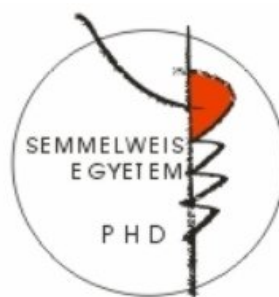


# Rendszerbiológia: génexpressziós mintázatok és a transzkripció szabályozása

Doktori tézisek

**Dr. Gyórfy András**

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

## 1. BEVEZETÉS

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 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. Pozicionáló rendszert és kereskedelmi forgalomban kapható egyszer használatos pipettahegyeket alkalmazó pipettázó automata rendszert fejlesztettem ki. Bár az effektív munka jelentős része e fejlesztés és a hozzá kapcsolódó mintaoltalmak és szabadalmak létrehozását jelentette, eredményeit a Módszerek és Eredmények fejezetekben

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. Györfly András

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

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

### 1. Microarray adatok alapján konszenzus génlista létrehozása

Elsődleges célom daganat kemoterápia során tapasztalt doxorubicin-rezisztenciával 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. Transzkripciós faktorok identifikálása

Feltételezhetjük, hogy az együttregulált konszenzus génlista mögött közös szabályozó mechanizmusok állnak. Célul tűztem ki, hogy a doxorubicin-rezisztenciával összefüggésbe hozott konszenzus génlistát szabályozó közös transzkripciós faktor kötőhelyeket azonosítsam és ezek segítségével a rezisztencia rendszerbiológiai modelljét felállítsam.

### 3. Antiszenz transzkripció génexpressziós mintázatokban

Tanulmányomban a reverz komplementer szekvenciák expressziójának microarray alapú tanulmányozását tűztem ki abból a célból, hogy a szenz és antiszenz transzkripciót vizsgáljam minél átfogóbb genomiális szinten. Célom volt, hogy leírjam az antiszenz transzkripció gyakoriságát és a kapott adatok alapján lehetséges szabályozó jellegzetességét. További célja volt vizsgálódásomnak a regulációs elemek esetleges specifikus eloszlási rajzolatának kutatása, aminek érdekében a szenz és antiszenz transzkripció kromoszóma-specifikus expressziós rajzolatát és arányát vizsgáltam.

## **4. Technológiai fejlesztés**

Az alkalmazott microarray technológiák áruk és komplexitásuk miatt ma rutinszerűen nem alkalmazhatóak. Céлом olyan automata mérőrendszer, automata pipettázó berendezés kifejlesztése volt, amellyel olcsón és egyszerűen lehet tetszőleges felületre pipettázni, illetve egy ilyen felületen elektrokémiai és molekuláris méréseket végrehajtani. Céлом volt, hogy olyan pozicionáló egységet hozzak létre, amelynek segítségével nagy pontossággal lehet tárgyak relatív és abszolút helyzetét meghatározni. Fejlesztési munkám során a pipettahegyek helyzetének megállapítása kiemelt fontosságú volt.

## **3. MÓDSZEREK**

### **1. Forrás adatok összeállítása a transzkripciós faktorok keresésére**

A PubMed adatbázisban 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 kizártam azokat a publikációkat, amelyek specifikus sejtvonalakra korlátozódtak, 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 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. Ezekben a közleményekben Affymetrix és Stanford chipet 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.

### **2. Transzkripciós faktorok meghatározása**

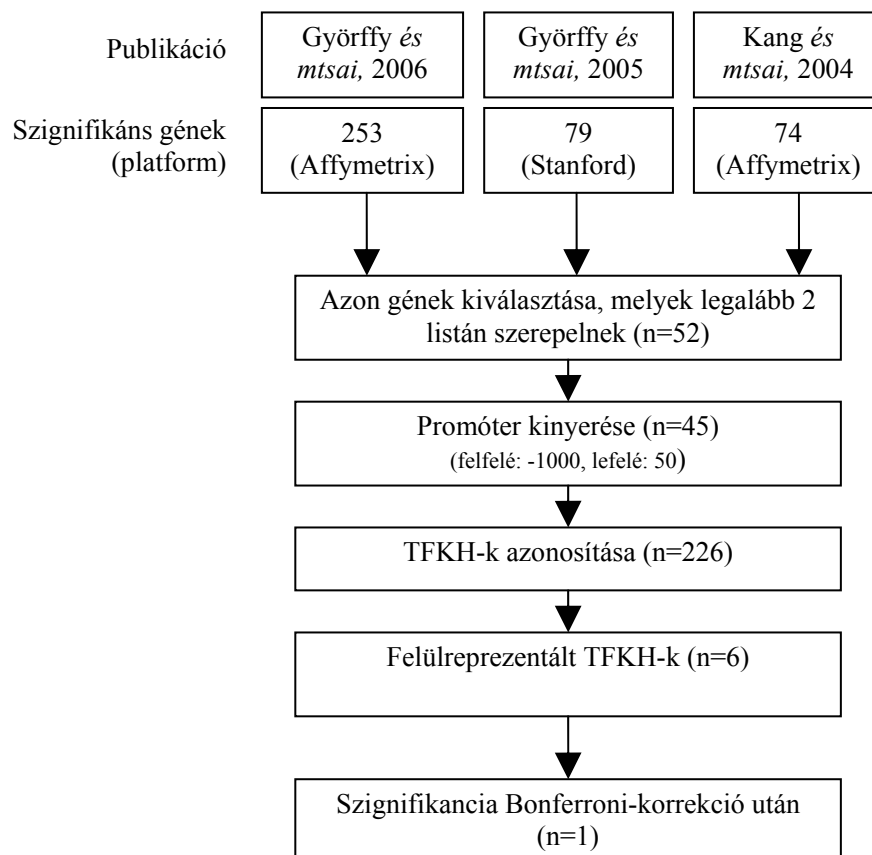
#### *Szekvenciák kinyerése*

A transzkripciós faktor kapcsolódási helyeinek meghatározásához az együttszabályozott gének regulációs régióit kellett először kigyűjteni. Először a proximális promóter-

szekvenciákat (1 kb felfelé és 0,05 kb lefelé a transzkripcionális start helytől) töltöttem le a genomikai adatbázisból EZ-Retrieve-et használva. A kivont szekvenciákat FASTA formátumban mentettem el, majd importáltam a TOUCAN-ba.

#### *A transzkripció faktor-kötőhely meghatározása*

Következő lépésben a promóterszekvenciákon a felülreprezentált rövid DNS-motívumokat kerestem meg számítógépes programok segítségével. A TOUCAN programot használtam a kiválasztott gének összehasonlító promóteranalízisének elvégzésére. A TOUCAN program részét képező MotifScanner eszközzel, amely a TRANSFAC adatbázisban keres, 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 összehasonlítására, hogy a felülreprezentált motívumokat megtaláljam. Végezetül Bonferroni-korrekciót hajtottam végre a többszörös teszt hatásának kompenzációjára (1. ábra).



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

### **3. Antiszenz transzkripció mértékének meghatározása**

Az elsődleges cél olyan gének azonosítása volt, ahol a szenz és antiszenz expressziós adat is rendelkezésre áll. Ennek érdekében az MGU74A egyes verziójú chipet az MGU74A kettes verziójú chippel hasonlítottam össze a Matchprobe R könyvtár segítségével. A komplementáris megfelelő expressziós adatállományt a Gene Expression Omnibus (GEO) webes adatbázisból töltöttem le. 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 félreérthetőség elkerülése érdekében, és hogy biztos legyek abban, hogy a cisz-antiszenz transzkriptum pontos megfelelői a szenznek, 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.

Első vizsgálódásomban 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 (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 antiszenz partnerek relatív szintjét alapul vehettem az analízishez. A statisztikai szignifikancia szintet  $p < 0,05$ -nek választottam.

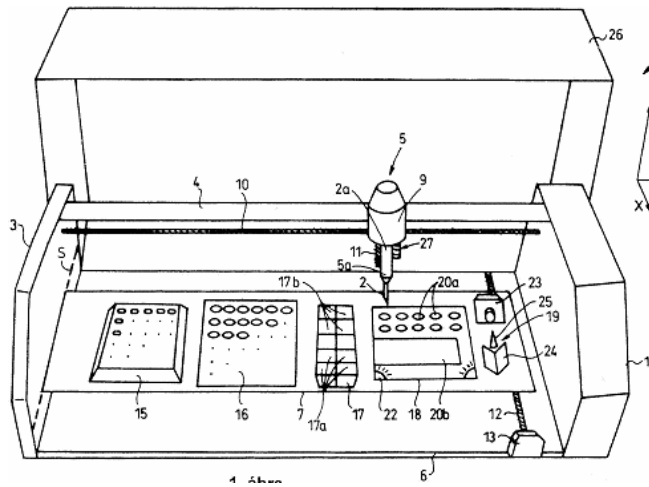
A transzkriptumok annotációjára az Affymetrix és NetAffx Analysis Centert alkalmaztam az egér genom nomenklaturát a Mouse Genome Informatics adatbázis adatainak megfelelően használtam. Pearson-korrelációt számoltam a fent említett specifikus szenz és antiszenz expresszió arányának meghatározásakor. A kromoszomális lokalizáció vizsgálatára az R könyvtárak Biobase, Annotate és Geneplotter programjait alkalmaztam.

### **4. Szabadalmak, az automata mérőrendszer és pozicionáló leírása**

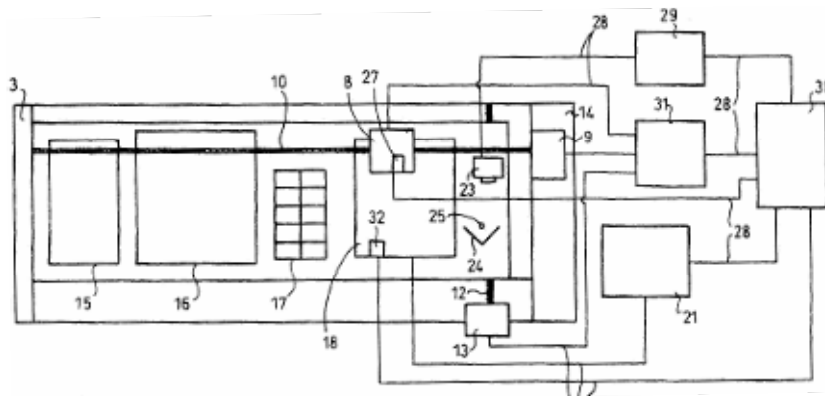
A találmány (Patent pend: Györffy és mtsai, #101204) részleteit rajz segítségével ismertetem. A rajzon a 2.A ábrán az automata mérőrendszer kiviteli alakjának perspektivikus

felülnézeti képe, a 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 perspektívus képe B. A mérőrendszer és a hozzá kapcsolódó elektronikus vezérlés vázlatos blokkdiagramja (1 automata mérőrendszer; 2 eldobható pipettahegy; 2a egy elektromos-pipetta; 3 fémváz; 4 felső kereszthidas 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 pozicionáló egység (Patent pend: Györffy és mtsai, #101301) segítségével a pozicionálandó tárgy, jelen esetben a pipettahegy helyzetét lehet mikrométeres pontossággal meghatározni és beállítani a rögzített referenciatárgy referencia-csúcsához képest.

A pozicionáló egység kamerából, tükrökből és referenciacsúcsból tevődik össze. A referenciatárgy egy álló helyzetű, túszerű objektum, amelynek csúcsa képezi a referenciacsúcsot, amely egymással  $\alpha$  ( $135^\circ$ -os) tompaszöget bezáró két tükör között, az  $\alpha$  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 kellő fényintenzitás biztosításához egy-egy pontszerű fényforrás található mind a jobb, mind a bal oldali tükör aljánál, közvetlenül a tükrök előtt. A kamerát egy számítógéppel vezérelt jelfeldolgozó egységgel kapcsoltam össze. A pipettahegyeket 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 szintén alkalmas.

## 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). Az 52 génből 45 génnek lehetett a promóterszekvenciáit letölteni.

### 4.2 Közös transzkripció faktor meghatározása a kapott génlistában

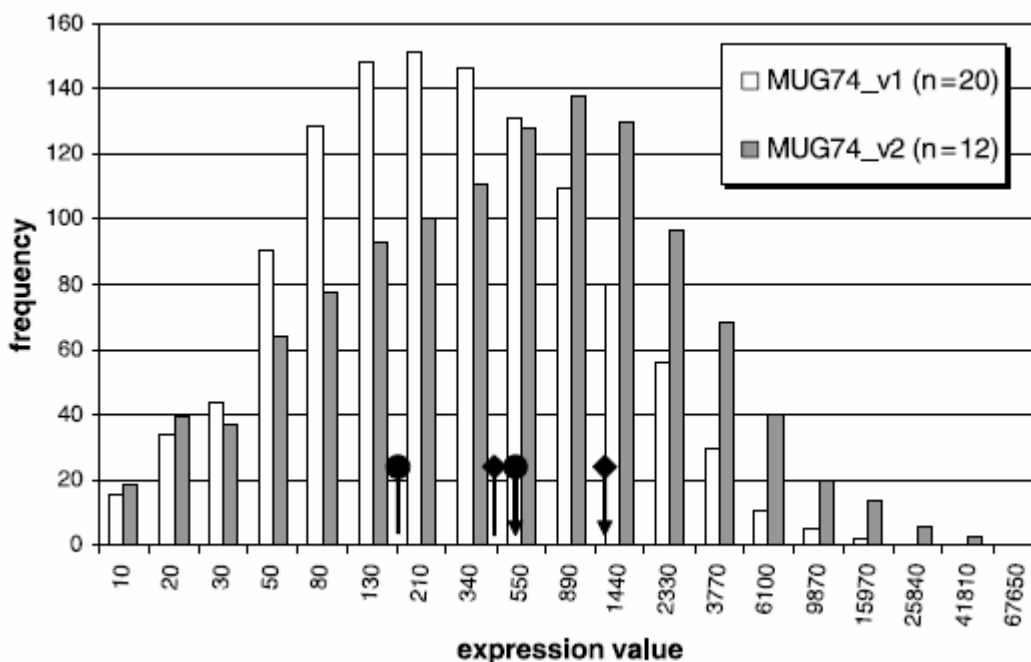
Az összehasonlító promóteranalízis 45 promóterszekvenciával rendelkező gén felülexpresszált transzkripció faktoraként az E47-et fedte fel ( $p=0,00024$ ,  $n=9$ , háttér frekvencia:  $8,19E-6$ ).



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

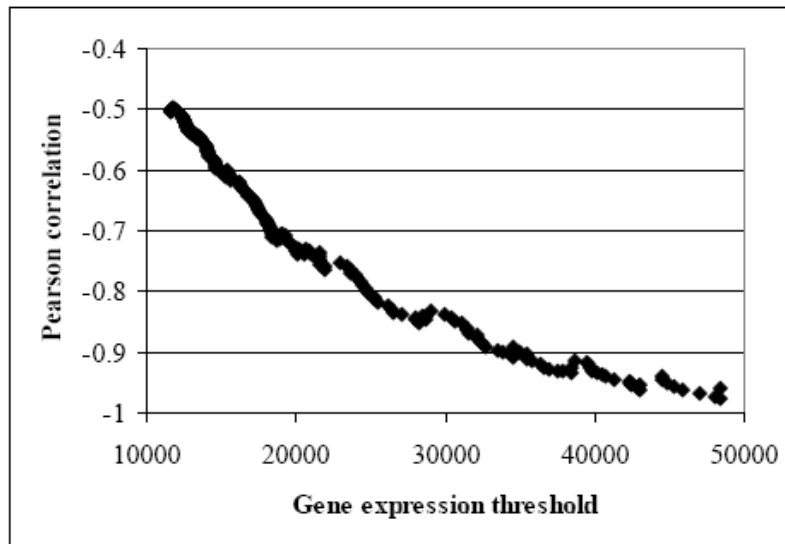
### 4.3 Antiszenz transzkripció mértékének meghatározása

Porter és mtsai adatállományában 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 (4. ábra). A hisztogram bemutatja mindkét chip expressziós szintjét, érzékeltetve, hogy az antiszenz expressziós szintek kisebbek a szenznél (4. ábra). Átlagos antiszenz expresszió relatív normalizált egységben az MGU74A egyes verziójú chipen 525,1 volt, míg a szenz csipen 1219,1 (t-teszt:  $p < 0,0001$ , 3. ábra).



**3. 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:  $n = (n-1) + (n-2)$ .

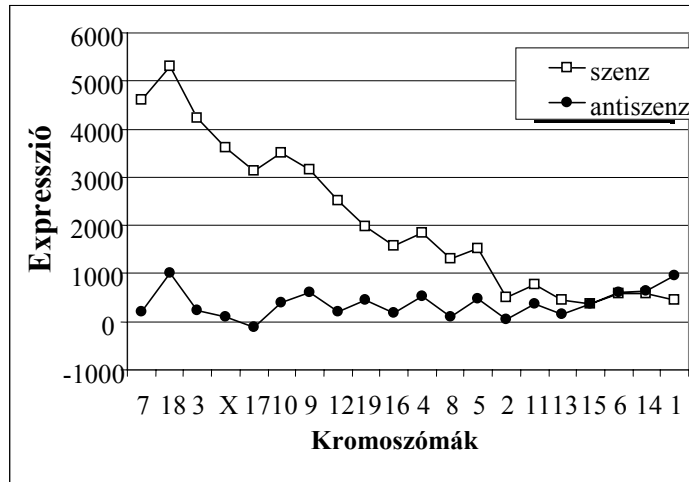
Wong és mtsai által publikált adathalmaz vizsgálata során is mindkét irányban tapasztaltam génexpressziót. Az átlagos antiszenz expresszió 516 volt (normalizált relatív egységben), míg az átlagos szenz expressziós szint 1688. Különösen magas expressziós értékeknél a szenz gének gyakorisága felülmúlja az antiszenz génekét (4. ábra).



**4. ábra:** A szenz és antiszenz génexpresszió közti korreláció látható egy relatív génexpressziós küszöb felett. A mindenkor 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.

Kiválasztottam azokat a transzkriptumokat, amelyeknél az inverz szenz-antiszenz arány valóban szignifikánsan magasabb volt. Így olyan transzkriptumokat találtam, amelyeknek megváltozott antiszenz expressziója az MHC tanulmánnyal összefüggésben volt.

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 (5. ábra).

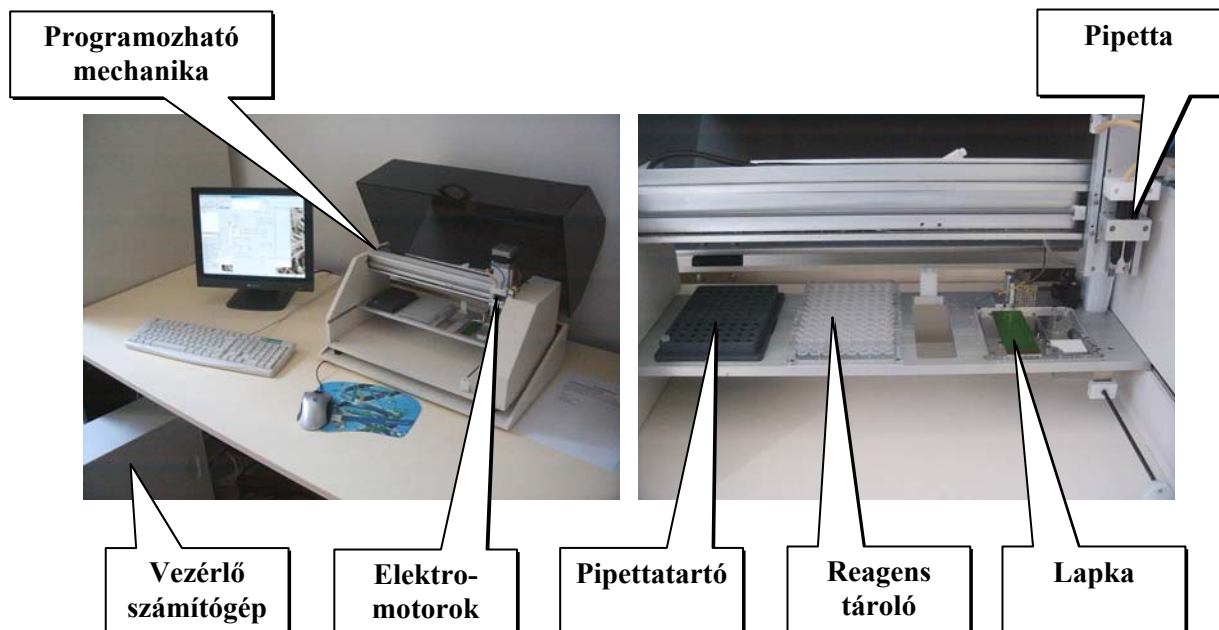


5. ábra: Különböző kromoszómák átlagos szenz és antiszenz expressziója. A kromoszómákat a szenz és antiszenz expresszió közti különbségek alapján soroltam be.

#### 4.4 Az automata mérőrendszer és pozicionáló eljárás

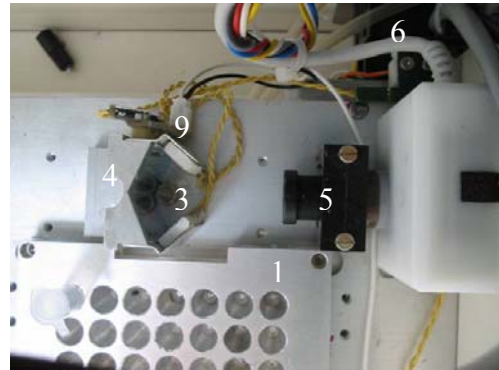
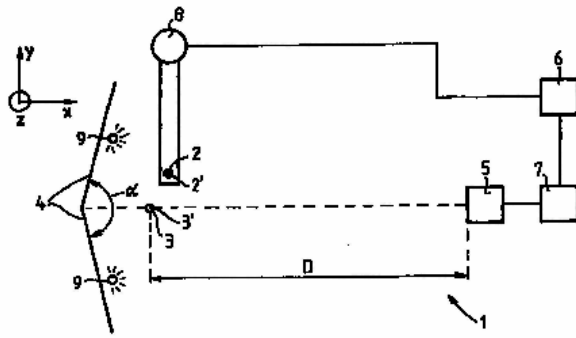
Találmányom tárgya olyan elektrokémiai és biokémiai mérésekhez alkalmazható automata mérőrendszer, amely minták tárolására alkalmas egy vagy több mintatartóval, a minták vizsgálatának helyéül szolgáló mérőfelülettel, mintabefogadó eszközzel, egy vagy több mérőeszközzel, valamint tárgy - a minta befogadó eszköz - befogására és mozgatására alkalmas tárgymozgató eszközzel rendelkezik (6. ábra A-B).

A



6. A ábra: Az automata mérőrendszer kiviteli alakja.

B.



**6. B ábra:** A pozicionáló egység vázlatos felülnézeti és működőképes 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  $\alpha$  szögben egymáshoz képest; 5. ccd kamera; 6. vezérlő egység; 7. jelfeldolgozó egység (PC); 8. robotkar; 9. világító egységek a tükrök aljában.

## 5. KÖVETKEZTETÉSEK

### Oligo szabályozó elemek meghatározása

- Meghatároztam a doxorubicin rezisztenciával kapcsolatba hozható konszenzus gének listáját. 52 gént mutattam rá korábbi releváns tanulmányok elemzése során, amelyek biológiai funkciójukból adódóan a rezisztencia kialakulásáért jellemző elváltozásokért felelőssé tehetők.
- Az E47 transzkripciós faktor felülreprezentációját találtam a doxorubicin-rezisztenciával asszociált gének promóter szekvenciáján. Az E47 transzkripciós faktor a doxorubicin-rezisztencia kialakulásának háttérében álló szabályozó rendszer kulcsfontosságú eleme lehet.

### Oligo szekvenciairány és szabályozó funkcióinak vizsgálata

- Vizsgálataim és az ismertett adatok alapján az antiszenz koexpresszió és inverz expresszió az egér genom gyakori és belső tulajdonsága. A vizsgálat kiterjesztése által elmondhatom, hogy valamennyi egér gént nézve az általános antiszenz expresszió 43%-ra becsülhető.

- Inverz korrelációt találtam a szenz és antiszenz mRNA expresszió között magas szenz (és antiszenz) értékeknél. Eredményeim az antiszenz transzkripció inverzitásából adódó szabályozási funkcióit bizonyítják.
- Jelentős különbségekre mutattam rá a szenz és antiszenz expressziós arányokat vizsgálva az egyes kromoszómák között. A legalacsonyabb antiszenz expressziós szintet a 9. és 17. kromoszómán, a legmagasabbat az 1. és 14. kromoszómán fedeztem fel. Az X kromoszómán alacsony az antiszenz expresszió szintje.

### **Oligo spottoló technológia fejlesztése**

- Automata mérőrendszert dolgoztam ki, amely 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 műszerrel szilárd hordozóra felületi réteg növeszthető. A készülék microarrayk készítésére is alkalmas.
- Pozicionáló eljárást fejlesztettem ki és pozicionáló egységet építettem, mely egyszerhasználatos kereskedelmi 0,1-20 µl-es pipettahegyek tizedmikrométeres pontosságú pozicionálására alkalmas. Az eljárás kifejlesztésével egykamerás helymeghatározási rendszert alakítottam ki, amelynek segítségével a háromdimenziós térben milliméter, vagy akár mikrométer nagyságú tárgyak helyzete meghatározható. Ezáltal a DNS mikroarrayk fejlesztésének új pozícióspecifikus lehetőségét teremtettem meg.

## **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. A folyamatot egy klinikai problémán, a rák kemoterápia során alkalmazott doxorubicin-kezeléssel szemben kialakuló rezisztencia során vizsgáltam. Kutatásaim során rámutattam, hogy a kimutatott E47 transzkripciós faktor és a gyógyszerrezisztencia között összefüggés feltételezhető. Eredményeim új fényt vetnek az E47-re, mely 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. Azonos gyakoriságú, de kisebb szintű 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, ezt követően 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.

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

Az általam fejlesztett rendszer eldobható, kereskedelmi forgalomban olcsón és könnyen beszerezhető pipettahegyeket használ. A fent említett pontosság csak akkor érhető el, ha valamennyi pipetta helyzetét egyedileg, 0,1  $\mu$ 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 referenciacsúchoz szállítom és ahhoz számítógép-vezérelt képfeldolgozási rendszerrel viszonyítom. Innen kiindulva az eldobható pipettahegy számítógép-vezérelt robotkarral már bárhova nagy pontossággal mozgatható.

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.

## SUMMARY

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

**Author:** Dr. Györfly András

**Consultants:** Dr. Tulassay Zsolt and Dr. Györfly 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 in cancer therapy response. 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-fluorouracil 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 performed a technological development for the diagnostic measurement of microarray results. Here, a positioning system and an automated pipetting system were developed. The positioning system has 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.



## 7. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Összes cikk: 9	Kumulatív impakt faktor: 11,029	Benyújtott szabadalom: 2
----------------	---------------------------------	--------------------------

### **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, Győrffy 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 Győrffy: Computational Analysis Reveals 43% Antisense Transcription in 1182 Transcripts in Mouse Muscle. **DNA Sequence** 2006;17:422-430. (IF: 0,569)
4. **Győrffy A**, Z Baranyai, A Cseh, Gy Munkacsy, F Jakab, Z Tulassay, B Győrffy: 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. Szöke 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: 1,724).

### **A dolgozat témájához kapcsolódó magyar nyelvű közlemények:**

6. **Győrffy A**, Makai D, Győrffy B, Harsanyi G, Tulassay Z: Microelectrodes and their application in diagnostic medicine. **Orv Hetil** 2006;35:1703-1708.
7. **Győrffy A.**, Győrffy 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**, Győrffy B: Reanalysis of genotype distributions published in "Neurology" between 1999 and 2002. **Neurology** 2004;63:357-358. (IF: 5,973)

### **Szabadalmak:**

1. Pozicionáló eljárás és egység, különösen pipettahegy pozicionálására Gyórfy A., Gyórfy B., Virág T., Molnár B., Szabó A., Tulassay Z., Tulassay T. (P0500670-2005, Elfogadás alatt).
2. Automata mérőrendszer különösen elektrokémiai és biokémiai mérésekhez Gyórfy A., Gyórfy B., Virág T., Molnár B., Szabó A., Tulassay Z., Tulassay T. (P0500671-2005, Elfogadás alatt).

### **Konferencia előadások:**

1. 2007. Magyar Gasztroenterológiai Társaság Konferenciája, Diagnostic gene expression signatures to predict the chemotherapy resistance against oral and intravenous 5-fluorouracil. Munkácsy Gy., Gyórfy B., Baranyai Zs., Gyórfy A., Jakab F., Tulassay Zs
2. 2007. PhD konferencia Diagnosztikus génexpressziós mintázatok fejlesztése az 5-fluorouracillal szemben kialakuló kemorezisztencia előrejelzésére. Munkácsy Gy, Gyórfy A, Baranyai Z, Jakab F, Tulassay Z, Gyórfy B, ,
3. 2006, 2006, st. Marienthal, electrochemical dna Sensor Development for Diagnostic Application D Makai, A. Gyórfy, G Harsányi, Z. Tulassay
4. 2006, PhD Tudományos Napok, Budapest, (II. helyezet): Mikroelektródák az orvosi diagnosztikában A. Gyórfy, D. Makai, B. Gyórfy, G. Harsányi, Zs. Tulassay
5. 2006 Kandó Kálmán Főiskola, Budapest, Hibridizáció és termodinamikai alapjai (Sejtanalitika és lehetőségei a modern diagnosztikában), meghívott előadó
6. 2005, 25-276th International congress of the worldwide hungarian medical academy (WHMA) Budapest, Genom-wide antisense transcription is suggested by the analysis of 1182 mouse transcripts A. Gyórfy, B Gyórfy
7. 2004, UEGW, Prague, Development of a new electrochemical chip technology for gastrointestinal biopsy specimen cDNA analysis Gyórfy A., Virág T., Gyórfy B., Szabó A., Tulassay T., Patócs A., Molnár B., Tulassay Z.
8. 2004, Gastroenterológiai konferencia, Balatonaliga, DNS immobilizáció és detekció, Gyórfy A., Molnár B., Tulassay Z.
9. 2004, Magyar innovációs kiállítás, Új dns chip-készítő technológia és műszer bemutatása
10. 2004, Semmelweis Egyetem PhD konferencia, Budapest, Chip hibridizációs technológia összefoglaló. A.Gyórfy
11. 2003, ISSE 2003, Mátrafüred, DNA chip with electronically accelerated processes A. Gyórfy, H. Sántha,
12. 2002, Polytronic conference, New methods of DNA oligomer - binding and detection in the DNA microarray technology A. Gyórfy, A. Patócs, H. Sántha, Rác K., G. Harsányi.