

TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOL
Matemaatika-loodusteaduskond
Geenitehnoloogia instituut

MikroRNA hsa-miR-548ba ja hsa-miR7973 sihtmärkgeenide tuvastamine inimese munasarja
granuloosa rakuliinis KGN

Magistritöö
Ilmatar Rooda

Juhendajad: Agne Velthut-Meikas, PhD
Anu Aaspõllu, PhD

Geenitehnoloogia 2016

Lühikokkuvõte

MikroRNA-d on pärast nende avastamist muutunud enim uuritud väikesteks RNA molekulideks, mis on suurelt põhjustatud nende olulise rolli tõttu geeniekspressiooni regulatsioonis nii taimedes kui loomades. Need väiksed mittekodeerivad RNA järjestused osalevad post-transkriptsiooniliselt rakkude diferentseerumise ja proliferatsiooni kontrollis ning omavad olulist rolli loomade ja taimede kasvu, arengu ja paljunemise regulatsioonis. Nende olulisus geeniekspressiooni regulatsioonis annab võimaluse kasutada mikroRNA-sid kui biomarkereid ennustamaks rakkude kvaliteeti ja elulemust. Kehaväline viljastamine oleks üheks potentsiaalseks mikroRNA markerite kasutusala. Kehavälise viljastamise õnnestumise üheks oluliseks faktoriks on elujõuline munarakk ning hetkel ongi üheks komistuskiviks kõige elujõulisema viljastatud munaraku ehk embrüo valimine emakasse siirdamiseks. Munarakk on oma arengu vältel tihedalt seotud teda ümbritsevate granulosa-rakkudega, mis annavad munarakule nii hormonaalset kui ka metaboolset tuge. Selline lähedane sõltuvus kahe erineva rakutüübi vahel annaks võimaluse kasutada granulosa-rakke mitte-invasiivsete markerite otsinguks ja hiljem kunstliku viljastamise tulemuslikkuse hindamisel.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida kahe mikroRNA, hsa-miR-548ba ja hsa-miR-7973, mRNA sihtmärke inimese granulosa rakuliinis KGN. Need kahe miRNA järjestused paiknevad follikulogeneesis oluliste geenide intronites: hsa-miR-548ba *FSHR* geenis ja hsa-miR-7973 *CYP19A1* geenis. Nende asukoht ning bioinformaatiliselt ennustatud sihtmärgid tõstasid küsimuse nende rolli kohta follikulogeneesis. Kuna nende miRNA-de tõelisi sihtmärke pole teada, siis sai ka käesoleva töö eesmärgiks nende väljaselgitamine. Käesolevas töös kasutati miRNA sihtmärkide uurimiseks miRNA analooge, mis transfekteriti KGN rakuliini.

Esimeseks eesmärgiks oli leida optimaalsed miRNA analoogide transfektsiooni tingimused. Transfektsiooni optimeerimine viidi läbi hsa-miR-548ba näitel, kus kõige optimaalsemaks osutus 12,5nM kontsentratsiooniga transfektsioonisegu ja 72 tunni ajapunkt, milles oli hsa-miR-548ba ekspressioon kõrgeim. Optimeerimisega samaaegselt leitud hsa-miR-548ba bioinformaatiliselt ennustatud sihtmärkgeenide ekspressiooni muutus kinnitas parimaks samuti 12,5nM transfektsioonilahuse ja 72h ajapunkti. Lisaks hinnati ka KGN rakkude jagunemiskiirust pärast transfektsiooni, mille tulemused näitasid, et hsa-miR-548ba ja hsa-

miR-7973 transfektsioonil ei ole olulist mõju rakkude jagunemisele võrreldes negatiivse kontrollina kasutatud miRNA cel-miR-39-3p analoogiga. Samuti ei mõjutanud miRNA analoogide transfektsioon elusrakkude protsenti oluliselt võrrelduna transfekteerimata rakkudega. Saadud tulemused näitavad, et kahel uuritud miRNA analoogil ei ole rakkudele toksilist mõju.

Optimeeritud tingimustel viidi läbi Affimetrix geenikiibi analüüs hsa-miR-548ba, hsa-miR-7973 ja negatiivse kontroll cel-miR-39-3p analoogiga transfekteeritud rakkudest eraldatud mRNA proovidega. Affymetrix geenikiibi analüüsist selgus, et hsa-miR-548ba ja hsa-miR-7973 analoogidega transfekteeritud rakkude geeniekspressiooni muster erineb kontroll miRNA cel-miR-39-3p analoogiga transfekteeritud rakkude geeniekspressiooni muustrist ning samuti omavad hsa-miR-548ba ja hsa-miR-7973 omavahel erinevat mRNA profiili. Järgmiseks eesmärgiks oli geenikiibilt saadud tulemuste valideerimine reaalse PCR meetodil. Valideerimiseks valiti geenid, mille ekspressiooni erinevuse kohandatud p-väärtus geenikiibil jäi alla 0,01 ning mis olid ka eelnevalt bioinformaatiliselt sihtmärkgeeniks ennustatud. Hsa-miR-548ba korral oli ühisosaks 19 geeni, millest valideeriti viis, kuna neil oli roll munasarjas toimuvatele või sellele lähedastele molekulaarsetele protsessidele. Nendeks geenideks olid: *AKAP13*, *PTEN*, *MECOM*, *BCL2L11* ja *SP110*. Hsa-miR-7973 geenikiibi ja bioinformaatiliselt ennustatud sihtmärkide ühisosaks oli 4 geeni, mis kõik valideeriti: *ATHL1*, *SLC26A2*, *FMNL3* ja *FOXK1*. Valideerimise tulemustest statistiliselt olulise tulemuse andsid hsa-miR-548ba sihtmärkide korral *PTEN*, *BCL2L11* ja *SP110*. Hsa-miR-7973 tulemustest statistiliselt olulised olid *ATHL1*, *FMNL3* ja *FOXK1*.

Käesoleva töö tulemused pakuvad välja hsa-miR-548ba-le ja hsa-miR-7979-le sihtmärkgeene, kuid enne nende mõju kinnitamist rakkude funktsioonile, tuleks nende sihtmärkgeenide ekspressioonitasemete muutusi hinnata ka valgu tasemel. Kuna käesolevas töös viidi katsed läbi rakuliinis, siis ei saa tulemusi otse primaarsetesse rakkudesse üle kanda. Siiski muudavad hsa-miR-548ba sihtmärgid *BCL2L11* ja *PTEN* oma olulisuse tõttu folliikulite arengus selle miRNA huvipakkuvaks uurimisobjektiks granuloosrakkudes.