom be, amelynek pontos pozicionálásához rendszerint ütközőcsavarok találhatóak a mérőfelületen.

A hűtés/fűtés az alumíniumból készült mérőhelyek és lemezke (chip) alsó felszíne alatt futó mart csövecskéken átáramló folyadékkal történik. A folyadékot rugalmas műanyag csövecskéken keresztül vezettem ki az automata mérőrendszer mellett elhelyezkedő, vagy annak részeként kialakított (például a fémváz dobozában elhelyezett), számítógéppel vagy mikrokontrollerrel vezérelt hűtő/fűtő egységbe (2.B. ábra). A mintatartó részét szintén elláttam hűtéssel/fűtéssel, amely a mérőfelület hűtését/fűtését szabályozó egységgel áll kapcsolatban. Amennyiben a mintatartó külön nem rendelkezik hűtéssel/fűtéssel, a hűtést/fűtést igénylő minták a mérőhelyek szabadon maradt részeiben is elhelyezhetők.

A mérőfelületre világító egységeket szereltem fel, készülékemben kis fénydiódák világítják meg a behelyezett lemezke felszínét. A műszer rugalmasságát és sokszínű felhasználását biztosítandó a munkalapon bármilyen további egység elhelyezhető, például külön mikroelektróda-tartó, vagy mintakeverő edények. A készülék teteje egy billenthető sötétített plexi tető, amelyen keresztül figyelhető a mérés automatikus menete, miközben nem zavarja a fényérzékeny reagenseket használó reakciót az erős külső fény. A tető hátrabilenését önfékezős visszahúzó fémhuzalokkal akadályoztam meg.

Bizonyos mérések végrehajtásához szükség lehet speciális környezeti körülmények megvalósításához, úgymint levegő tisztaság, szárazság, hőmérséklet, páratartalom. Az általam fejlesztett automata mérőrendszer ennek megfelelően szabadon ellátható nedvességelszívó, portalanító, hűtő/fűtő vagy más eszközökkel.

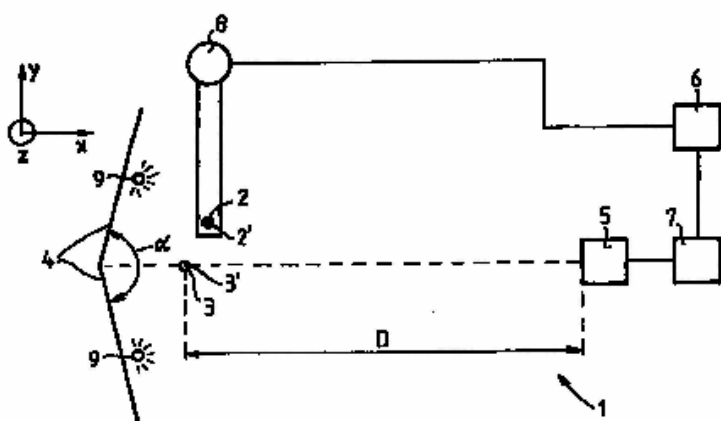
A pozicionáló egység (Patent pend: Györffy és mtsai, #101301) segítségével (3. ábra) a pozicionálandó tárgy, jelen esetben a piepttahegy helyzetét lehet mikrométeres pontossággal meghatározni és beállítani rögzített referenciatárgy referencia-csúcsához képest.

A pozicionáló egység kamerából, tükrökből és referenciacsúcsból tevődik össze. A referenciatárgy egy álló helyzetű, tüskeszerű objektum, amelynek csúcsa képezi a referenciacsúcsot, amely egymással α tompaszöveget bezáró két tükör között, az α szög szögfelező síkjában található. A tükrökkel szemben, azokhoz képest szimmetrikusan rögzítettem a képalkotó eszközt, egy digitális kamerát, a referenciacsúcs pontjától 3 cm

távolságra. A tompaszögben elhelyezett tükrök kiváltják egy második kamera szükségességét. A tükrök közti α szög megválasztása ugyanis befolyásolja a képalkotó eszközön keletkező kép méretét (vagyis a hasznos információt hordozó rész méretét). Ha az α szög túl nagy, akkor a szükségesnél nagyobb kép keletkezik, amely vagy nem fér bele a kamera által belátható fókuszált területbe, vagy ha bele is fér, tovább tart digitalizálni és ennek megfelelően tovább tart a tárgy pozicionálása. Másrészt, ha az α szög túl kicsi, akkor a tükrökről visszatevődő képek túl közel kerülnek egymáshoz, ezért vagy nagyobb felbontású képalkotó eszközt kell használni, vagy pontatlan lesz a pozicionálás. Azt találtam, hogy pipettahegyek pozicionálásakor a hajlásszög legideálisabb esetben 135° , így a keletkező képen a pipettahegynek mind az X tengely menti, mind az Y tengely menti helyzete jól kivehető.

A kellő fényintenzitás biztosításához a tükröket célszerű egy vagy több fényforrás által megvilágítani. Ennek érdekében egy-egy pontszerű fényforrás található mind a jobb, mind a bal oldali tükrök aljánál, közvetlenül a tükrök előtt. A kamerát egy számítógéppel vezérelt jelfeldolgozó egységgel kapcsoltam össze. A pipettahegyeket a fent már említett tárgymozgató robotkar szállítja és mozgatja csigahajtású léptető motorok segítségével X, Y, és Z irányban a kamerával készült és feldolgozott jelek (fényképek) alapján.

A pozicionáló egység az automata pipettázó berendezésekben használt mikroelektróda koordinátáinak meghatározására egyaránt alkalmas.



3. ábra: A pozicionáló egység vázlatos felülnézeti képe. 1. a kamera és a referenciacsúcs közötti távolság (D); 2. és 2' a pipettahegy és csúcsa; 3. és 3' a referencia tárgy és csúcsa; 4.

tükrök α szögben egymáshoz képest; 5. ccd kamera; 6. vezérlő egység; 7. jelfeldolgozó egység (PC); 8. robotkar; 9. világító egységek a tükrök aljában.

A hagyományos mikropipettázó berendezésekben a pipettázás kapilláris elven történik, vagyis a folyadékot tartalmazó mintatartóba mártott pipettahegy kapilláris hatás révén szívja fel a folyadékot. A mérőfelületre való rápipettázás a felület anyaga és a folyadék közti adhézió jelenségét használja ki, a pipettahegyet a mérőfelülethez közelítve a folyadék érintkezésbe kerül a felülettel, megtapad rajta, és a pipettahegy elemelésével ott marad a mérőfelületen. Ez a módszer azonban eldobható pipettahegyek használatakor nem javasolt, mivel az eldobható pipettahegyek vastagabbak. Az automata mérőrendszeremben éppen ezért a pipettahegyhez aktív elektromos pumpát kapcsoltam, amelyet a 2.A és a 2.B. ábrán vázlatosan tüntettem fel. Az elektromos-pipettát a keresztrúd felett a hátoldalon vízszintes helyzetben helyeztem el. Egy vastag külső falú és vékony belső furattal rendelkező szilikoncsővel kapcsolódik a pipettahegy-befogó azon részéhez, ahol a befogott pipettahegy végződik. A működés szempontjából pontosabb, ha minél rövidebb a kettő közti összekötő szakasz. Az aktív pumpa lehet valamilyen ismert típusú, kereskedelmi forgalomban kapható eszköz, itt Biohit márkájú elektromos-pipettát használtam, amellyel a pipettahegy csatlakoztatása után 0,1 - 20 μ l-es cseppeket lehet pipettázni. A pipettázható cseppek mérete a szokásos elektrokémiai és biokémia mérések esetén leggyakrabban 0,05 - 50 μ l közé esik. Az aktív pumpák jellegzetessége, hogy szabályozni lehet a felszívott és a kibocsátott anyag mennyiségét, illetve a kibocsátási sebességet. Egyszeri felszívással több kisebb csepp is lehelyezhető egymás után. A kereskedelmi forgalomban kapható aktív pumpák többnyire soros, esetleg USB porton keresztül programozhatóak. Az általam használt automata mikropipettát soros porton át programoztam.

A 2.B ábrán az automata mérőrendszer és a hozzákapcsolódó elektronikus vezérlés vázlatos blokkdiagramja látható. A hűtő/fűtő egység kivezető csövei, valamint a különböző elektronikai egységek kivezető kábelei (úgy mint USB port, soros port, 24V a léptetőmotorokhoz, a kamera tápfeszültség ellátása, stb.) az automata mérőrendszer hátoldalán találhatóak. A szemléletesség kedvéért ezeket a különböző típusú vezetékeket nem a megfelelő irányokban és számban, pusztán szimbolikusan tüntettem fel.

A pozicionáló egység kamerájának kimenete digitális jelfeldolgozó egységhez kapcsolódik, amelyet a vezérlőközponttal, asztali számítógéppel kötöttem össze. A jelfeldolgozó egység integrálható a vezérlőközponttal, esetemben a számítógép jelfeldolgozó programjaként valósul meg. A vezérlőközpont végzi a léptetőmotorok vezérlését is, egy erre a célra kialakított vezérlőegységen keresztül. A vezérlőegység egy számítógép program, a vezérlőközpont része.

A vezérlőközpont a hűtő/fűtő egységgel is kapcsolatban áll, és szabályozza a hűtött, illetve fűtött tartományok hőmérsékletét. Ehhez több hőérzékelőt helyeztem el a hűtött/fűtött tartományoknál, amelyek a hűtő/fűtő egységnek és közvetlenül a vezérlőközpontnak is szolgáltatnak jelet. A hűtő/fűtő egység a vezérlőközpont által kívánt hőmérséklet megadása után a hőérzékelők révén közvetlenül szabályozza a hűtendő/fűtendő tartományok hőmérsékletét.

A hűtő/fűtő egység, mint korábban említettem, egy különálló készülék, amely opcionálisan csatlakoztatható az automata mérőrendszerhez. A hűtő/fűtő feladat ellátására alkalmasak például az ismert, peltier-elemmel működő, szabályozható vízhőmérsékletű vízkeringtetéses eszközök. Az ilyen készülékek a kimenő és a visszaáramló víz átlaghőmérsékletéből, vagy a kettő közti hőmérsékletkülönbségből számolják a hűtés vagy fűtés szükséges mértékét, s így a vezérlőközponttól függetlenül is működtethetők, és akár a hőérzékelők is megspórolhatók a hűtött/fűtött tartományok környezetében.

3.5 Szabadalmak, az automata mérőrendszer és pozicionáló működése

Az automata mérőrendszer működése a következő gyakorlati lépésekből áll:

Először a vezérlőközpontban kiválasztom a végrehajtandó mérést vagy méréseknek megfelelő programot. Innentől kezdve a teljes mérési folyamat automatikusan történik a vezérlőközpont irányításával. A tárgymozgató eszköz és a munkalap mozgatásával a tárgymozgató eszköz a pipettahegytartó fölé kerül, ahol a pipettahegy-befogó felvesz, majd kiemel egy eldobható pipettahegyet a pipettahegytartóból. A pipettahegy befogása mindig bizonytalanságot jelent a pipettahegy pontos koordinátáját illetően, így ezt a pozicionáló egység segítségével pozicionálni kell. A pipettahegyet a tárgymozgató eszköz a

referenciacsúcs fölé szállítja. A kamera digitális képet készít a pipettahegy és a referenciacsúcs tompaszögben elrendezett tükrökben látható képéről. Ezt a jelfeldolgozó egység kiértékeli és a vezérlőközponton keresztül a pozicionáláshoz szükséges mozgásra vonatkozó jelet szolgáltat a léptetőmotorokat vezérlőegység számára. A pozicionálás több lépésben valósul meg, ezeken belül is először X és Y tengely mentén pozicionálja a program a pipettahegyet, majd Z tengely mentén. Az eldobható pipettahegyeket nem szabad hozzáérinteni a referenciacsúcsához, mivel a pipettahegyek könnyen megsérülhetnek, vagy szennyeződhetnek. Ezért tehát a Z tengely menti pozicionálást végző programot úgy alakítottam ki, hogy a pipettahegy referenciacsúcsot távolságfelező lépéseken keresztül közelíti meg. Vagyis úgy, hogy minden lépésben felezi a pipettahegy és a referenciacsúcs közti Z tengely menti távolságot, és a mérés jellegétől függően néhány 0,1 μm távolságnál fejezi be a Z tengely menti pozicionálást. Azt a helyzetet tekintem a koordináta rendszer origójának, ha a program segítségével pipettahegyet a referenciacsúcsához igazítottam. A vezérlőközpont a továbbiakban ezt használja a pipettahegy és a munkalap egyes pontjainak egymáshoz képesti távolságának számításakor, és ez alapján történik a léptetőmotorok segítségével a pipettahegy, illetve a munkalap mozgatása.

A pipettahegyet ezután a mintatartóhoz (illetve adott esetben a mérőhelyekben elhelyezett hűtött vagy fűtött mintákhoz) szállítja a tárgymozgató eszköz, ahol a kívánt mintát aktív pumpa segítségével a pipettahegybe szívja fel. Ez lehet például egy oldat, vegyület, reagens, biológiai minta. A mintát a pipettahegygel a mérőfelület fölé viszi, és megközelíti vele valamelyik mérőhelyet, vagy a lemezke azon pontját, ahová a mintát le kell helyezni. Ez utóbbi művelet szintén az aktív pumpa segítségével történik, így a pipettahegyet nem kell hozzáérinteni a mérőfelülethez. Amennyiben a mérőfelület valamely részét vagy egészét hűteni, illetve fűteni kell, akkor ennek a hőmérsékletét már előzetesen beállítom a vezérlőközpont a hűtő/fűtő egység, illetve a hőérzékelők segítségével. Ha azonos mintákat kívánok lehelyezni, és ez elvégezhető az aktuálisan használt pipettahegygel, akkor a többi mintát hasonló módon felvetetem a pipettahegygel a mintatartóból, és felvetetem a mérőfelületre. Ha két pipettázás között cserélni kell a pipettahegyet (mert például különböző mintákat akarok szállítani), akkor a pipettahegyet a tárgymozgató eszköz a hulladékgyűjtőbe

helyezi, majd felvesz egy új pipettahegyet a pipettahegytartóból, amelyet először ismét pozicionál.

A vizsgálandó összes minta elhelyezése után az automata mérőrendszer vezérlőközpont irányítása alatt végrehajtja a minták kiértékeléséhez szükséges méréseket. Ezek közé tartozhatnak olyan elektrokémiai mérések, amelyek végrehajtásához mikroelektrodák állnak majd rendelkezésre a pipettahegytartó egy erre kijelölt részében, vagy egy külön tároló helyen. Ez esetben a tárgymozgató eszköz a pipettahegyekhez hasonlóan felveszi a mikroelektrodát, a pozicionáló egységhez szállítja, majd a pozicionálást követően a lehelyezett mintákba érinti. Mivel a lehelyezett minták mennyisége akár tized μl -es nagyságrendbe is eshet, rendkívül fontos, hogy a tárgymozgató eszközzel pontosan oda lehessen visszatalálni, ahová a mintát az eldobható pipettahegy előzőleg lehelyezte. Éppen ezért szükséges mind a tárgymozgató eszközbe befogott pipettahegyeket, mind a mikroelektrodát pozicionálni.

4 Eredmények

4.1 Rezisztenciával kapcsolatban álló konszenzus génlista

Az összehasonlító promóteranalízishez három különböző génlistát kombináltam. A doxorubicin-rezisztenciával kapcsolatban az összes talált 312 egyedi génből 52 ismétlődve, legalább két génlistában szerepelt (1. ábra és 2. táblázat). A modell pontosságát növelendő a többi gént kizártam a további vizsgálataimból és csak az ismétlődő génekre fókuszáltam. Az 52 génből 45 gének lehetett a promóterszekvenciáit letölteni (2. táblázat).

2. táblázat: Doxorubicin-rezisztenciával rendelkező gének, amelyek legalább két különböző publikált génlistában szerepelnek.

UniGén ID	Affy ID	Public ID	Jelölés	Gén Titulus
Hs.102267	204298_s_at	NM_002317	LOX	lizil-oxidáz
Hs.125457	221531_at	AF309553	REC14	rekombinációs protein REC14
Hs.126256	205067_at	NM_000576	IL1B	interleukin-1, béta
Hs.130865	214247_s_at	AU148057	DKK3	dickkopf homológ 3
Hs.133892	206116_s_at	NM_000366	TPM1	tropomiozin 1 (alfa)
Hs.153355	212636_at	AL031781	QKI	quaking homológ, KH domén RNS kötés
Hs.155223	203439_s_at	BC000658	STC2	sztanniokalcin 2
Hs.156346	201292_at	AL561834	TOP2A	topoizomeráz (DNS) II alfa 170kDa
Hs.1594	204962_s_at	NM_001809	CENPA	centromér protein A, 17kDa
Hs.171466	219518_s_at	NM_025165	ELL3	elongációs faktor RNS-polimeráz II-szerű 3
Hs.1908	201859_at	NM_002727	PRG1	proteoglikán 1, szekréción granulum
Hs.191583	213599_at	BE045993	OIP5	Opa-interakciós protein 5
Hs.199695	212281_s_at	BF038366	MAC30	hipotetikus protein MAC30
Hs.23348	210567_s_at	BC001441	SKP2	S-fázis kináz-asszociált protein 2 (p45)
Hs.24529	205393_s_at	NM_001274	CHEK1	CHK1 checkpoint homológ
Hs.250687	205803_s_at	NM_003304	TRPC1	transziens receptor potenciális kation csatorna, alcsalád C, tag 1
Hs.257049	204236_at	NM_002017	FLI1	Friend leukémia vírus integráció 1
Hs.259047	203434_s_at	NM_007287	MME	membrán metallo-endopeptidáz (CALLA, CD10)
Hs.26471	212745_s_at	AI813772	BBS4	Bardet-Biedl-szindróma 4

Hs.279766	218355_at	AF179308	KIF4A	kinezin család tag 4A
Hs.279905	219978_s_at	NM_018454	NUSAP1	nukleoláris és spindle asszociált protein 1
Hs.309674	212473_s_at	BE965029	MICAL2	flavoprotein-oxidoreduktáz MICAL2
Hs.311589	205006_s_at	NM_004808	NMT2	N-mirisztoil-transzferáz 2
Hs.312102	208951_at	BC002515	ALDH7A1	aldehid-dehidrogenáz 7 család, tag A1
Hs.315167	219000_s_at	NM_024094	DCC1	lánystestvérekben defektív kromatid kohéziós homológ 1
Hs.324470	205882_x_at	NM_016824	ADD3	adducin 3 (gamma)
Hs.334562	203213_at	AL524035	CDC2	sejtosztódási ciklus 2, G1-től S-ig és G2-től M-ig
Hs.334828	213008_at	BG403615	FLJ10719	hipotetikus protein FLJ10719
Hs.344037	218009_s_at	NM_003981	PRC1	a citokinezis protein regulátora 1
Hs.36708	203755_at	NM_001211	BUB1B	BUB1 benzimidazol általi gátlástalan növekedés 1 homolog beta
Hs.388160	209512_at	BC004331	C9orf99	kromoszóma 9 nyílt olvasási keret 99
Hs.395771	201432_at	NM_001752	CAT	kataláz
Hs.414795	202628_s_at	NM_000602	SERPINE1	szerin-proteáz inhibitor, clade E, tag 1
Hs.418138	212464_s_at	X02761	FN1	fibronektin 1
Hs.42650	204026_s_at	NM_007057	ZWINT	ZW10 interaktor
Hs.434953	208808_s_at	BC000903	HMGB2	nagy mobilitású csoport box 2
Hs.435795	201163_s_at	NM_001553	IGFBP7	inzulinszerű növekedési faktor-kötő protein 7
Hs.438231	209277_at	AL574096	TFPI2	szöveti faktor utat gátló 2
Hs.446406	216870_x_at	AF264787	DLEU2	deleted in limfocitotikus leukémia, 2
Hs.489033	209993_at	AA455911	ABCB1	ATP-kötő kazetta, alcsalád B (MDR/TAP), tag 1
Hs.528669	218662_s_at	NM_022346	HCAP-G	kromoszóma kondenzációs protein G
Hs.624	202859_x_at	NM_000584	IL8	interleukin-8
Hs.6385	53991_at	AA127623	KIAA1277	KIAA1277
Hs.72550	207165_at	NM_012485	HMMR	hialuronan-mediált motilitás receptor
Hs.75277	212479_s_at	AK022815	FLJ13910	hipotetikus protein FLJ13910
Hs.77274	205479_s_at	NM_002658	PLAU	plazminogénaktivátor, urokináz
Hs.79078	203362_s_at	NM_002358	MAD2L1	MAD2 mitózisgátló deficiens-szerű 1
Hs.799	203821_at	NM_001945	DTR	diftériatoxin receptor
Hs.81892	202503_s_at	NM_014736	KIAA0101	KIAA0101
Hs.89497	203276_at	NM_005573	LMNB1	lamin B1
Hs.89714	214974_x_at	AK026546	CXCL5	kemokin (C-X-C motif) ligandum 5
Hs.93121	205240_at	NM_013296	GPSM2	G-protein jelző modulátor 2

4.2 *Közös transzkripció faktor meghatározása a kapott génlistában*

A 45 promóterszekvenciával rendelkező gént használtam fel közös szabályozó elemek, transzkripció faktorok keresésére. Az összehasonlító promóteranalízis génhalmazom felülexpresszált transzkripció faktoraként az E47-et fedte fel ($p=0,00024$, $n=9$, háttér frekvencia: $8,19E-6$) (3. táblázat).

E transzkripció faktor-kötőhely 9 különböző génen szerepelt, ezek közül az SKP2 génen 2 kötőhellyel. Az E47 TFKH konszenzus szekvenciája: RCAGNTG (TRANSFAC elérhetőségi szám: R02139)

3. táblázat: Felülreprezentált TFKH Bonferroni-korrekció előtt és után. Hat transzkripció faktor közül a korrekció után az E47 mutatott szignifikáns eltérést (n : gének száma ahol a TFKH megtalálható)

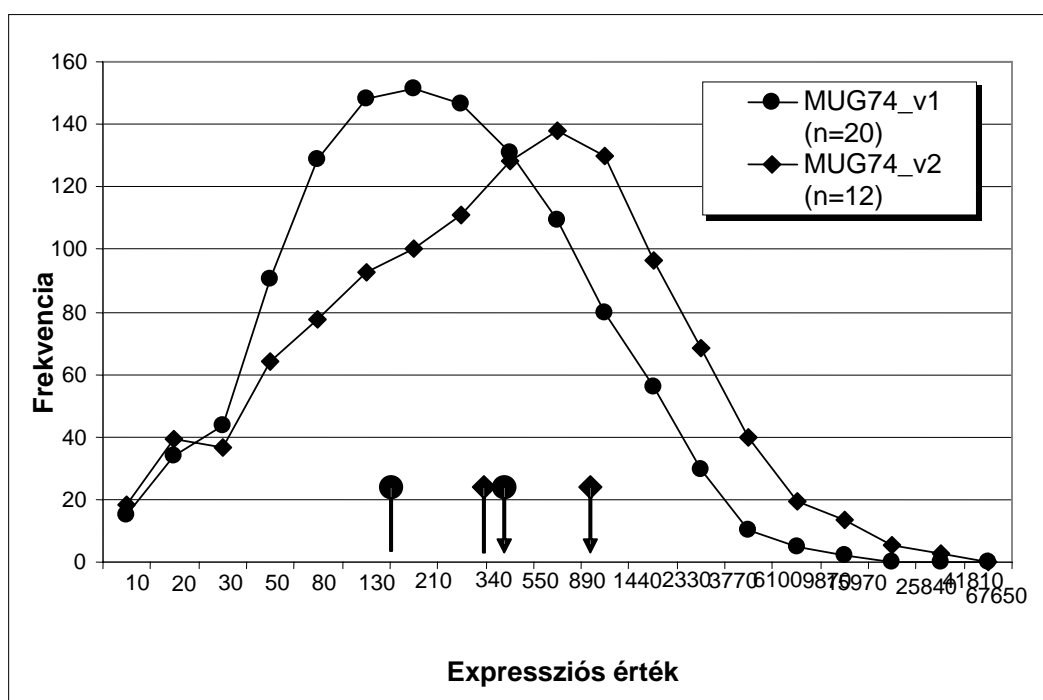
Transzkripció faktor	n	p érték	Szignifikancia Bonferroni-korrekció után
E47	9	0.00024	igen
TAL1alfaE47	6	0.01	nem
EGR3	4	0.02	nem
NFY	17	0.03	nem
HEN1	4	0.03	nem
ISRE	9	0.05	nem

4.3 *Antiszenz transzkripció mértékének meghatározása*

Porter és mtsai adatállományában 20 darab MGU74A egyes verziójú és 12 darab MGU74A kettes verziójú chip hibridizációs adatai találhatóak. A mintákat kettébontottam dystrophin-hiányos és kontrollcsoportokra, de nem választottam szét őket eredetük alapján (extraokuláris-, vagy lábizom). Először az MGU74A egyes verziójú és kettes verziójú chip expressziós különbségeit hasonlítottam össze. 43%-os általános antiszenz expressziót találtam a szenz expresszióhoz viszonyítva a vizsgált transzkriptumokban. A hisztogram bemutatja mindkét chip expressziós szintjét, érzékeltetve, hogy az antiszenz expressziós szintek kisebbek a szenznél (4. ábra). Átlagos antiszenz expresszió relatív normlizált egységben az

MGU74A egyes verziójú chipen 525,1 volt, míg a szenz csipen 1219,1 (t-teszt: $p < 0,0001$, 4. ábra).

4. ábra: Valamennyi 1182 gén expressziós értékeinek hisztogramja 20 antiszenz (MGU74A egyes verziójú) és 12 szenz (MGU74A kettes verziójú) chip adatai alapján. Az MGU74A chipek átlagos expressziós értékei láthatók (nyilak: az egyes verzió átlaga: 525,1, kettes verzió átlaga: 1219,1, $p < 0,001$; nyíl nélkül középérték egyes verzió: 196,4, középérték kettes verzió: 414,6) Az expressziós értékpontok képlete: $n = (n-1) + (n-2)$.



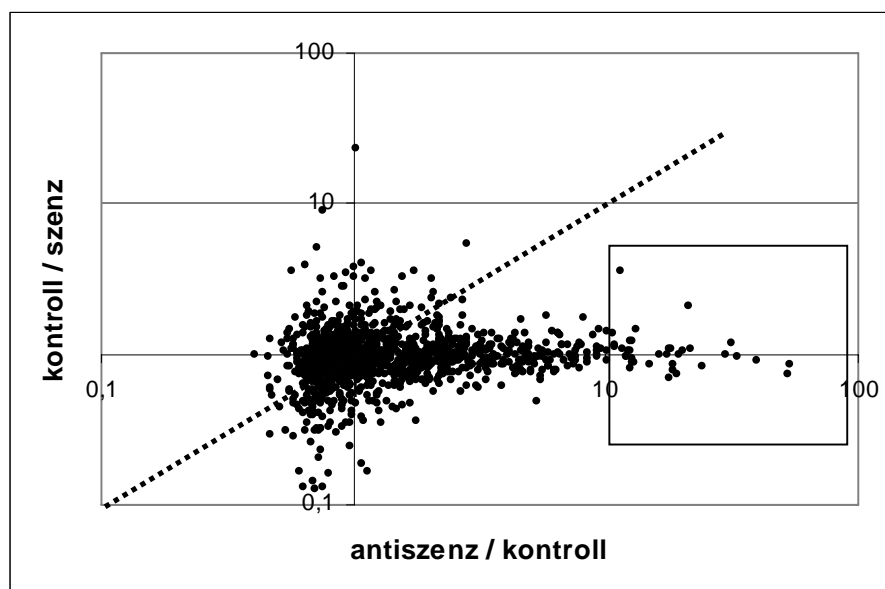
Az antiszenz expresszió szabályozási jellemzőinek tanulmányozására összehasonlítottam a kontroll/vizsgált MGU74A egyes verziójú chip (antiszenz) adatait a megfelelő kontroll/vizsgált MGU74A kettes verziójú chip expressziós szintjeivel (5. ábra). Az elméleti korrelációt pontozott vonallal szemléltettem az 5. ábrán. A 4. táblázatban azokat a géneket mutattam be, amelyek az 5. ábrán látható pontozott vonalhoz közel esnek. Ezek a transzkriptumok olyan génekre mutatnak, amelyekben a szenz-antiszenz expresszió inverz

korrelációt mutat. Az így korreláló transzkriptumok pontos szenz-antiszenz pár szekvenciái a 6. ábrán láthatóak.

4. táblázat: A szenz expresszióhoz képest magas antiszenz expressziót mutató gének listája (v1: vizsgált/kontroll expressziós átlag az MGU74A egyes verziójú antiszenz chipen, v2: kontroll/vizsgált expressziós átlag az MGU74A kettes verziójú szenz chipen. A 2 feletti expressziós különbséggel rendelkező transzkriptumok láthatók)

v1	v2	MGU74A v1 AffyID	MGU74A v2 AffyID	RefSeq ID	Jelölés	Gén titulus	Gén ontológia
21,28	2,09	97244_at	160253_at	NM_025378	Ifitm3	interferon-indukált transzmembrán fehérje 3	immunválasz /// a sejtproliferáció negatív regulációja
11,47	3,60	102443_at	162325_f_at	NM_009394	Tnnc2	troponin C2, gyors	izomösszehúzódnás regulációja /// izomfejlődés /// kalciumion-kötés
2,81	5,36	99614_at	160487_at	NM_010858	Myl4	miozin, light polipeptid 4	citoszkeleton szerveződése és biogenezis /// izomfejlődés /// kalciumion-kötés
2,03	3,16	98746_at	161948_f_at	---	---	---	---
2,72	2,28	103169_f_at	162479_f_at	NM_010240	Ftl1	ferritin light lánc 1	vasiontranszport /// vasion-homeosztázis /// vasion-kötés
2,46	2,37	100212_f_at	162206_f_at	NM_007707	Socs3	citokin jeladás szuppresszora 3	sejtnövekedés regulációja /// szignál transzdukció /// intracelluláris jeladás
2,07	2,55	96438_at	161583_at	NM_011949	Mapk1	mitogén-aktivált proteinkináz 1	fehérjeaminosav foszforiláció /// sejtciklus /// szignál transzdukció/// organogenezis
2,06	2,34	101941_at	160940_at	NM_172755	Sfrs14	splicing faktor, arginin/szerin-gazdag 14	---
2,18	2,15	95827_i_at	161509_at	NM_008610	Mmp2	mátrix metalloproteináz 2	proteolízis és peptidolízis /// kollagén katabolizmus/// kalcium- és cinkion-kötés

5. ábra: Az MGU74A egyes verziójú chip antiszenz vizsgált/kontroll és az MGU74A kettes verziójú chip kontroll/senz arány összehasonlítása kapott expressziós értékek alapján. A pontozott vonal az elméleti korrelációt mutatja be. A téglalap a 10-szeres feletti antiszenz transzkripcióval rendelkező transzkriptumokat tartalmazza.



6. ábra: A 4. táblázat transzkriptumainak pontos pozícióinak összehasonlítása az MGU74A egyes verziójú (alsó sor, antiszenz) és kettes verziójú (felső sor, szenz) chipen.

Mmp2			101941_at
161509_at		160940_at	
1 →	47	188 →	289
CCACGACTCG	-- TTCAGCCCC	ACACTTGTGA	-- GAGCAGACCC
CCACGACTCG	-- TTCAGCCCC	ACACTTGTGA	-- GAGCAGACCC
123	← 77	274	← 173
	95827_i_at		101941_at
Sfrs14		160940_at	
160940_at		377 →	461
1 →	134	CCNCGACCTG	-- GTTGCTGAGG
TGACCTTGTT	-- GTTTGTTCCT	CCNCGACCTG	-- GTTGCTGAGG
TGACCTTGTT	-- GTTTGTTCCT	85	← 1
461	← 328		101941_at

Mapk1

161583_at

19 → 99

GTATTCCATG	--	TCACCTATCC
GTATTCCATG	--	TCACCTATCC

190 ← 110

96438_at

161583_at

131 → 198

AACATCAATG	--	TGCAATTGTA
AACATCAATG	--	TGCAATTGTA

78 ← 11

96438_at

Socs3

162206_f_at

104 → 148

CCCACCTAGG	--	GAGAAACTCA
CCCACCTAGG	--	GAGAAACTCA

52 ← 8

100212_f_at

Fhl1

162479_f_at

31 → 83

TTGAGCCCCT	--	TTCCAAGGGG
TTGAGCCCCT	--	TTCCAAGGGG

54 ← 2

103169_f_at

Myl4

160487_at

1 → 79

TTGAGCCCCT	--	TTCCAAGGGG
TTGAGCCCCT	--	TTCCAAGGGG

79 ← 1

99614_at

Consensus seq

161948_f_at

1 → 64

ATTTTTACTG	--	ATACAATCCC
ATTTTTACTG	--	ATACAATCCC

129 ← 66

98746_at

161948_f_at

98 → 129

ACATATCCTA	--	CCAATCATT
ACATATCCTA	--	CCAATCATT

99 ← 1

98746_at

Tnnc2

162325_f_at

6 → 195

ATCCCTAATG	--	TCCTTTGGGT
ATCCCTAATG	--	TCCTTTGGGT

190 ← 1

102443_at

Ifitm3

160253_at

1 → 406

TTGCCCTTCA	--	TGTTAGTGTC
TTGCCCTTCA	--	TGTTAGTGTC

406 ← 1

97244_at

A 5. táblázatban azokat az antiszenz transzkriptumokat soroltam fel, amelyeknél a több mint tízszeres expressziós különbségeket tapasztaltam a kontrollcsoporthoz képest. Ezeket egy téglalappal fogtam körbe az 5. ábrán és az 5. táblázatban soroltam fel.

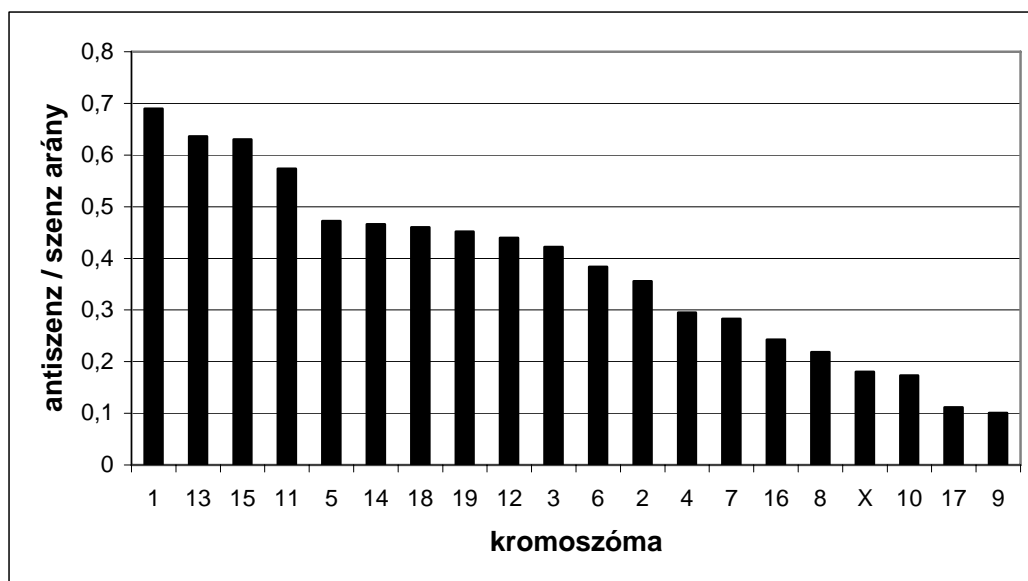
5. táblázat: Tízszeres mértékű antiszensz expressziót mutató transzkriptumok a kontrollmintákhoz viszonyítva. (v1: vizsgált/kontroll expressziós átlag az MGU74A egyes verziójú antiszensz chipen, v2: kontroll/vizsgált expressziós átlag az MGU74A kettes verziójú szenz chipen. A feltüntetett gének egyikét sem írták le korábbi antiszensz témájú bioinformatikai alapú tanulmányban).

v1	v2	MGU74A v1 AffyID	MGU74A v2 AffyID	RefSeq ID	Jelölés	Gén Titulus	Gén ontológia
52,55	0,74	160244_at	97214_at	NM_010192	Fem1a	feminizáció 1 homológ a	transzkripció-reguláció, DNS-függő
21,28	2.09	160253_at	97244_at	NM_025378	Ifitm3	interferon-indukált transzmembrán fehérje 3	immunválasz /// sejtproliferáció negatív regulációja
32,98	0,96	160275_at	97827_at	NM_013759	Sepx1	szelenoprotein X 1	fehérjejavítás
19,59	0,98	160299_at	98885_at	NM_025614	Rwdd1	RWD domén tartalmú 1	receptoraktivitás
12,89	0,87	160330_at	95051_at	NM_025844	Chordc1	Cisztein- és hisztidingazdag domén (CHORD)-tartalmú	---
29,88	1,00	160360_at	96247_at	NM_053102	SEP15	szelenoprotein	szelén megkötés
12,54	0,81	160400_at	97455_at	NM_027275	2810422B04 Rik	RIKEN cDNS 2810422B04 gén	---
10,07	0,89	160431_at	98103_at	NM_027204	Mrpl12	mitochondriális riboszomális protein L12	fehérje-bioszintézis
13,26	1,46	160559_at	101559_at	---	---	---	---
10,80	1,16	160593_at	102388_at	NM_025664	Snx9	szortírozó nexin 9	transzport /// intracelluláris jelzőkaskád
17,88	0,69	160708_at	104599_at	NM_013928	Schip1	schwannomin interakciós protein 1	---
12,48	1,21	160727_at	94443_at	NM_025880	2410002F23 Rik	RIKEN cDNS 2410002F23 gén	---
10,04	1,06	160761_at	95589_at	---	---	---	---
24,28	0,82	160819_at	97396_at	---	---	---	---
10,92	1,11	160820_at	97399_at	NM_080419	Igsf8	immunoglobulin szupercsalád, tag 8	fehérjekötés
39,69	0,90	160875_at	99540_at	NM_011185	Psmbl1	proteoszóma alegység, béta típus 1	ubikvitinfüggő fehérjekatabolizmus
12,80	0,92	160907_at	100922_at	NM_172479	Slc38a5	oldott anyagot szállító család 38, tag 5	---

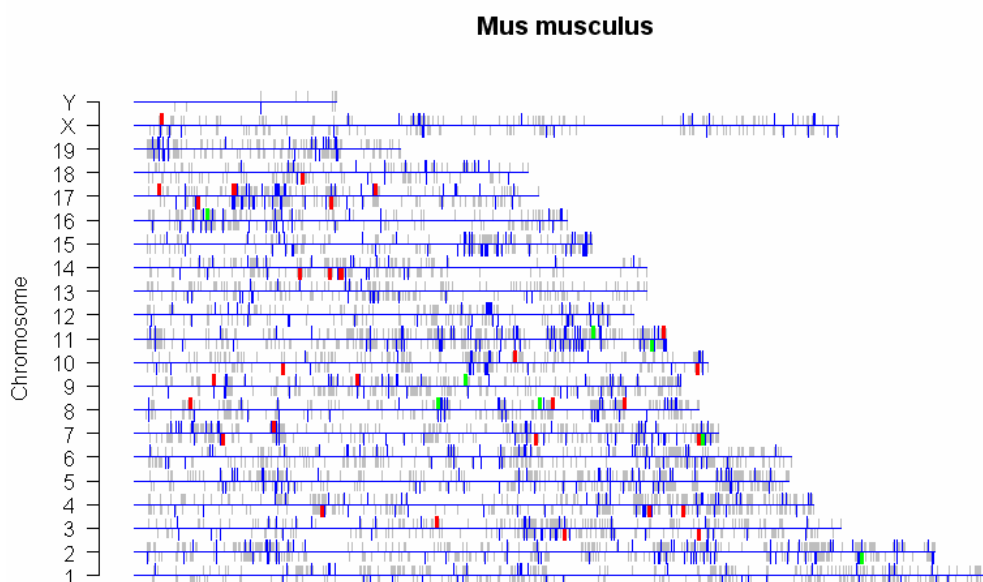
21,53	1,08	161005_at	104236_at	NM_172597	5730420B22 Rik	RIKEN cDNS 5730420B22 gén	elektrontranszport
12,70	0,88	161014_at	104490_at	NM_020584	Terf2ip	telomerikus ismétlődő kötő faktor 2, interakciós fehérje	telomerázfüggő telomér fenntartás
16,35	0,98	161073_at	93368_at	NM_175331	C630002B14 Rik	RIKEN cDNS C630002B14 gén	---
18,45	0,77	161184_f_at	100832_f_at	NM_011587	Tie1	tirozinkináz receptor 1	protein-aminosav foszforiláció
19,10	0,74	161205_at	100854_i_at	---	---	---	---
17,75	1,09	161359_s_at	94650_at	NM_144897	Apoa1bp	apolipoprotein A-I kötő protein	fehérjekötés
10,16	1,40	161426_at	95217_i_at	---	C330027G06 Rik	RIKEN cDNA C330027G06 gén	---
12,15	0,95	161429_at	95220_at	---	---	---	---
18,30	1,08	161458_at	95258_at	NM_010172	F7	koagulációs faktor VII	proteolízis és peptidolízis /// vér koaguláció metabolizmus /// kalciumion megkötés
18,39	0,86	161499_f_at	95815_f_at	---	---	---	---
31,65	1,17	161510_f_at	95829_f_at	---	---	---	---
10,60	1,37	161535_at	95873_at	---	---	---	---
12,21	1,05	161557_at	96395_at	NM_008612	Mnat1	menage a trois 1	transzkripció regulációja, DNS-függő
14,99	0,85	161610_at	96467_at	---	---	---	---
12,13	0,96	161698_f_at	97607_f_at	NM_144941	BC019977	cDNS-szekvencia BC019977	---
12,51	1,05	161990_f_at	99241_f_at	---	---	---	---
17,70	0,99	162013_f_at	99267_f_at	---	---	---	---
12,74	1,23	162089_r_at	99718_r_at	NM_011602	Tln1	talin 1	sejt-szubsztrát kapcsolat létrehozása/// kortikális aktin citoskeleton szervezés és biogenezis
20,25	1,06	162308_f_at	102184_at	NM_009964	Cryab	krisztallin, alfa B	szem morfogenezise
11,47	3,60	162325_f_at	102443_at	NM_009394	Tnnc2	troponin C2, gyors	izomkontrakció regulációja/// izomfejlődés/// kalciumion megkötés
53,98	0,84	162457_f_at	103141_f_at	NM_008218	Hba-a1	hemoglobin-alfa, felnőtt lánc 1	transzport /// oxigéntranszport
11,58	1,09	162458_i_at	103142_i_at	NM_028230	Shmt2	szerin-hidroximetil-transzferáz 2	1 széntartalmú vegyületek metabolizmusa

Végezetül kiszámítottam az átlagos szenz-antiszenz expressziós arányt, hogy bemutassam a kromoszómák közötti különbséget és bejelöltem a vizsgált szenz-antiszenz transzkriptum pozíciókat az egér kromoszómákon (7.A és 7.B ábra).

A.,



B.,

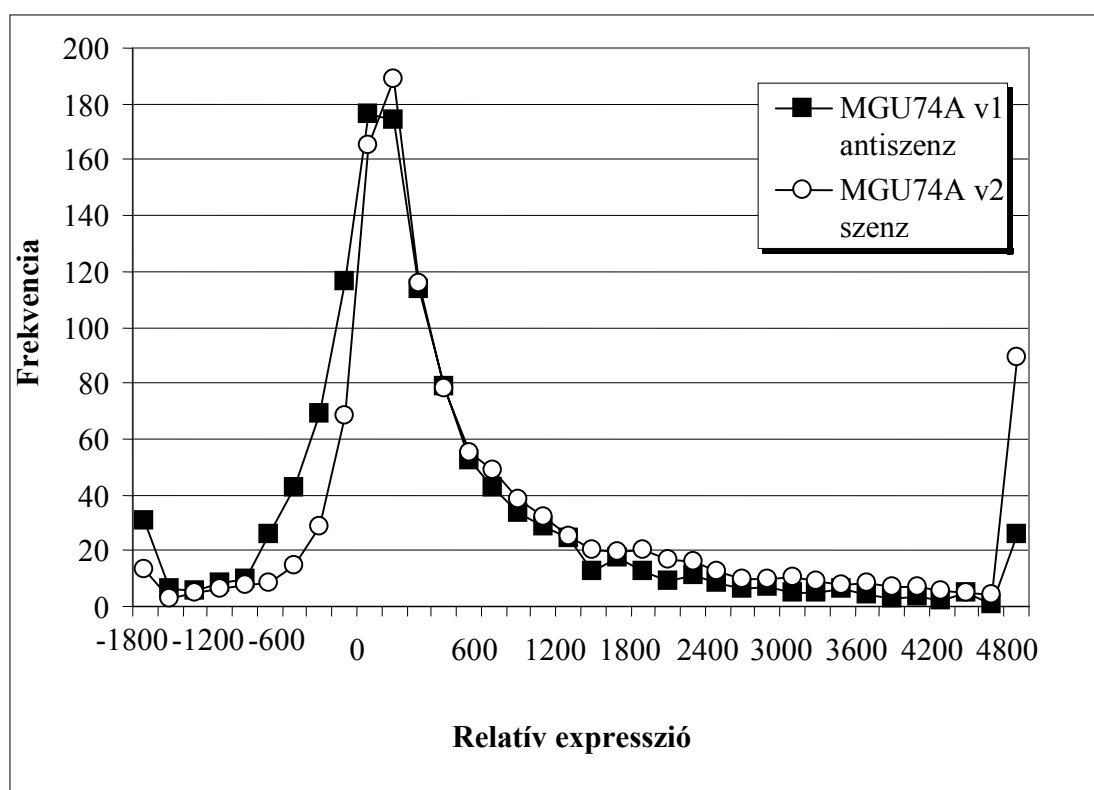


7. ábra: A., Az átlagos antiszenz/szenz expresszió értéke jelentős különbségeket mutat a kromoszómák között. B., A vizsgált transzkriptumok elhelyezkedése az egér

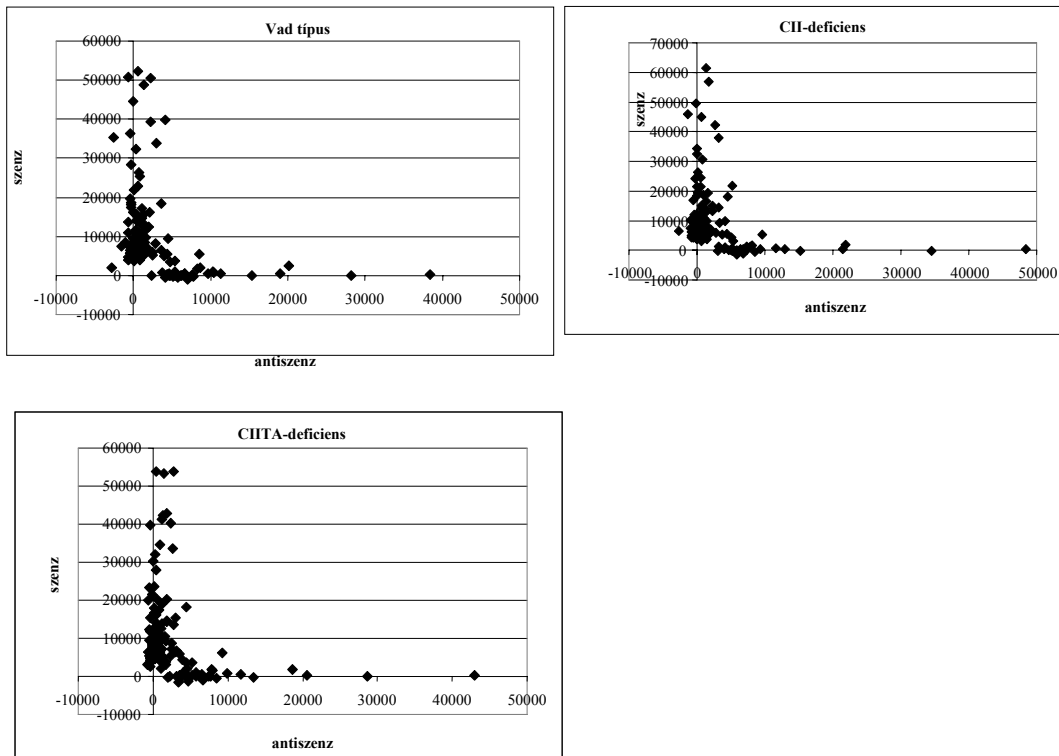
kromoszómákon. Az Affymetrix chip vizsgált (kék szín) és kontroll háttér (szürke szín) génjei. A 3. (piros) és 4. (zöld) táblázatban feltüntetett transzkriptumokat megjelöltem.

Wong és mtsai által publikált adathalmaz vizsgálata során is mindkét irányban tapasztaltam génexpressziót. Az átlagos antiszenz expresszió 516 volt (normalizált relatív egységben), míg az átlagos szenz expressziós szint 1688. Különösen magas expressziós értékeknél a szenz gének gyakorisága felülmúlja az antiszenz génekét. A szenz és antiszenz gének expressziós eloszlását a 8. ábra mutatja.

8. ábra: Az 1182 gén átlagos expressziós szintjét bemutató hisztogram 3 darab MGU75A egyes és 6 darab MGU74A kettes verziójú chip vizsgálata alapján.



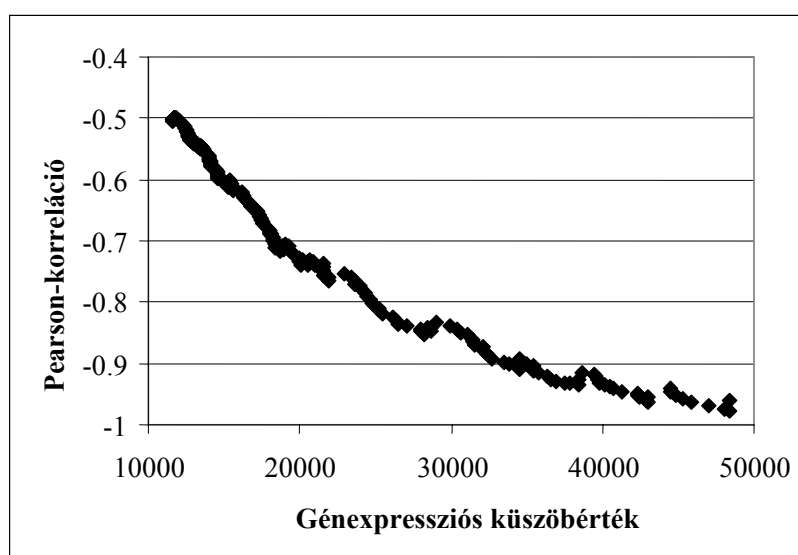
Nem találtam direkt korrelációt a szenz és antiszenz expresszió között, bár magas expressziós értékeknél (Affymetrix array-n 10 000 körüli) inverz korrelációt tapasztaltam a szenz és antiszenz expresszió között (9. ábra).



9. ábra: Az ábrákon a szenz és antiszenz expressziós szintek összehasonlítása látható az MGU75A 1 (antiszenz) és MGU75A 2 (szenz) chipen. Csak azokat a transzkriptumokat tüntettem fel, amelyeknek az expressziós szintje legalább az egyik irányban 5 000 feletti.

Minél magasabb volt a génexpressziós érték, annál szigorúbb korrelációt tapasztaltam. A legmagasabb relatív expressziós értékeknél (40 000 körül) a Pearson-korrelációs érték -1-hez közelített (10. ábra).

10. ábra: A szenz és antiszenz génexpresszió közti korreláció látható egy relatív génexpressziós küszöb felett. A mindenkori megadott küszöbérték felett a korreláció tükrözi az összes próba korrelációját. A küszöbértéket a magasabb expresszióra figyelemmel állítottam, tekintet nélkül arra, hogy a szenz vagy antiszenz transzkriptumot nézik-e. Magas expressziós értékeknél a Pearson-korreláció -1-hez közelített, ami erős inverz korrelációt bizonyít a szenz és antiszenz génexpresszió között.



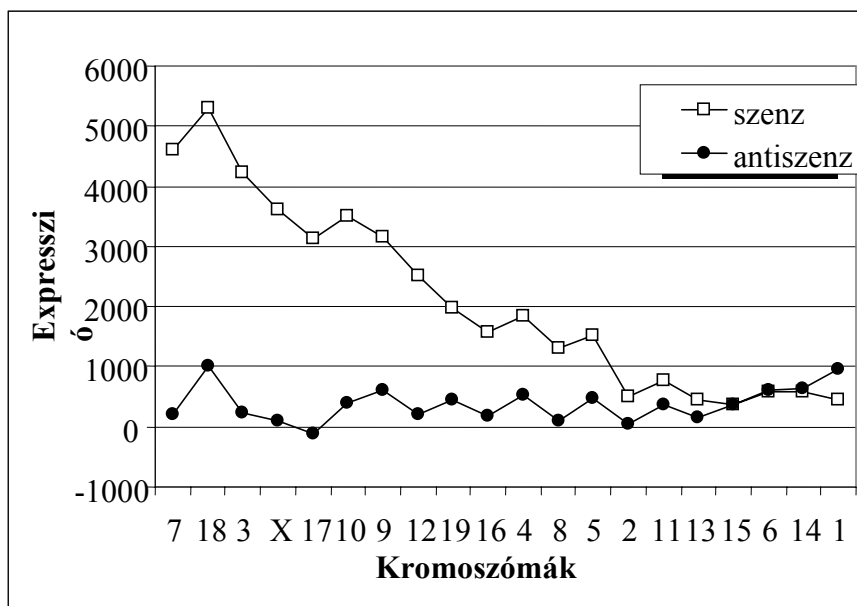
Wong és munkatársai által leírt kísérleti körülményeknek megfelelő valamennyi szenz-antiszenz expressziós arányt megvizsgáltam. Azokat a transzkriptumokat kiválasztottam, amelyeknél az inverz szenz-antiszenz arány valóban szignifikánsan magasabb volt. Így olyan transzkriptumokat találtam, amelyeknek megváltozott antiszenz expressziója az MHC tanulmánnyal összefüggésben volt. A megváltozott, kettőnél nagyobb szenz/antiszenz expressziós arányú transzkriptumokat az 6. táblázatban tüntettem fel.

6. táblázat: Változatos antiszenz reguláció Wong és mtsai tanulmányában. Azok a transzkriptumok láthatóak, amelyeknek expressziós arányának változása 2-nél nagyobb.

MHC v1 ID	MHC v2 ID	Jelölő kód	Gén titulus	Jelölés	Génfunktio	v1_CIITA	v2_CIITA	v1_WILD	v2_WILD
Kontroll (WILD) vs. CIITA-hiányos (CIITA)						v1_CIITA	v2_CIITA	v1_WILD	v2_WILD
103158_at	162471_i_at	AV071208	RIKEN cDNS 1110019N10 gén			7.4	115.55	270.90	33.90
Kontroll (WILD) vs. CII-hiányos (CII def.)						v1_CII def.	v2_CII def.	v1_WILD	v2_WILD
94013_at	160145_at	AI593999	RIKEN cDNS 1810010M01 gén		cukorkötés	1067.3	533.25	95.10	531.40
104081_at	160674_at	AI596094	transzferrin-receptor 2	Trfr2	proteolizis és peptidolizis, vasion-homeosztázis	1616.6	304.8	114.10	331.20
103785_at	160980_at	AI837288	RIKEN cDNS 2700097O09		metiltranszferáz-aktivitás	349.1	73.7	18.50	313.80
101273_f_at	161259_f_at	AV283483	szerinproteáz-inhibitor, clade A, tag 5	Serpina5	szerin-típusú endopeptidáz-gátló aktivitás	111.5	325.95	801.6	317.55
CII-hiányos (CII def.) vs. CIITA-hiányos (CIITA)						v1_CIITA	v2_CIITA	v1_CII def.	v2_CII def.
97625_s_at	161713_f_at	AV248803	prostaglandin-F-receptor	Ptgfr	G-proteinhez csatolt receptorprotein jelző út, rodopszinszerű receptor aktivitás, tromboxán-receptor aktivitás, prosztoglandinszintézis-reguláció, szignál transzdukció	496	129.85	119.4	288
99454_at	160861_s_at	AI385600	foszfodiészteráz-1A, kalmodulinfüggő	Pde1a	szignál transzdukció G-protein jelzés, 3',5'-ciklikus-nukleotid foszfodiészteráz aktivitás, kalmodulin-kötés	6.5	212.65	812.1	132.3
100786_at	161142_at	AV204395	RIKEN cDNS 4632417K18		koaguláció negatív regulációja	48.1	219.9	348.9	166.75

Feltérképeztem minden egyes transzkriptum kromoszomális elhelyezkedését, hogy megvizsgáljam a kromoszomális lokalizációt és relatív transzkripciót. Nagyobb relatív kromoszomális antiszenz expressziót találtam az 1. és 14. kromoszómán. A 6. és 15. kromoszómán a szenz és antiszenz transzkripció körülbelül azonos szintű volt. Minden más kromoszómán a szenz transzkripció felülmúlta az antiszenzét (11. ábra).

11. ábra: Különböző kromoszómák átlagos szenz és antiszenz expressziója. A kromoszómákat a szenz és antiszenz expresszió közti különbségek alapján soroltam be.



4.4 Az automata mérőrendszer és pozicionáló eljárás

4.4.1 A készülék működése

Találmányom tárgya olyan elektrokémiai és biokémiai mérésekhez alkalmazható automata mérőrendszer, amely minták tárolására alkalmas egy vagy több mintatartóval, a minták vizsgálatának helyéül szolgáló mérőfelülettel, mintabefogadó eszközzel, egy vagy több mérőeszközzel, valamint tárgy - a minta befogadó eszköz - befogására és mozgatására alkalmas tárgymozgató eszközzel rendelkezik (12. ábra).

A mérések során a készülékkel a következő lépéseket hajtom végre:

a) a kiválasztott program segítségével pipettát fogok be a tárgy befogására és mozgatására alkalmas tárgymozgató eszközbe;

b) a pipetta a mintatartóból egy vagy több mintát vesz fel, amelyeket a tárgymozgató eszköz segítségével mérőfelülethez szállít, és ott lehelyez;

c) a mérőfelületre helyezett mintán vagy mintákon elvégzem az adott reakciót, mérést. Az eljárás lényege, hogy az a) és b) lépés közt a pipettát a tárgymozgató eszköz segítségével egy pozicionáló egységhez mozgatom és automata program szerint pozicionálok.

A helyzetmeghatározó találmány pipettahegy pozicionálására szolgáló eljárás, valamint olyan pozicionáló egység, amellyel tárgy, így pipettahegy egy referenciatárgyhoz igazítható.

A feladatot a minta értelmében olyan pozicionáló egység által oldom meg, amely tárgymozgató eszközt és/vagy referenciatárgy-mozgató eszközt, képalkotó eszközt valamint egy vagy több tükörből álló tükörrendszert tartalmaz. A pozicionáló egység lényege, hogy az egy vagy több tükörnek van legalább két olyan érintősíkja, amelyek egymással tompa szöget zárnak be, a referenciatárgy az egy vagy több tükrök között és előtt van, a képalkotó eszköz pedig az egy vagy több tükör felé néz, azaz a referenciatárgytól fókusztávolságban áll.

A találmány tárgyát képezi olyan pozicionáló eljárás, amelynek során tárgyat pozicionálok egy referenciatárgyhoz képest. Az eljárás során kijelölök egymással tompaszöget bezáró érintősíkokkal rendelkező, egy vagy több tükörből álló tükörrendszer elé helyezett referenciatárgy környezetében egy pontot, és amennyiben szükséges, megadok egy elforgatási szöget,

a) a tárgymozgató eszköz segítségével a pozicionálandó tárgyat a kijelölt pontba mozgatja, és adott esetben a megadott szöggel elforgatja;

b) képalkotó eszközzel leképeződik a referenciatárgy és a pozicionálandó tárgy egy vagy több tükörről visszaverődő képe;

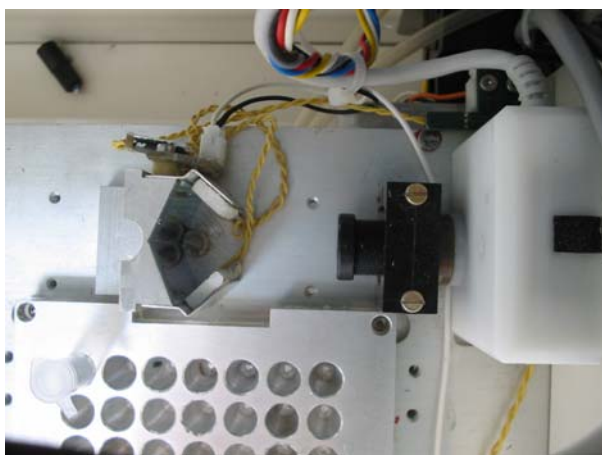
c) a program kiértékeli a képet, amelynek során meghatározza, hogy milyen irányba és mennyivel kell a tárgyat elmozdítani, adott esetben elforgatni, valamint kijelöli azt az új pontot, ahová a tárgyat mozgatni kell, és adott esetben megadja azt az új szöveget, amellyel a tárgyat el kell forgatni;

d) addig ismételi a program az a)-c) lépéseket, amíg a kiértékelés során azt nem kapja, hogy a tárgyat nem kell tovább mozgatni, illetve forgatni, ezt a pontot és helyzetet 0 pontnak tekinti a program, és amíg új pozicionálás nem történik, addig mindig ehhez a nullponthoz viszonyít a mérések során.

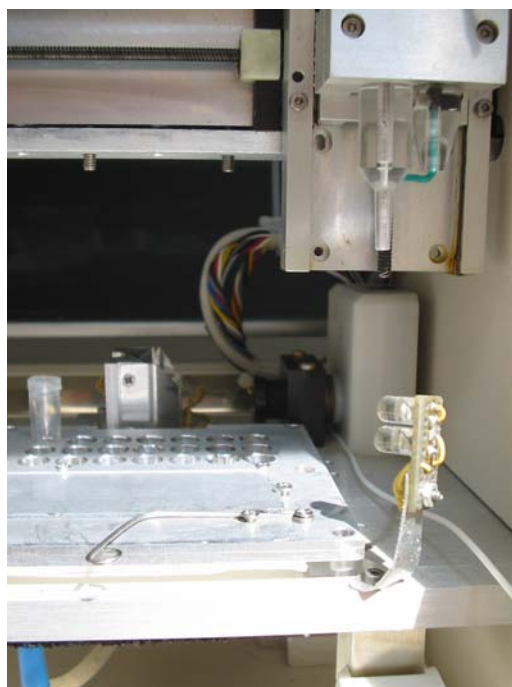
A.,



B.,



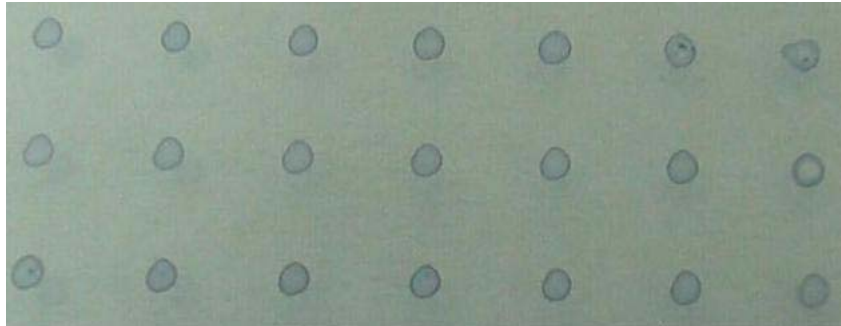
C.,



12. ábra: Automata mérőrendszer és pozicionáló egység kész, használati mintaoltalmat élvező kiviteli alakja. A., A készülék teljes konfigurációja és munkaterülete. B., A pozicionáló alegység felülnézeti képe. C., A tárgymozgató eszköz a síneken csúszó robotkar kiinduló pozíciójában (kép jobb felső része) és a hűtött-fűtött lemezke- és reagenstartó (háttérben a pozicionáló egység).

4.4.2 A pozicionáló automata pontossága

Számtalan tesztmérést végeztem el az automata mérőrendszer és a részét képező pozicionáló automata pontosságának ellenőrzésére. Ennek során metilénkék festékanyagot tartalmazó oldatokat cseppentettem fel megtisztított tárgylemezre. A színes oldat megkönnyítette a cseppek elhelyezkedéseinek egyszerű és pontos képfeldolgozását és elemzését. Az alább bemutatott méréssorozat során (13. ábra) 21 cseppet helyeztem el a tárgylemezen, egy sorba 7-7 cseppet kijelölve. A csepptávolságot 0,3 milliméterre állítottam be a csepptérfogat 0,1 μ l volt. A digitális képfeldolgozás során a cseppek pixelben mért távolsága 96-94 között változott, a műszer pontossága 99,183%-os volt. Ez a pozicionáló automata mérő-és cseppentő rendszer pontosságát bizonyítja.



13. ábra: Egy tesztcseppentés során készült tárgylemez digitális nagyított fényképe, a cseppek távolsága 0,3 mm, térfogata 0,1 μ l.

5 Megbeszélés

Ph.D. értekezésemben a transzkripció cisz és transz szabályozásával foglalkoztam. Transz szabályozás esetén egy adott gén olyan elemet kódol, amely a genomban valahol máshol fejt ki hatását. Cisz-szabályozás alatt olyan regulációs elemeket értünk, amelyek a genomon ugyanott (ugyanolyan szekvencián) hatnak, mint ahonnan képződnek. Vizsgálataim során egy olyan bonyolult problémát próbáltam modellezni, amikor magáról a szabályozó rendszerről és a proteinek szekvenciáinak ismeretéről kevés információnk van, miközben épp a szabályozó mechanizmusok kulcsát keressük. Az alábbiakban az eredmények tükrében először a transzkripció faktorokkal fogok foglalkozni.

5.1 *Transzkripció faktorok mint a génexpresszió kulcselemei*

Eukariótákban a proteinszintézis több szinten szabályozódik, amíg a DNS információja kész proteinben kifejeződik. Az első és legfontosabb lépés a transzkripcionális indítás, mivel egy további lépés sem jöhet létre elsődleges RNStranszkriptum hiányában. Azonos expressziós profillal rendelkező gének csoportját alapul véve az analízis logikus elgondolási alapja, hogy olyan szabályozási mechanizmust kell keresni, amely e gének egyidejű expressziójáért felelős. Alapfeltevésem, hogy adott kísérletben azonos expressziós profillal rendelkező gének szabályozásáért ugyanazon transzkripció faktorok lehetnek felelősek. Számptalan transzkripció faktor aktivitása környezetfüggő és más szomszédos szabályozó elemek által módosított. Ezért egyetlen transzkripció faktor bizonyos gének expresszióját indukálhatja, míg más génekét egyidejűleg gátolhatja.

E folyamatban releváns transzkripció faktorok megtalálásának fontos lépése a szabályozó elemek meghatározásának képessége, azaz kötőhelyeik megmutatása a DNS-en. Ezért először adott feltétel mellett együttszabályozott gének csoportját emeltem ki, majd minden egyes gén promóterrégióját, vagyis a transzkripció indító helyétől felfelé elhelyezkedő szekvenciaszakaszait meghatároztam és ezeken valamennyi lehetséges transzkripció faktor-kötőhelyet azonosítottam. Végezetül azokat a statisztikailag felül-reprezentált motívumokat kerestem ki e szekvenciahalmazban, amelyek potenciális regulációs elemek lehetnek.

5.1.1 Az E47 transzkripció faktor

Tanulmányomban egy kiemelt klinikai problémával, a doxorubicin-rezisztenciával foglalkoztam. Mivel a doxorubicin az egyik leggyakoribb rákellenes gyógyszer, amely ellen azonban a daganatok nagy részében rezisztencia alakul ki, ezért intenzív kutatás tárgya. A doxorubicin-rezisztenciával szembeni konszenzus génlista felállítása után ezen gének promóterszakaszain az E47 transzkripció faktor felülreprezentációját találtam.

Génszabályozó szekvenciák jelentik a megoldás kulcsát abban, hogyan is szabályozódnak a gének a programozott és környezeti jelek hatására. Globális transzkripció profil vizsgálatát lehetővé tevő technológiák segítenek a kutatónak az átfogó látásmódban olyan biológiai folyamatokat, utakat is megfontolásra kínálva fel, amelyek egyébként rejtve maradnának. Az általam feltételezett hipotézis ennek tükrében nem egy kizárólagos modell, amellyel valamennyi doxorubicin-rezisztenciával kapcsolatos mechanizmus vizsgálható és megmagyarázható, hanem egy figyelmet érdemlő lehetőség a számtalan befolyás között.

Az E47 (elérhetőségi szám: T00207, további nevei: TCF3, BCF-1, E2A.E47, E2A-E47, IEBP1 (patkány) és E2A), a bázikus transzkripció faktorok hélix-loop-hélix (HLH) csoportjába tartozik. Az E12 és az E47 ugyanazon gén (E2A) által kódolt fehérje, csak különböző hasítás révén jönnek létre (Sun és Baltimore, 1991). Az E47 és E12 amino-terminális része tartalmazza a leucin-cipzár strukturális motívumot és a transzkripcióaktiváló szekvenciát (Henthorn és mtsai 1990). Az E2A gén termékei B-sejtes, izom-, hasnyálmirigy-specifikus génextpresszióban játszanak szerepet (Lassar és mtsai 1991, Murre és mtsai 1991).

Az E47 két transz-aktivációs domént, leucin ismétlődést, bázikus területet és hélix-loop-hélix domént tartalmaz. Hélix-loop-hélix (HLH) proteinek a DNS-kötésért és dimerizációért felelős konzervatív strukturális motívumot tartalmazó fehérjék családjához tartoznak. Ezek a proteinek vagy homodimert alkotva önmagukkal, vagy heterodimert formálva más HLH proteinekkal kapcsolódnak. Fontos szerepet töltenek be a sejtnövekedés és -differenciálódás szabályozásában (Davis és mtsai 1990, Murre és mtsai 1989, Weintraub és mtsai 1991).

Az E47 közös DNS-kötő bázikus és dimerizációs doménje tartalmazza a HLH struktúrát. A bázikus egységben bekövetkező mutáció megakadályozza a DNS-kezelődést, a dimerizációt azonban nem. A dimerizáció előfeltétele a DNS-hez való kötődési képességnek. Az E47 dimer DNS-kötéséért a konzervatív arginin reziduumok felelősek, amelyek egy specifikus DNS-kötő motívumot képeznek. Valószínűleg az E47 polipeptidek

dimerizációja, majd kapcsolódása során e bázikus domének a DNS-kötő szekvenciával kerülnek közvetlen kapcsolatba, miközben felveszik az alfa-helikális konformációt (Voronova és Baltimore 1990).

Eredetileg az E2A transzkripció faktoránál vették észre, hogy amino-terminális doménje két konzervatív bokszot tartalmaz, ami nagyfokú homológiát mutat az E12, E47, E2-2, HEB transzkripció faktorokkal és valamennyi hélix-loop-hélix proteinnel. A két boksz együtt létfontosságú a transzkripcionális aktivitáshoz, ugyanis közösen képezik a loop-hélix (LH) aktivációs motívumot. A konzervatív szekvenciájú motívum sérülését B-sejtes akut limfoblasztos leukémiával kapcsolatba hozták. Pontmutációk kialakulása ezen a szakaszon ugyanis a transzkripció aktivitás drámai csökkenéséhez vezet. Az LH motívum a DNS-kötő proteinek első aktivációs motívuma, amely igen konzervatív emlős, gomba és *Drosophila* sejtekben is (Quong és mtsai 1993).

Az E47 képes teljes epiteliomezenhímális átalakulást és *in vitro* invazív tulajdonságokat beindítani az érzékeny epiteliális sejtvonalban. Az E47 invazív folyamatokban betöltött szerepe alig ismert, de bizonyított, hogy aktív szerepet játszik a tumornövekedésben az angiogenezis elősegítésén keresztül. A daganatban az E47 valószínűleg az érképződésért felelős gének aktivációját és/vagy az inhibitorok szintézisének gátlását okozza. Bizonyított, hogy más tumorok fejlődését elősegítő transzkripció faktorokkal (például Snail) együttműködik (Peinado és mtsai, 2004).

Az E proteinek antagonistái az Id2 és Id3 fehérjék. Az Id proteinek sejtnövekedést és -differentiációt szabályozó funkciója ismert, túlzott expressziójuk malignus folyamatok kialakításában bizonyított. Ha az Id proteinek antiszenz oligonukleotid blokádon keresztüli expresszióját gátolták, a humán adenokarcinóma sejtek proliferációja is gátlódott. Érvényre juttatva az E47 protein ektópiás expresszióját humán adenokarcinóma-sejtvonalban, az effektíven szekvesztrálta az endogén Id proteineket Id-HLH heterodimer formában, ami ezáltal a sejtnövekedés gátlásához vezetett. Összefoglalva elmondható, hogy az Id proteinek növekedett expressziója koloretális adenokarcinómákban hozzájárul a kontrollálatlan tumorsejt-proliferációhoz (James és mtsai 2001).

Sejttípus differenciálódását indukáló savas jellegű anyag hatására neuroblasztóma-sejtekben a TrBK neutrofil receptor és a p21(Cip1) ciklin-kináz-inhibitor emelkedett transzkripció szintjét tapasztalták. A promoterrégiók vizsgálata során azonos E-csoportbeli szekvenciákat találtak. Kísérletes bizonyítást nyert, hogy az E47 és E12 bázikus HLH proteinek növelik a TrBK, p21 (Cip1) expresszióját a promoterrégióikhoz kapcsolódva, és a mögöttes szakaszt aktiválva. Mivel az E47 direkt transzkripcionális kapcsolatot hoz létre a

sejtciklust gátló p21 (Cip1) és a TrkB receptor között, ezek a proteinek fontos szerepet játszhatnak a sejtciklus gátlásának koordinálási kulcseményeiben és a neuronális differenciációban (Liu és mtsai 2004).

Az E proteineknek kulcsszereppel bírnak a B- és T-limfociták differenciálódásának szabályozásában. Befolyásolják a helyettes és antigén receptor gének expresszióját, támogatják az immunglobulin- és T-sejt-receptor újrendeződést, valamint koordinálják a sejt túlélését és fejlődési proliferációját T-sejt receptor szignál hatására. Érdekes, hogy az E proteinek daganatszuppresszor tulajdonságai sokkal inkább a tumor növekedésére, mintsem a rezisztenciára specifikusak (Quong és mtsai, 2002).

Az E47 más transzkripciós faktorokkal is interakcióba lép, mint például az E12 (Elérhetőségi szám: T00204), Id2 (T01212), Myf-4 (T00520), Myf-5 (T00521), Myf-6 (T00522), MyoD (T00525), Tal-1 (T00790), Tal-1beta (T01448) és Tal-2 (T01630).

A doxorubicin célpontja a topoizomeráz II protein, amelynek promótere direkt célpontja az E2F transzkripciós faktornak. Az E2F bizonyítottan szerepet játszik a gyógyszerrezisztencia kialakulásában (Wang és mtsai, 1999). További más transzkripciós faktorokat, mint például az NF- κ B-t és az E2F-et szintén összefüggésbe hozták doxorubicin-rezisztenciával. A klinikumban általánosan használt rákellenes gyógyszerek és NF- κ B-t blokkoló vegyületek kombinációjának alkalmazásával sokkal eredményesebb daganatterápiát tudtak végrehajtani (Wang és mtsai 1999). BAY11-7082 irreverzibilisen gátolja a NF- κ B foszforilációját. E vegyülettel történő kezelés hatására nagyobb mértékű apoptózist tapasztaltak vincristin- és doxorubicin-rezisztens sejtvonalakban. Az NF- κ B-aktivitás elnyomása BAY11-7082 által sikeres lehet MDR leukémiákban (Jiao és mtsai 2005).

Vizsgálataim során a fent említett TFKH-k felülexpresszióját nem tapasztaltam. A kérdés, hogy a specifikus gének transzkripciójának változásait hogyan okozzák a transzkripciós faktorok: direkt génpromóter-kötődésükön keresztül, vagy indirekt módon más olyan transzkripciós faktorok szabályozásán át, amelyek majd direkt kapcsolódnak a specifikus gének promótereikhez, szabályozva azok átírását. Nyilvánvaló, hogy az ilyen típusú modellek felállítása igen komplex és nehéz feladat. Ezért a jövőben az *in silico* analízis eredményeit további experimentális bizonyítékok bevonásával ki kell szélesíteni.

Az általam vizsgált számítógépes alkalmazás nem terjedt ki a meghatározott transzkripciós faktor funkcionális hatásának vizsgálatára a génaktivációban. Funkcionális tanulmányok szükségesek a TF-DNS komplex interakció vizsgálatára, mint például az elektroforetikus mobilitás eltolódás vizsgálatok (EMSA) és a kromatin immunprecipitáció

(ChIP). Az EMSA elve, hogy a protein-DNS komplex lassabban vándorol, mint a szabad DNS-molekulák agaróz-gélelektroforézis során, miáltal szekvenciaspecifikus interakciókat lehet vizsgálni. A ChIP assay során a DNS-kötő proteinek (beleértve a transzkripciós faktorokat is) élő sejtben a kromatinállományhoz finom formaldehid fixációval keresztköthetők. Ha a proteinek kötődnek a kromatinhoz, az egész protein-DNS komplex immunprecipitálható a kérdéses proteinnel szembeni ellenanyagokkal. Az izolált protein-DNS frakció szétválasztható, a proteinek külön vizsgálhatóak, a proteinnel kapcsolatban álló DNS-szakaszok pedig PCR segítségével meghatározhatóak. Jövőben az E47 transzkripciós faktorról végzett funkcionális kapcsolódási vizsgálatok elvégzésével a faktor pontos funkciójára kaphatunk választ. A génexpresszió szabályozásának további lehetőségei az RNS-interferencia, a stabil transzfekció, és a szekvenálás, az E47 gén és E47 TFKH-ek lényeges mutációinak és polimorfizmusának meghatározására.

5.2 Az antiszenz transzkriptumok

5.2.1 Az antiszenz szabályozási funkciók

Vizsgálataim és az ismertetett adatok alapján a koexpresszió és inverz expresszió az egér antiszenz transzkriptumok gyakori és belső tulajdonsága. Fontos hangsúlyozni mindkét tanulmányom és korábbi elemzések közötti különbséget, ahol a szenz-antiszenz párokat határozták meg, míg e vizsgálatokban a teljes, általános antiszenz transzkripciót mértem. Ennek megfelelően a vizsgált géneknél nem direkt szenz-antiszenz párokat mutatok be. A vizsgálat kiterjesztésével az általános antiszenz expresszió egér génre nézve 43%-ra becsülhető.

Kiemelem, hogy csak a cisz-antiszenz transzkriptumokra fókuszáltam. Meg kell jegyezni, hogy a transz-antiszenz transzkriptumok bizonyos száma szintén jelen van a sejtekben. Például az miRNS-eket és a siRNS-eket a legtöbb modell organizmusban széles körben vizsgálták (Bartel 2004). Fontos megemlíteni, hogy a transz-antiszenz transzkriptumok Drosophilában a génkikapcsolás beindításáért, indukálásáért felelősek (Aravin és mtsai 2001). A teljes antiszenz transzkripció tehát még a fenti értéknél is magasabb lehet.

Inverz direkt korrelációt találtam a szenz és antiszenz expresszió között magas szenz és antiszenz értékeknél Wong és mtsai chip adatait vizsgálva. A legmagasabb relatív expressziós értékeknél (40 000 körül) a Pearson-korrelációs érték -1-hez közelített (3. ábra).

Az antiszenz transzkriptumok korábban javasolt szabályozó funkcióját támogatja ez az inverz antiszenz expresszió a magas expressziójú géneknél.

A korábban említett antiszenz tanulmányok 2/3-ban ismétlődő szekvenciákat vizsgáltak (Lehner és mtsai 2002). Vizsgálódásaimban ez a hiba elhanyagolható, mert az adatok az Affymetrix microarray rendszer 25-ös oligó próba-párjai alapján készültek, amelyben az ilyen anomáliák nem fordulhatnak elő.

Egy korábbi tanulmány kísérletesen igazolta a teljes genomra kiterjedő szenz-antiszenz párok jelenlétét *in silico* analízist követően (Kiyosawa és mtsai 2005). Szálspecifikus oligo-microarrayt alkalmaztak a szenz és antiszenz expresszió meghatározásakor különböző szövetekben. Kísérletsorozatukban 1947 szenz-antiszenz párt találtak. A szenz-antiszenz expressziós arány szövetenként is markánsan különbözött (Kiyosawa és mtsai 2005).

Kiválasztottam azon transzkriptumokat, amelyeknél az antiszenz expresszió tízszer nagyobb volt a kontrollgénekhez képest. Érdekes, hogy egy korábbi bioinformatikai tanulmány sem mutatott rá bármelyik génre, mint potenciális antiszenz partnerral bíró szekvenciára. A további funkcionális vizsgálatokat nehezíti az a tény, hogy ha egy kimutatott szenz-antiszenz pár cDNS-e izolálható is ugyanabból a szövetből, ez nem jelenti szükségszerűen azt, hogy ugyanabban a sejtben van jelen mindkét transzkriptum egyidejűleg. Egyetlen sejt RNS-ének RT-PCR-e, vagy RNS-FISH alkalmazására lenne szükség, hogy a párok egyidejű egy sejtben való jelenlétét igazolni lehessen.

5.2.2 Antiszenz expresszió és az MHC II

Forrás adataim egyik fele Wong és munkatársai által publikált cikkből származott. A tanulmányban a fő hisztokompatibilitási komplex II (MHC II.) transzaktivátorára (CIITA) fókuszáltak, amely egy „mester koaktivátora” az MHC géneknek. A CIITA új célpontjainak meghatározása érdekében cDNS microarray-kre hibridizálták a CIITA-deficiens, az MHC II-deficiens és kontrollcsoportban lévő egerek dentritikus sejtjeiből kivont nukleinsavat. Eredményeik alapján a plexin-A1 a T-sejt–dentritikus sejt interakciójában jelentős szerepet tölt be, de nincs kapcsolatban az antigénképzéssel és -kötéssel.

Analízisük során olyan maszkfájlt alkalmaztak, amellyel az MGU74A inverz szekvenciáit kiszűrték. Éppen ezért nem lehetséges eredményeik értékelése tanulmányom szemszögéből.

Az eredeti, nyers adathalmazt vizsgálva inverz szenz/antiszenz arányt is tapasztaltam a vizsgált/kontroll sejtvonalakban (6. táblázat). Négy ismert gén, a Trfr2, a Serpina5, a Ptgr és a Pde1a változtak meg a vad-versus MHC II. deficiens analízis során. Valamennyi gén a szignál transzdukcióban tölt be szerepet. Megjegyzendő, hogy ezek a transzkriptumok nincsenek kapcsolatban az MHC II. transzaktivátorral. További vizsgálatok szükségesek, hogy ezen gének antiszenz transzkripciójának szabályozó mechanizmusát kizárják vagy pontosítsák.

5.2.3 Antiszenz expresszió és a dystrophinhiány

Vizsgálataim másik felében a kapott adatok Porter és mtsai publikációjára épülnek. Ők génexpressziós mintázatokat mértek dystrophinhiányos (mdx) egerekben a különböző transzkripcionális rajzolatok megállapítására és összehasonlítására. 719 különbözőképpen expresszálódó transzkriptumot találtak, amely a lábizomzat dystrophinhiányával összefüggésben lehet és 56-ot, amely az extraokuláris izmokéval. Következtetések szerint a dystrophinhiány szükséges, de nem elegendő önmagában a fibrózis, a gyulladás és az izomregenerációs hibák létrehozásához, amelyek a dystrophinopátia jellemzői.

Adataimban 1182 transzkriptum szenz és antiszenz párjának expresszióját tudtam feldolgozni. A teljes vizsgálati adathalmazt figyelembe véve 43%-os antiszenz transzkripciót állapítottam meg a szenzhez viszonyítva.

Összehasonlítottam az mdx és a kontrollminták expresszióját. A szenz és antiszenz transzkripció széleskörű inverz korrelációját ebben az esetben nem találtam. Ennek oka lehet, hogy csak olyan génekre fókuszáltam, amelyeknek inverz antiszenz expressziója kettőnél nagyobb értéket vett fel (5. táblázat). A kiválasztott 9 gén közül kettő (TNNC2 és MYL4) az izom fejlődésének génjei. További kettő (SOCS3 és MAPK1) a szignál transzdukció folyamatában vesz részt. Korábbi tanulmány szerint caveolin-3 knock out egerekben a MAPK kaskád hiperaktivációja kapcsolatban áll a progresszív cardiomyopathiával (Woodman és mtsai, 2002). Az izomsejt caveolái úgy működnek, mint speciális membrán mikrodomének, amelyekben a dystrophin-glikoprotein komplex és a celluláris jelző molekulák visszamaradnak. További 3 gén kalciumion kötésével kapcsolatos (TNNC2, MYL4 és MMP2).

Porter és mtsai által publikált dystrophinhiány szemszögéből szignifikánsan szabályozódó génlistát ellenőriztem antiszenz expresszió szemszögéből. 747 különbözőképpen szabályozott gén közül 42 rendelkezett szignifikáns antiszenz expressziós

értékekkel. Ebben a listában két gén (IFITM3 és HBA-a1) rendelkezett a kontrollcsoporthoz képest tízszeres antiszenz transzkripció szinttel. Öt génnek (IFITM2, MYL4, 161948_f_at, FTL1 és COCS3) volt nagy az inverz szabályozó szintje, amelyek a dystrophin-hiánnyal kapcsolatban szignifikánsan változó expressziós szintet mutattak az eredeti vizsgálat során. A nagy antiszenz értékkel rendelkező transzkriptumok 1/3-ának biológiai funkciója egyelőre ismeretlen.

Összefoglalva az eredmények alapján azon gének nagyfokú antiszenz expresszióját tapasztaltam, amelyek korrelálhatnak a Duchenne muscularis dystrophia patogenezisében szerepet játszhatnak. Nyilvánvaló, hogy ezen kapcsoltság részben spekulatív, mivel az általam bemutatott gének korábbi tanulmányokban nem szerepeltek szenz-antiszenz párként.

5.2.4 Kromoszómák és az antiszenz transzkripció

Jelentős különbséget találtam a szenz és antiszenz expressziós arányokat vizsgálva az egyes kromoszómák között Porter és mtsai adatait tanulmányozva. A legkisebb antiszenz expressziós szintet a 9. és 17. kromoszómán, a legnagyobbat az 1. és 13. kromoszómán fedeztem fel. Érdekes, hogy bár az 1. kromoszóma a legnagyobb, rajta tapasztaltam a legnagyobb relatív antiszenz expressziót. A jelentős eloszlásbeli különbségek a kromoszómákon belül nem magyarázhatóak a magas antiszenz transzkriptumok megemelkedett expressziójával a szenzhez képest, mint ahogy ezeknek a transzkriptumok eloszlása a kromoszómák között egyenletes (7. ábra).

Mindkét (Porter és Wong) expressziós adataimat vizsgálva megerősítem azt a korábbi leletet, miszerint az X kromoszómán kicsi az antiszenz transzkripció szintje (Kiyosawa és mtsai 2003). Wong és mtsai méréseire támaszkodó tanulmányomban is az X és 17. kromoszómán volt legkisebb az antiszenz/szenz expressziós arány. Az Xist RNS (megfelelő DNS-szakasza az X kromoszómán helyezkedik el) kritikus komponense az X kromoszóma inaktivációjának, a Tsix pedig a nem kódoló antiszenz RNS-e az Xist génnek. Az egérben szerzett adatok igazolják, hogy a Tsix segíti a Xist expresszió szabályozását (Brown és Chow 2003). Mindez támogatja a lehetőségét, hogy az antiszenz transzkripciónak az X kromoszóma inaktivációjában szerepe van (Kiyosawa és mtsai 2003; Li és mtsai 1999).

Genomikai bevésődés, amelyben a szülői jellemvonások meghatározzák, hogy az embrió melyik autoszómális allélje fog kifejeződni, szintén kapcsolatban van az antiszenz RNS-ekkel (Lee 2003). Kromoszóma-specifikus rajzolatot vizsgáló adataim aláhúzzák a szenz-antiszenz arányok potenciális szerepét az allélkifejeződés folyamatában.

Mindemellett ezek a különbségek óvatosan kezelendők, mivel csak mintegy 401 transzkriptum kromoszómális lokalizációját sikerült megtalálni. Ennek oka, hogy bár az egész egér genom térképezése befejeződött, kromoszómánként csak körülbelül 20 Affymetrix transzkriptum annotált.

A jövőben teljes genomra kiterjedő antiszenz DNS array-jel lehet majd a pontos antiszenz expressziós értékeket és rajzolatokat meghatározni. Ezáltal válhat vizsgálhatóvá a lehetséges funkcionális mechanizmusok és az antiszenz transzkriptumok potenciális szerepe.

5.3 *Találmányok a DNS-chip fejlesztésben*

Fejlesztési célom egy diagnosztikai expressziós DNS chip-rendszer létrehozása, amelynek a következő feltételeknek kell eleget tenni: szükséges a megfelelő releváns szekvenciák kiválasztása, a megfelelő hordozó felület (chip) létrehozása, az oligonukleotidok felhelyezési módjának és eszközeinek megtervezése és megalkotása valamint a megfelelő hibridizációs eredmények leolvasása, kiértékelése.

A megfelelő hordozó kiválasztását a leolvasó rendszerek határozzák meg, mivel azok befogadó kapacitása csak leszűkített mérettartományokat enged meg. Ma ezért legelterjedtebbek a tárgylemez méretű hordozók, amelyeken kialakított vékonyrétegbe kötik az oligonukleotidokat. Az immobilizáció leggyakrabban vagy valamilyen polimer rétegbe történik (polipirrol, poli-l-lizin) vagy valamilyen direkt hordozó felület-oligonukleotid kötés létrehozásán át valósul meg (tiol-csoportokon keresztül arany felületre, vagy szilanizált felületekhez történő direkt oligo-kötés). Elektromosan vezető hordozót alakítanak ki azoknál a chipeknél, ahol a későbbi reakciók elektrokémiai környezetben zajlanak. A megfelelő hordozó és oligonukleotid megválasztását követően bio-robot szükséges az array létrehozásához. A diagnosztikai chipeken pár száz oligonukleotid felhelyezése történik. A felcseppentett mennyiségek tized mikroliteres mennyiségeket jelentenek és a cseppek távolága a mikrométeres tartományba esik. A folyadékcseppek felhelyezése vagy aktív módon egy kis elektromos pumpa segítségével történik, vagy passzív módon, a kapilláris elv alapján a hordozó felülethez érintett cseppentő hegyről leváló folyadék adag jelenti az oligo-spottot.

Az oligonukleotidok hordozó felületre történő elhelyezését automata pipettázó berendezéssel oldom meg. Az általam fejlesztett pipettázó automata képes a reakciókomponensek egyedi sorrendben történő összeállítására a tárgylemez méretű hordozóra való felcseppentésre. A feladat komplexitásából adódóan csak akkor lehet több

reakciót egy helyben elvégezni, ha a reakciókhoz szükséges reagensek helyben tárolhatóak és azok szabadon összeállíthatóak. A technológiai megoldás alapját az az elgondolás adta, hogy a folyadékcseppecskék lehelyezéséhez használatos eszközt és a későbbi reakciókat is egyféle eszközzel, a chip mozgatása nélkül hajtsuk végre ugyanazon a helyen. Ehhez megoldást a kereskedelmi forgalomban kapható 0,1-20 μ l-es pipettahegyek alkalmazása jelentette. Az egyszerhasználatos pipettahegy mind az oligonukleotidok lehelyezésére, mind a későbbi reakcióelegyek összeállítására alkalmas.

A mikropipetták azonban nem teljesen egyformák, és a pontosság megtartása érdekében csúcsuk koordinátáit minden esetben meg kell határozni. A pipettázó automatákban ezidáig alkalmazott többszörhasználatos eszközök egyedileg kialakított helyzetének ismerete jelentette a kiinduló pontot. Az általam fejlesztett automatát pont ellenkezőleg terveztem: egyszerhasználatos eszközök ismeretlen pozíciójának pontos megállapítása a kulcs a többféle reakció elvégzéséhez. Ehhez egy megfelelően pozicionáló robot alegységet hoztam létre az automatán belül, ami képes valamennyi felvett pipettahegy pozíciójának pontos meghatározására. A pozicionálás számtalan módon történhet, de a hegyek tisztaságát szem előtt kell tartani, ezért olyan jellegű megoldásra törekedtem, amivel a probléma érintésmentesen megoldható. A tárgy helyzetének meghatározása a síktükrök által képzett képének referenciacsúcsához viszonyított távolságának digitális képfeldolgozás eszközével történő meghatározása alapján történik.

Összefoglalva elmondható, hogy az eszközzel a pozicionált pipettahegy által a hordozó felületre az oligonukleotidok lehelyezhetőek, a zárt rendszerű robotban a kívánt program szerint választott hőmérsékleten inkubálhatóak, majd az immobilizációhoz kapcsolódó folyadékfázisú reakciók helyben, kívánt sorrendben és módon elvégezhetőek. A rendszer kialakítása lehetővé teszi, hogy a kész chipen a kívánt minta hibridizációja és az azt követő mosási reakciók (amennyiben nem extrém hőmérsékleti tartományokat kell biztosítani) is elvégezhetőek legyenek. Végül a kész hibridizált chipek a legtöbb leolvasó rendszerben kiértékelhetőek.

6 Összefoglalás

6.1 *A génexpresszió transz szabályzó elemeinek vizsgálata*

Azonos expressziós profillal rendelkező gének kialakulása mögött olyan szabályozási mechanizmust kell keresni, ami e gének egyidejű expressziójáért felelős. Alapfeltevésem, hogy adott kísérletben azonos expressziós profillal rendelkező gének szabályozásáért ugyanazon transzkripciós faktorok lehetnek felelősek. E folyamatban releváns transzkripciós faktorok megtalálásának fontos lépése a szabályozó elemek meghatározásának képessége, azaz kötőhelyeik megmutatása a DNS-en. A folyamatot egy klinikai problémán, a rák kemoterápia során alkalmazott doxorubicin-kezeléssel szemben kialakuló rezisztencia során vizsgáltam.

Elsőként meghatároztam a doxorubicin-rezisztenciával kapcsolatba hozható konszenzus gének listáját. Ennek során három olyan korábbi közleményt dolgoztam fel, ahol valamennyi gén expresszióját vizsgálták, és a doxorubicin-rezisztenciával kapcsolatba hozható génexpressziós mintázatot közöltek. Összesen 52 olyan gént mutattam ki ezen tanulmányok elemzése során, amelyek a rezisztencia kialakulásáért jellemző elváltozásokért adódóan felelőssé tehetők.

Ezen gének közül 45 promóter-szekvenciáját tudtam genomikus adatbázisokból kinyerni. Ezeket a szekvenciákat vizsgálva az E47 transzkripciós faktor felülreprezentációját találtam. Az E47 transzkripciós faktor a doxorubicin-rezisztencia kialakulásának háttérében álló szabályozó rendszer kulcsfontosságú eleme lehet.

Kutatásaim során rámutattam, hogy a kimutatott transzkripciós faktor és a gyógyszerrezisztencia között összefüggés feltételezhető. Eredményeim új fényt vetnek az E47-re, nem csak a sejtproliferációban játszik szerepet, mint ahogy korábban gondolták. Ennek értelmében az E47 a daganatellenes terápia egy új célpontja lehet a doxorubicin-rezisztencia legyőzésében.

6.2 *A génexpresszió cisz szabályozásának vizsgálata*

Egyre inkább nyilvánvaló, hogy az emberi és más eukarióta genomban széles körű az antiszenz transzkripció. Az utóbbi évek eredményei alapján egyértelmű, hogy bizonyos emberi betegségek kialakulásában az antiszenz transzkripció kulcsszerepet tölt be. Bár a szenz-antiszenz párokat alaposabban tanulmányozták, az ismert gének antiszenz expressziójáról keveset tudunk.

Kutatásaim során megvizsgáltam és összehasonlítottam a szenz és antiszenz expressziót két tanulmányban 1182 egér transzkriptumot vizsgálva, hogy megállapítsam az antiszenz transzkripció gyakoriságát, és hogy találjak az antiszenz transzkripcióra jellemző rajzolatot. Első vizsgálatomban 20 darab Affymetrix MGU74A egyes verziójú chipet vettem össze 12 MGU74A kettes verziójú chippel. Második kísérletemben három Affymetrix MGU74A egyes verziójú egérgenom chipet 6 MGU74A kettes verziójú chippel állítottam szembe. Az eredeti adatokat a GEO adatbázisból töltöttem le. Mivel az Affymetrix adatok szemikvantitatívek, a szenz és antiszenz partnerek relatív értékeit elemeztem. Azonos gyakoriságú, de kisebbszintű antiszenz transzkripciót találtam a szenz transzkripcióhoz viszonyítva mindkét vizsgálatomban. Vizsgálataim szerint az antiszenz koexpresszió és inverz expresszió az egér genom általános tulajdonsága. Eredményeim alapján valamennyi egér génre nézve az általános antiszenz expresszió 43%-ra becsülhető.

Második elemzésemben direkt inverz korrelációt találtam a szenz és antiszenz expressziós értékek között nagy expressziós értékeknél. Ez esetben igen nagy relatív értékeknél (40 000 körül) a Pearson-korrelációs koefficiens -1-hez közelített. Magas inverz expressziós aránnyal rendelkező transzkriptumok korreláltak az eredetileg vizsgált MHC II. transzaktivátor génekkel. Eredményeim tehát az antiszenz transzkripció inverzítéséből adódó szabályozási funkcióit támasztják alá.

A szenz-antiszenz transzkripció arány a különböző kromoszómákon változó mértéket mutatott mindkét vizsgálatban. Az 1. és 14. kromoszómán az antiszenz expresszió magasabb, mint a szenz, míg az X kromoszómán korábbi vizsgálatokkal egybevágó igen alacsony antiszenz transzkripciót találtam. Kromoszómaspecifikus rajzolatot vizsgáló adataim aláhúzzák a szenz-antiszenz arányok potenciális szerepét az allélkifejeződés folyamatában.

6.3 *Oligo spottoló technológia fejlesztése*

Ezidáig nem állt rendelkezésre olyan eszköz, amellyel tetszőleges sík felületekre különböző folyadékcseppeket el lehetett volna helyezni. DNS-chipek készítésének kulcsfontosságú eleme a microarray-en rögzített oligonukleotidok lehelyezése megfelelő sorrend és program szerint, majd a megfelelő hibridizációs reakciók összehangolt végrehajtása. A vizsgálatok nagy érzékenysége miatt elengedhetetlen a vegyületek sérülésének megakadályozása mellett, hogy a chipkészítés zárt, akár steril körülmények között mehessen végbe.

Fejlesztésem során egy olyan automata pipettázó mérőrendszert hoztam létre, amellyel olcsón és egyszerűen lehet tetszőleges felületre pipettázni, illetve egy ilyen felületen elektrokémiai és molekuláris méréseket végrehajtani. Az automata mérőrendszer alkalmas molekulárbiológiai reakciók és mérések összekészítésére és elvégzésére, miközben az alapanyagokat, reagenseket és a vizsgálat tárgyát képező eszközöket kívánt hőmérsékleten és zárt térben tárolja. A műszer alkalmas felületi réteg növesztésre, kis mennyiségű mérgező reakciókomponensek vizsgálatára, fluoreszcens mérésekre, vagy fényérzékeny komponenseket igénylő elektrokémiai vagy biokémiai reakciókkal kapcsolatos mérésekre, vizsgáló eszközök, DNS-microarray-ek készítésére.

A DNS-microarray készítése során a megfelelően előkezelt tárgylemez méretű szilícium dioxid lapkát helyezem az automata mérőrendszer lemezke tartójára, majd a hűtött oligonukleotid próbákat a pipettázó egységek alkalmazásával megfelelő pozícióban lehelyezem. A mérőrendszer méreténél fogva valamennyi felszereltségével steril elszívó kamrába helyezhető, így a chip készítése és a mérések pormentes, steril körülmények között végrehajthatóak. A zárt rendszernek és automata munkafolyamatoknak köszönhetően a kész chipet további felhasználásra készen lehet a mérőrendszerből kivenni.

Az automata pipettázó készülék tetszőlegesen programozható, a folyékony reakciókomponensek 0,1-20 μ l-s tartományban munkalapján tetszőleges helyre és sorrendben 0,1 μ m pontossággal lehelyezhetőek.

Az általam fejlesztett rendszer eldobható, kereskedelmi forgalomban olcsón és könnyen beszerezhető pipettahegyeket használ. Nyilván a fent említett pontosság csak akkor érhető el, ha valamennyi pipetta helyzetét egyedileg, 0,1 μ m pontossággal meg tudom határozni a háromdimenziós térben. Az eldobható pipettahegyek pozicionálásának azt a módját választottam, amelynél a pipettahegyeket egy ismert, általam origó koordinátájú pontnak

kitűzött referenciacsúcshoz szállítom és ahhoz számítógép-vezérelt képfeldolgozási rendszerrel viszonyítom. Innen kiindulva az eldobható pipettahegy számítógép-vezérelt robotkarral már bárhova nagy pontossággal mozgatható. E második találmányomban olyan pozicionáló egységet hoztam létre, amelynek segítségével nagy pontossággal lehet tárgyak, a konkrét fejlesztési feladatban a pipettahegyek relatív és abszolút helyzetét meghatározni. A pozicionáló egységben a tárgy és a referenciatárgy egymáshoz képesti mozgása a kulcsfontosságú. Találmányomban a tárgymozgató eszköz mindhárom irányban (vagyis x, y és z tengelyek mentén) képes elmozdulni, miközben a referenciatárgy helyzete rögzített.

Az automata mérőrendszer komplexitásának köszönhetően az itt felsoroltakon kívül számos más mérés végrehajtására is alkalmas. Opcionálisan további mérőeszközök vagy -rendszerek építhetők bele, amelyek révén specifikus mérési feladatok is tervezhetők.

Irodalomjegyzék

Aerts S, Thijs G, Coessens B, Staes M, Moreau Y, De Moor B. (2003) Toucan: deciphering the cis-regulatory logic of coregulated genes. *Nucleic Acids Res*, 31: 1753-1764.

Aravin AA, Naumova NM, Tulin AV, Vagin VV, Rozovsky YM, Gvozdev VA. (2001) Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. *Curr Biol*, 11: 1017-1027.

Bartel DP. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116: 281-297.

Bass BL. (2000) Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell*, 101: 235-238.

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409: 363–366.

Billy E, Brondani V, Zhang H, Muller U, Filipowicz W. (2001) Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 14428-14433.

Boodhoo A, Wong AM, Williamson D, Voon D, Lee S, Allcock RJ, Price P. (2004) A promoter polymorphism in the central MHC gene, *IKBL*, influences the binding of transcription factors *USF1* and *E47* on disease-associated haplotypes. *Gene Expr*, 12: 1-11.

Brown CJ, Chow JC. (2003) Beyond sense: the role of antisense RNA in controlling *Xist* expression. *Semin Cell Dev Biol*, 14: 341-347.

Carmichael GG. (2003) Antisense starts making more sense. *Nat Biotechnol*, 21: 371-372.

Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A, Hilsenbeck SG, Gutierrez MC, Elledge R, Mohsin S, Osborne CK, Chamness GC, Allred DC, O'Connell P. (2003) Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer. *Lancet*, 362: 362-369.

Chang Y, Spicer DB, Sonenshein GE. (1991) Effects of IL-3 on promoter usage, attenuation and antisense transcription of the *c-myc* oncogene in the IL-3-dependent Ba/F3 early pre-B cell line. *Oncogene*, 6: 1979-1982.

Chen J, Sun M, Hurst LD, Carmichael GG, Rowley JD. (2005) Human antisense genes have unusually short introns: evidence for selection for rapid transcription. *Trends Genet*, 21: 203-207.

Chen J, Sun M, Hurst LD, Carmichael GG, Rowley JD. (2005) Genome-wide analysis of coordinate expression and evolution of human cis-encoded sense-antisense transcripts. *Trends Genet*, 21: 326-329.

Chen J, Sun M, Kent WJ, Huang X, Xie H, Wang W, Zhou G, Shi RZ, Rowley JD. (2004) Over 20% of human transcripts might form sense-antisense pairs. *Nucleic Acids Res*, 32: 4812-4820.

Conrad C, Vianna C, Freeman M, Davies P. (2002) A polymorphic gene nested within an intron of the tau gene: implications for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 7751-7756.

Davis RL, Cheng PF, Lassar AB, Weintraub H. (1990) The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. *Cell*, 60: 733-746.

Enerly E, Sheng Z, Li KB. (2005) Natural antisense as potential regulator of alternative initiation, splicing and termination. *In Silico Biol*, 5: 367-77.

Engels BM., Hutvagner G. (2006) Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. *Oncogene*, 25: 6163–6169.

Faghihi MA, Wahlestedt C. (2006) RNA interference is not involved in natural antisense mediated regulation of gene expression in mammals. *Genome Biol*, 7: R38.

Farrell CM, Lukens LN. (1995) Naturally occurring antisense transcripts are present in chick embryo chondrocytes simultaneously with the down-regulation of the alpha 1 (I) collagen gene. *J Biol Chem*, 270: 3400-3408.

Fisher TC, Milner AE, Gregory CD, Jackman AL, Aherne GW, Hartley JA, Dive C, Hickman JA. (1993) bcl-2 modulation of apoptosis induced by anticancer drugs: resistance to thymidylate stress is independent of classical resistance pathways. *Cancer Res*, 53: 3321-3326.

Friedman AD. (2002) Transcriptional regulation of granulocyte and monocyte development. *Oncogene*, 21: 3377-3390

García MG, Alaniz L, Lopes EC, Blanco G, Hajos SE, Alvarez E. (2005) Inhibition of NF-kappaB activity by BAY 11-7082 increases apoptosis in multidrug resistant leukemic T-cell lines. *Leuk Res*, 29: 1425-1434.

Gerwitz DA. (1999) A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and Doxorubicin. *Biochem Pharm*, 57: 727-741.

Györfy B, Serra V, Jürchott K, Abdul-Ghani R, Garber M, Stein U, Petersen I, Lage H, Dietel M, Schäfer R. (2005) Prediction of Doxorubicin Sensitivity in Breast Tumors Based on Gene Expression Profiles of Drug Resistant Cell Lines Correlates with Patient Survival. *Oncogene*, 24: 7542-7551.

Györfy B, Surowiak P, Kiesslich O, Denkert C, Schäfer R, Dietel M, Lage H. (2006) Gene expression profiling of 30 cancer cell lines predicts resistance towards 11 anticancer drugs at clinically achieved concentrations. *Int J Cancer*, 118: 1699-1712.

Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404: 293–296.

Hardy K, Mansfield L, Mackay A, Benvenuti S, Ismail S, Arora P, O'Hare MJ, Jat PS. (2005) Transcriptional networks and cellular senescence in human mammary fibroblasts. *Mol Biol Cell*, 16: 943-953.

Heinemeyer T, Wingender E, Reuter I, Hermjakob H, Kel AE, Kel OV, Ignatieva EV, Ananko EA, Podkolodnaya OA, Kolpakov FA, Podkolodny NL, Kolchanov NA. (1998) Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Res*, 26: 362-367.

Henthorn P, Kiledjian M, és Kadesch T. (1990) Two distinct transcription factors that bind the immunoglobulin enhancer μ E5/ κ E2 motif. *Science*, 247: 467-470

Hildebrandt M, Nellen W. (1992) Differential antisense transcription from the *Dictyostelium* EB4 gene locus: implications on antisense-mediated regulation of mRNA stability. *Cell*, 69: 197-204.

Hofmann WK, de Vos S, Elashoff D, Gschaidmeier H, Hoelzer D, Koeffler HP, Ottmann OG. (2002) Relation between resistance of Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia to the tyrosine kinase inhibitor STI571 and gene-expression profiles: a gene-expression study. *Lancet*, 359: 481-486.

Holleman A, Cheok MH, den Boer ML, Yang W, Veerman AJ, Kazemier KM, Pei D, Cheng C, Pui CH, Relling MV, Janka-Schaub GE, Pieters R, Evans WE. (2004) Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. *N Engl J Med*, 351: 533-542.

Hsieh-Li HM, Witte DP, Weinstein M, Branford W, Li H, Small K, Potter SS. (1995) Hoxa 11 structure, extensive antisense transcription, and function in male and female fertility. *Development*, 121: 1373-1385.

Jiao W, Lin HM, Timmons J, Nagaich AK, Ng SW, Misteli T, Rane SG. (2005) E2F-dependent repression of topoisomerase II regulates heterochromatin formation and apoptosis in cells with melanoma-prone mutation. *Cancer Res*, 65: 4067-4077.

Kampa D, Cheng J, Kapranov P, Yamanaka M, Brubaker S, Cawley S, Drenkow J, Piccolboni A, Bekiranov S, Helt G, Tammana H, Gingeras TR. (2004) Novel RNAs identified from an in-depth analysis of the transcriptome of human chromosomes 21 and 22. *Genome Res*, 14: 331-342.

Kampa D, Cheng J, Kapranov P, Yamanaka M, Brubaker S, Cawley S, Drenkow J, Piccolboni A, Bekiranov S, Helt G, Tammana H, Gingeras TR. (2004) Identification of genes with differential expression in acquired drug-resistant gastric cancer cells using high-density oligonucleotide microarrays. *Clin Cancer Res*, 10: 272-284.

Karanam S, Moreno CS. (2004) CONFAC: automated application of comparative genomic promoter analysis to DNA microarray datasets. *Nucleic Acids Res*, 32: 475-484.

Katayama S, Tomaru Y, Kasukawa T, Waki K, Nakanishi M, Nakamura M, Nishida H, Yap CC, Suzuki M, Kawai J, Suzuki H, Carninci P, Hayashizaki Y, Wells C, Frith M, Ravasi T, Pang KC, Hallinan J, Mattick J, Hume DA, Lipovich L, Batalov S, Engstrom PG, Mizuno Y, Faghihi MA, Sandelin A, Chalk AM, Mottagui-Tabar S, Liang Z, Lenhard B, Wahlestedt C; RIKEN Genome Exploration Research Group; Genome Science Group (Genome Network Project Core Group); FANTOM Consortium. (2005) Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science*, 309: 1564-1566.

Kiyosawa H, Mise N, Iwase S, Hayashizaki Y, Abe K. (2005) Disclosing hidden transcripts: mouse natural sense-antisense transcripts tend to be poly(A) negative and nuclear localized. *Genome Res*, 15: 463-474.

Kiyosawa H, Yamanaka I, Osato N, Kondo S, Hayashizaki Y; RIKEN GER Group; GSL Members. (2003) Antisense transcripts with FANTOM2 clone set and their implications for gene regulation. *Genome Res*, 13: 1324-1334.

Kudoh K, Ramanna M, Ravatn R, Elkahloun AG, Bittner ML, Meltzer PS, Trent JM, Dalton WS, Chin KV. (2000) Monitoring the expression profiles of doxorubicin-induced and doxorubicin-resistant cancer cells by cDNA microarray. *Cancer Res*, 60: 4161-4166.

Kumar M, Carmichael GG. (1997) Nuclear antisense RNA induces extensive adenosine modifications and nuclear retention of target transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 3542-3547.

Labrador M, Mongelard F, Plata-Rengifo P, Baxter EM, Corces VG, Gerasimova TI. (2001) Protein encoding by both DNA strands. *Nature*, 409: 1000.

Lassar AB, Davis RL, Wright WE, Kadesch T, Murre C, Voronova A, Baltimore D, Weintraub H. (1991) Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell*, 66: 305-315.

Lavorgna G, Dahary D, Lehner B, Sorek R, Sanderson CM, Casari G. (2004) In search of antisense. *Trends Biochem Sci*, 29: 88-94.

Lee JT. (2003) Molecular links between X-inactivation and autosomal imprinting: X-inactivation as a driving force for the evolution of imprinting? *Curr Biol*, 13: 242-254.

Lee JT, Davidow LS, Warshawsky D. (1999) Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. *Nat Genet*, 21: 400-404.

Lee JM, Zhang S, Saha S, Santa Anna S, Jiang C, Perkins J. (2001) RNA Expression Analysis Using an Antisense *Bacillus subtilis* Genome Array. *J Bacteriol*, 183: 7371-7380.

Lefstin JA, Yamamoto KR. (1998) Allosteric effects of DNA on transcriptional regulators. *Nature*, 392: 885-888.

Lehner B, Williams G, Campbell RD, Sanderson CM. (2002) Antisense transcripts in the human genome. *Trends Genet*, 18: 63-65.

Levinson B, Kenwick S, Gamel P, Fisher K, Gitschier J. (1992) Evidence for a third transcript from the human factor VIII gene. *Genomics*, 14: 585-589.

Li AW, Murphy PR. (2000) Expression of alternatively spliced FGF-2 antisense RNA transcripts in the central nervous system: regulation of FGF-2 mRNA translation. *Mol Cell Endocrinol*, 170: 233-242.

Lipman DJ. (1997) Making (anti)sense of non-coding sequence conservation. *Nucleic Acids Res*, 25: 3580-3583.

Liu Y, Encinas M, Comella JX, Aldea M, Gallego C. (2004) Basic helix-loop-helix proteins bind to TrkB and p21 (Cip1) promoters linking differentiation and cell cycle arrest in neuroblastoma cells. *Mol Cell Biol*, 24: 2662-2672.

Malik KT, Wallace JI, Ivins SM, Brown KW. (1995) Identification of an antisense WT1 promoter in intron 1: implications for WT1 gene regulation. *Oncogene*, 11: 1589-1595.

Marinescu VD, Kohane IS, Riva A. (2005) The MAPPER database: a multi-genome catalog of putative transcription factor binding sites. *Nucleic Acids Res*, 33: D91-97.

Matsumoto G, Namekawa J, Muta M, Nakamura T, Bando H, Tohyama K, Toi M, Umezawa K. (2005) Targeting of nuclear factor kappaB Pathways by dehydroxymethyl-epoxyquinomicin, a novel inhibitor of breast carcinomas: antitumor and antiangiogenic potential in vivo. *Clin Cancer Res*, 11: 1287-1293.

McKenna NJ, O'Malley BW. (2002) Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell*, 108: 465-474.

McNally JG, Müller WG, Walker D, Wolford R, Hager GL. (2000) The glucocorticoid receptor: rapid exchange with regulatory sites in living cells. *Science*, 287: 1262-1265.

Moore T, Constancia M, Zubair M, Bailleul B, Feil R, Sasaki H, Reik W. (1997) Multiple imprinted sense and antisense transcripts, differential methylation and tandem repeats in a putative imprinting control region upstream of mouse *Igf2*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 12509-12514.

Munroe SH, Lazar MA. (1991) Inhibition of c-erbA mRNA splicing by a naturally occurring antisense RNA. *J Biol Chem*, 266: 22083-22086.

Murre C, McCaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Jan YN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB, et al. (1989) Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell*, 58: 537-544.

Murre C, Schonleber P, McCaw PS, Baltimore D. (1989) A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell*, 56: 777-783.

Murre C, Voronova A, Baltimore D. (1991) B-cell- and myocyte-specific E2-box-binding factors contain E12/E47-like subunits. *Mol Cell Biol*, 11: 1156–1160.

Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE. (2002) Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell*, 108: 475-487.

Neeman Y, Dahary D, Levanon EY, Sorek R, Eisenberg E. (2005) Is there any sense in antisense editing? *TRENDS in Genetics*, 21: 544-547.

Nick J, Proudfoot, Furger A, Michael J. (2002) Dye Integrating mRNA Processing with Transcription. *Cell*, 108: 501-512.

Ogata K, Sato K, Tahirov TH. (2003) Eukaryotic transcriptional regulatory complexes: cooperativity from near and afar. *Curr Opin Struct Biol*, 13: 40-48.

Orphanides G, Reinberg D. (2002) A unified theory of gene expression. *Cell*, 108: 439-451.

Orphanides G, Lagrange T, Reinberg D. (1996) The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev*, 10: 2657-2683.

Peinado H, Marin F, Cubillo E, Stark HJ, Fusenig N, Nieto MA, Cano A. (2004) Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. *J Cell Sci*, 117: 2827-2839.

Peters NT, Rohrbach JA, Zalewski BA, Byrnett CM, Vaughn JC. (2003) RNA editing and regulation of *Drosophila* 4f-rnp expression by sas-10 antisense readthrough mRNA transcripts. *RNA*, 9: 698-710.

Porter JD, Merriam AP, Leahy P, Gong B, Khanna S. (2003) Dissection of temporal gene expression signatures of affected and spared muscle groups in dystrophin-deficient (mdx) mice. *Hum Mol Genet*, 12: 1813-1821.

Proudfoot NJ, Furger A, Dye MJ. (2002) Integrating mRNA processing with transcription. *Cell*, 108: 501-12.

Quong MW, Massari ME, Zwart R, Murre C. (1993) A new transcriptional-activation motif restricted to a class of helix-loop-helix proteins is functionally conserved in both yeast and mammalian cells. *Mol Cell Biol*, 13: 792-800.

Quong MW, Romanow WJ, Murre C. (2002) E protein function in lymphocyte development. *Annu Rev Immunol*, 20: 301-322.

Rahman L, Bliskovski V, Reinhold W, Zajac-Kaye M. (2002) Alternative splicing of brain-specific PTB defines a tissue-specific isoform pattern that predicts distinct functional roles. *Genomics*, 80: 245–249.

Roeder RG. (1996) The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci*, 21: 327-335.

Salghetti SE, Caudy AA, Chenoweth JG, Tansey WP. (2001) Regulation of transcriptional activation domain function by ubiquitin. *Science*, 293: 1651-1653.

Sandelin A, Alkema W, Engström P, Wasserman WW, Lenhard B. (2004) JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles. *Nucleic Acid Research*, 32: 91-94.

Scherf U, Ross DT, Waltham M, Smith LH, Lee JK, Tanabe L, Kohn KW, Reinhold WC, Myers TG, Andrews DT, Scudiero DA, Eisen MB, Sausville EA, Pommier Y, Botstein D, Brown PO, Weinstein JN. (2000) A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat Genet*, 24: 236-244.

Schlissel M, Voronova A, Baltimore D. Helix-loop-helix transcription factor E47 activates germ-line immunoglobulin heavy-chain gene transcription and rearrangement in a pre-T-cell line. *Genes Dev* 1991;5:1367-1376.

Sharp PA. (1999) RNAi and double-strand RNA. *Genes Dev*, 13: 139-141

Shendure J, Church GM. (2002) Computational discovery of sense-antisense transcription in the human and mouse genomes. *Genome Biol*, 3: 44.1 - 44.14.

Sleutels F, Zwart R, Barlow DP. (2002) The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. *Nature*, 415: 810-813.

Szakács G, Annereau JP, Lababidi S, Shankavaram U, Arciello A, Bussey KJ, Reinhold W, Guo Y, Kruh GD, Reimers M, Weinstein JN, Gottesman MM. (2004) Predicting

drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells. *Cancer Cell*, 6: 129-137.

Sun X, Baltimore D. (1991) An inhibitory domain of E12 transcription factor prevents DNA binding in E12 homodimers but not in E12 heterodimers. *Cell*, 64: 459-470.

Sureau A, Soret J, Guyon C, Gaillard C, Dumon S, Keller M, Crisanti P, Perbal B. (1997) Characterization of multiple alternative RNAs resulting from antisense transcription of the PR264/SC35 splicing factor gene. *Nucleic Acids Res*, 25: 4513-4522.

Takahashi T, Furuchi T, Naganuma A. (2005) A novel role for Bsd2 in the resistance of yeast to adriamycin. *J Cell Physiol*, 202: 100-104.

Tan PK, Downey TJ, Spitznagel EL Jr, Xu P, Fu D, Dimitrov DS, Lempicki RA, Raaka BM, Cam MC. (2003) Evaluation of gene expression measurements from commercial microarray platforms. *Nucleic Acids Res*, 19: 5676-5684.

Thakur N, Tiwari VK, Thomassin H, Pandey RR, Kanduri M, Gondor A, Grange T, Ohlsson R, Kanduri C. (2004) An antisense RNA regulates the bidirectional silencing property of the Kcnq1 imprinting control region. *Mol Cell Biol*, 24: 7855-7862.

Tompa M, Li N, Bailey TL, Church GM, De Moor B, Eskin E, Favorov AV, Frith MC, Fu Y, Kent WJ, Makeev VJ, Mironov AA, Noble WS, Pavese G, Pesole G, Regnier M, Simonis N, Sinha S, Thijs G, van Helden J, Vandenbogaert M, Weng Z, Workman C, Ye C, Zhu Z. (2005) Assessing computational tools for the discovery of transcription factor binding sites. *Nature Biotechnology*, 23: 137-144.

Trinklein ND, Aldred SF, Hartman SJ, Schroeder DI, Otilar RP, Myers RM. (2004) An abundance of bidirectional promoters in the human genome. *Genome Res*, 14: 62-66.

Troester MA, Hoadley KA, Sørlie T, Herbert BS, Børresen-Dale AL, Lønning PE, Shay JW, Kaufmann WK, Perou CM. (2004) Cell-type-specific responses to chemotherapeutics in breast cancer. *Cancer Res*, 64: 4218-4226.

Tupler R, Perini G, Green MR. (2001) Expressing the human genome. *Nature*, 409: 832-833.

Tufarelli C, Stanley JA, Garrick D, Sharpe JA, Ayyub H, Wood WG, Higgs DR. (2003) Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as a novel cause of human genetic disease. *Nat Genet*, 34: 157-165.

Urnov FD, Wolffe AP. (2001) A necessary good: nuclear hormone receptors and their chromatin templates. *Mol Endocrinol*, 15: 1-16.

van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Bernards R, Friend SH. (2003) Expression profiling predicts outcome in breast cancer. *Breast Cancer Res*, 5: 57-58.

Voronova A, Baltimore D. (1990) Mutations that disrupt DNA binding and dimer formation in the E47 helix-loop-helix protein map to distinct domains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 4722-4726.

Wang CY, Cusack Jr JC, Liu R, Baldwin Jr AS. (1999) Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. *Nat Med*, 5: 412-417.

Wang XJ, Gaasterland T, Chua NH. (2005) Genome-wide prediction and identification of cis-natural antisense transcripts in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol*, 6: R30.

Waterhouse PM, Graham MW, Wang MB. (1998) Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci* 95: 13959-13964.

Weintraub H, Davis R, Tapscott S, Thayer M, Krause M, Benezra R, Blackwell TK, Turner D, Rupp R, Hollenberg S, et al. (1991) The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science*, 251: 761-766.

Wheeler DL, Barrett T, Benson DA, Bryant SH, Canese K, Chetvernin V, Church DM, DiCuccio M, Edgar R, Federhen S, Geer LY, Kapustin Y, Khovayko O, Landsman D, Lipman DJ, Madden TL, Maglott DR, Ostell J, Miller V, Pruitt KD, Schuler GD, Sequeira E, Sherry ST, Sirotkin K, Souvorov A, Starchenko G, Tatusov RL, Tatusova TA, Wagner L, Yaschenko E. (2003) Database resources of the National Center for Biotechnology. *Nucleic Acids Res*, 31: 28-33.

Wilson JW, Deed RW, Inoue T, Balzi M, Becciolini A, Faraoni P, Potten CS, Norton JD. (2001) Expression of Id helix-loop-helix proteins in colorectal adenocarcinoma correlates with p53 expression and mitotic index. *Cancer Res*, 61: 8803-8810.

Wingender E, Chen X, Fricke E, Geffers R, Hehl R, Liebich I, Krull M, Matys V, Michael H, Ohnhauser R, Pruss M, Schacherer F, Thiele S, Urbach S. (2001) The TRANSFAC system on gene expression regulation. *Nucleic Acids Res*, 29: 281-283.

Wittig R, Nessling M, Will RD, Mollenhauer J, Salowsky R, Münstermann E, Schick M, Helmbach H, Gschwendt B, Korn B, Kioschis P, Lichter P, Schadendorf D, Poustka A. (2002) Candidate genes for cross – resistance against DNA- damaging drugs. *Cancer Res*, 62: 6698-6705

Wong AW, Brickey WJ, Taxman DJ, van Deventer HW, Reed W, Gao JX, Zheng P, Liu Y, Li P, Blum JS, McKinnon KP, Ting JP. (2003) CIITA-regulated plexin-A1 affects T-cell-dendritic cell interactions. *Nat Immunol*, 4: 891-898.

Woodman SE, Park DS, Cohen AW, Cheung MW, Chandra M, Shirani J, Tang B, Jelicks LA, Kitsis RN, Christ GJ, Factor SM, Tanowitz HB, Lisanti MP. (2002) Caveolin-3 knock-out mice develop a progressive cardiomyopathy and show hyperactivation of the p42/44 MAPK cascade. *J Biol Chem*, 277: 38988-38997.

Woychik NA, Hampsey M. (2002) The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell*, 108: 453-463.

Yamasaki K, Joh K, Ohta T, Masuzaki H, Ishimaru T, Mukai T, Niikawa N, Ogawa M, Wagstaff J, Kishino T. (2003) Neurons but not glial cells show reciprocal imprinting of sense and antisense transcripts of Ube3a. *Hum Mol Genet*, 12: 837-847.

Yelin R, Dahary D, Sorek R, Levanon EY, Goldstein O, Shoshan A, Diber A, Biton S, Tamir Y, Khosravi R, Nemzer S, Pinner E, Walach S, Bernstein J, Savitsky K, Rotman G. (2003) Widespread occurrence of antisense transcription in the human genome. *Nat Biotechnol*, 21: 379–386.

Zhang H, Ramanathan Y, Soteropoulos P, Recce ML, Tolias PP. (2002) EZ-Retrieve: a web-server for batch retrieval of coordinate-specified human DNA sequences and underscoring putative transcription factor-binding sites. *Nucleic Acids Res*, 30: e121.

Zhang Y, Liu XS, Liu QR, Wei L. (2006) Genome-wide in silico identification and analysis of cis natural antisense transcripts (cis-NATs) in ten species. *Nucleic Acids Res*, 34: 3465-3475.

Zhang Y, Reinberg D. (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev*, 15: 2343-2360.

Zhao F, Xuan Z, Liu L, Zhang M. (2004) TRED: a transcriptional regulatory element database and platform for in silico gene regulation studies. *Nucleic Acids Res*, 33: 103-107.

Saját közlemények jegyzéke

Összes cikk: 9

Kumulatív impakt faktor: 11,029

Elsőszerzős, a dolgozat témájához kapcsolódó angol nyelvű közlemények:

1. **Győrffy A**, Vasarhelyi B, Szoke D és mtsai: Comparative promoter analysis of doxorubicin resistance-associated genes suggests E47 as a key regulatory element. **Anticancer Res** 2006; 26: 2971-2976. (IF: 1,479)
2. **Győrffy A**, Surowiak P, Tulassay Z, Gyorffy B: Highly expressed genes are associated with inverse antisense transcription in mouse. **Journal of Genetics** (IF: 0,528; *közlésre elfogadva*)
3. **Győrffy A**, Z Tulassay, B Gyorffy: Computational Analysis Reveals 43% Antisense Transcription in 1182 Transcripts in Mouse Muscle. **DNA Sequence** 2006: 17: 422-430. (IF: 0,569)
4. **Győrffy A**, Baranyai Z, Cseh A, Munkacsy Gy, Jakab F, Tulassay Z, Gyorffy B: Promoter analysis suggest the implication of NFkB/C-REL transcription factors in biliary atresia. **Hepato-Gastroenterology** (IF: 0,756; *közlésre elfogadva*)

A dolgozat témájához kapcsolódó társszerzős közlemény:

5. Szőke D, **Győrffy A**, Surowiak P, Tulassay Z, Dietel M, Győrffy B: Identification of consensus genes and key regulatory elements in 5-fluorouracil resistance in gastric and colon cancer, **Onkologie** (*közlésre elfogadva*, IF: c)

A dolgozat témájához kapcsolódó magyar nyelvű közlemények:

6. **Győrffy A**, Makai D, Gyorffy B, Harsanyi G, Tulassay Z: Microelectrodes and their application in diagnostic medicine. **Orv Hetil** 2006; 35: 1703-1708.
7. **Győrffy A.**, Gyorffy B., Molnar B., Tulassay Z: Hybridization and their application in the DNA array technology. **Orv Hetil** 2005; 27: 1447-1452.
8. Győrffy B, **Győrffy A**, Tulassay Z: The problem of multiple testing and solutions for genome-wide studies. **Orv Hetil** 2005; 12: 559-563.

A Ph.D. munkám alatt megjelent, további közlemények:

9. Kocsis I, Vasarhelyi B, **Győrffy A**, Gyorffy B: Reanalysis of genotype distributions published in "Neurology" between 1999 and 2002. **Neurology** 2004; 63: 357-358. (IF: 5,973)

Szabadalmak:

10. Pozicionáló eljárás és egység, különösen pipettahegy pozicionálására (P0500670-2005, Elfogadás alatt).
11. Automata mérőrendszer különösen elektrokémiai és biokémiai mérésekhez (P0500671-2005, Elfogadás alatt).

Függelék A: Győrffy A és mtsai, Anticancer Research cikk lenyomata

Függelék B: Győrffy A és mtsai, DNA sequence cikk lenyomata

Függelék C: Győrffy A és mtsai, Journal of Genetics cikk lenyomata

Köszönetnyilvánítás

Hálás vagyok témavezetőimnek, Prof. Tulassay Zsoltnak (SE II. Belgyógyászati Klinika) és Dr. Gyórfy Baláznak a Ph.D. képzés alatti támogatásukért. Bevontak az Intézetben már folyamatban levő tudományos témákba, önálló kutatási feladatokkal láttak el.

Segítségükkel tanultam meg a helyes kérdésfelvetés, adatgyűjtés, elemzés és értékelés módszereit. Irányították a kutatást és biztosították a módszerek beállításához és a mérések elvégzéséhez szükséges vegyszerek anyagi háttérét. Meghatározó szerepük volt tudományos érdeklődésem alakulásában.

Köszönöm Prof. Tulassay Tivadar tanár Úrnak hogy az eredmények szellemi-jogi védelmében a Semmelweis Egyetem Rektoraént mindig támogatt, és bármely akadály felmerülésekor új lehetőséget és megoldást javasolt.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Molnár Bélának (SE II. Belgyógyászati Klinika), hogy tudományos munkámat kritikus tanácsaival, gyakorlati ötleteivel segítette. Köszönettel tartozom Prof. Harsányi Gábornak a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Elektronikai Technológia Tanszékének vezető tanárának és Makai Dórának a lelkiismeretes, alapos segítségükért. Köszönöm együttműködő munkáját Dr. Virág Tibornak és Vörös Borisznak, akikkel a szerteágazó találmányi ötleteket kézzelfogható formába tudtuk önteni.

Hálás vagyok a SOTE II. Belgyógyászati Klinika Sejtanalitika Laboratóriumában dolgozó munkatársaimnak, hogy lehetőséget biztosítottak a mérések elvégzésére és segítettek a technikai akadályok leküzdésében.

Végezetül pedig, de nem utolsó sorban, köszönöm szüleimnek, családomnak, hogy végig mellettem álltak és támogattak az elmúlt időszakban.