

# Fiatal RNS Kutatók Fóruma

2021

- online konferencia -

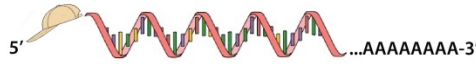


# Forum for Young RNA Investigators

2021

- online conference -

## Fiatal RNS Kutatók Fóruma



### 2021 Online Konferencia

#### PROGRAM

<u>ELŐADÓK LISTÁJA / LIST OF PRESENTERS</u>	<u>ABSZTRAKT, OLDALSZÁM / ABSTRACT, PAGE #</u>
<b>Agyemang, Evans Duah and Desiderio, Francesco:</b> Searching for the causative agent of a viral-like symptom in Clematis vitalba	2
<b>Bartha Áron:</b> Webfelület a normál, tumoros és áttétes szövetek transzkriptom szintű elemzésére	3
<b>Gál Luca:</b> Az alternatív splicing vizsgálata és összefüggése a mirtronok éréseivel	4
<b>Kopasz Anna Georgina:</b> RNS interferencia alapú géncsendesítés optimalizálása egy jól kiegyensúlyozottan kétirányú promóter használatával szomatikusan transzgenikus egérmodellben	5
<b>Miloro, Fabio:</b> Effects of miRNA precursor structures on AGO1 loading	6
<b>Szatmári Orsolya:</b> Fázisszeparált granulomok szerepe a génexpresszió szabályozásában	7



### Searching for the causative agent of a viral-like symptom in *Clematis vitalba*

Evans Duah Agyemang\*<sup>1</sup>, Francesco Desiderio\*<sup>2</sup>, Emese Demian<sup>1</sup>, Andras Takacs<sup>1</sup>, Pal Salamon<sup>3</sup>, Eva Varallyay<sup>1</sup>  
(\* equal contribution)

<sup>1</sup> Hungarian University of Agriculture and Life Science, Georgikon Faculty, Institute of Plant Protection

<sup>2</sup> Hungarian University of Agriculture and Life Science, Institute of Horticultural Science

<sup>3</sup> Hungarian University of Agriculture and Life Science, Institute of Genetics and Biotechnology

*Clematis vitalba* is a perennial climbing shrub native to Europe. It is a weed which outgrows small trees and the invasive nature of the plant also enhances its role of serving as a virus reservoir. In this study, *Clematis vitalba* plant showing virus specific symptoms was sampled at Budakeszi, Hungary. From the symptomatic plants showing line pattern and ringspots, RNA was extracted and small RNA sequencing library was prepared to enable us find out the causative agent responsible for the symptoms exhibited. Results of HTS at Illumina platform were analyzed by bioinformatic methods using CLC Genomic Workbench. The results showed that, contigs assembled had similarities to hits of RNA Ilarviruses and DNA viruses. Mapping of the small RNA reads to both Ilarvirus and DNA virus genomes showed only 35-50% coverage of the genome suggesting the presence of distinct isolate or new virus species in the sample. We are at the beginning of the validation of the small RNA HTS. For this cDNA was synthesized using Maxima Reverse Transcriptase (Thermo Fisher) and random primer. Using degenerated primers, which are able to amplify the wide range of Ilarviruses, we could successfully clone a part of the potential Ilarvirus viral RNA1 and RNA2. Phylogenetic analysis of the cloned viral plant showed that it is closely related, but not identical to American plum line pattern virus (APLPV). The validation for the presenting DNA virus is currently under progress. Although our research is far from the final result it gives a possible indication that, the causative agent present in the plant samples could be a complex infection of a possibly new isolates or even new species of an Ilarvirus and a DNA virus. The outcome presents a novel approach to help diagnose viral pathogens harbored by native species on Hungarian fields.

**Acknowledgement:** EDA is a PhD student of the Festetics Doctoral School of Environmental sciences, while FD is a PhD student of the Doctoral School of Biological Sciences at MATE.



## Webfelület a normál, tumoros és áttétes szövetek transzkriptom szintű elemzésére

Bartha Áron<sup>1,2,3</sup>, Balázs Györfly<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Semmelweis Egyetem, Bioinformatika Tanszék, Budapest

<sup>2</sup> TTK Lendület Onkológiai Biomarker Kutatócsoport, Enzimológia Intézet, Budapest

<sup>3</sup> Semmelweis Egyetem, II. sz. Gyermekgyógyászati Klinika, Budapest

**Kulcsszavak:** tumor, normál, metasztázis, génexpresszió

**Bevezetés:** Az elmúlt két évtizedben hatalmas mennyiségű, online is elérhető adatvált elérhetővé a rosszindulatú tumorok kutatásához. Ezek részben RNS szekvenálási adatokat (TCGA, TARGET, GTEx), részben gén chip alapú vizsgálatokat (NCBI-GEO) tartalmaznak. Jelenleg nincs olyan felhasználóbarát, könnyen elérhető platform, amely lehetővé teszi ezen adatbázisokon belül és ezek között a normál, tumoros és áttétes génexpressziós adatok nagy mintaszámon alapuló összehasonlítását.

**Célkitűzés:** Egy olyan webes felület létrehozása, amelynek felhasználásával összemérhetőek a normál, tumoros és áttétes génexpressziós adatok.

**Módszerek:** Munkánk során két génexpresszió mérésére alkalmas eszköz, a génchip, illetve az RNS szekvenálás adataira támaszkodtunk. A génchip adatokat az NCBI-GEO adatbázisban elérhető adatok alapján dolgoztuk fel, összesen 3180 vizsgálatot felhasználva, melyekből manuálisan választottuk ki a megfelelőnek ítélt mintákat, amelyeket a MAS5 algoritmus segítségével normalizáltunk. Az RNS szekvenálási adatokat a TCGA, a TARGET valamint a GTEx adatbázisaiból töltöttük le. A három adatbázisból összesen 23 418 minta szekvenálási adatát tudtuk felhasználni, amelyeket a DESeq2 algoritmus segítségével normalizáltunk. Az adatok kiértékeléséhez Mann-Whitney U vagy Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk.

**Eredmények:** A 3180 génchip alapú vizsgálatból összesen 33 520 minta került bevonásra, melyből 453 áttétes, 29 376 tumoros és 3691 normál típusú, összesen 38 féle szövet típusból. A TCGA adataiból 11010 mintát használtunk fel (394 áttétes, 9886 tumoros, 730 normál) amely 33 szövet típust reprezentál, a TARGET –ből 1193 minta került felhasználásra (1 áttétes, 1180 tumoros, 12 normál) 5 féle szövet típusból, míg a GTEx-ből 11 215 normál mintát sikerült kinyerni melyek 51 féle szövet típusba vannak sorolva.

**Összegzés:** Munkánk során létrehoztunk egy adatbázist, mely összesen 56 938 minta transzkriptom-szintű adatait tartalmazza. A létrehozott web platform lehetővé teszi az adatbázis korlátlan felhasználását, amellyel elérhetővé válik a normál, tumoros és metasztatikus szövetek génexpresszió szintű összehasonlítása. Az oldal elérhető a <https://tnmplot.com/> felületen.



## Az alternatív splicing vizsgálata és összefüggése a mirtronok érésével

Gál Luca<sup>1</sup>, Orbán Tamás I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Génreguláció Kutatócsoport, Eötvös Loránd Kutatási Hálózat, Természettudományi Kar, Enzimológiai Intézet, Magyar tudósok körútja 2, 1117 Budapest, Magyarország

A splicing a génkifejeződés egyik esszenciális lépése, mely során az újonnan képződött prekursor messenger-RNS (pre-mRNS) transzkriptumok érett messenger RNS-sé (mRNS) válnak. A splicing során a pre-mRNS nem kódoló intronjai először lasszószűrő szerkezetet vesznek fel, majd kivágódnak, és a kódoló exonok egyesülnek. Az intronokat szekvenciálisan konzervált szignálok által definiáljuk, melyek az 5' illesztési pont (5' splicesite, 5'SS), egy kitüntetett adenzin, az ún. elágazási pont (branch point, BP), és a 3' illesztési pont (3'SS). Ezek a cisz faktorok kulcsfontosságúak a hatékony splicing szempontjából. Az intron kivágódás és illesztés folyamatát a spliceszóma katalizálja, majd az exonok kapcsolódási pontjait egy fehérjekomplex, az exon junction komplex (EJC) jelöli ki.

A splicing folyamata nem csak az mRNS érésben játszik fontos szerepet, hanem a génregulációjában kiemelkedő szerepet betöltő mikroRNS-ek (miRNS) egy alcsoportjának, az intronikus környezetből érő mirtronok képződésében is. A mirtronokat a hagyományos érő miRNS-től az különbözteti meg, hogy a splicing apparátust használják a Drosha/DGCR8-komplex helyett érésük során. Ebben az esetben a hajtúszzerű prekursor-mikroRNS-ek (pre-miRNS) a splicing során képződött lasszószűrő intronokból jönnek létre, majd az érési folyamat ezt követően a kanonikus miRNS útvonal további komponenseit használva folytatódik.

Kutatócsoportunk korábban az emlős mirtronok érésének folyamatát vizsgálta (Schamberger A, Sarkadi B, Orbán TI., 2012), mely során az EGFP egyetlen exonját megosztották úgy, hogy közéjük mesterségesen intron legyen beilleszthető. Különböző prediktált mirtron géneket (köztük a hsa-miR-1226-ot vagy a hsa-miR-1233-at) intronként illesztettek be, valamint kontrollként egy kanonikus miRNS gént, a hsa-miR-33b-t, a határoló rövid intron szekvenciával együtt. Jelenlegi kutatásaink során, ezeken a konstrukciókat HEK-293 sejtvonalon kifejeztetve vizsgáltuk a splicing hatékonyságát, és az azt befolyásoló szekvenciális elemeket. Kiderült, hogy az 5'SS mutációja esetén az eredeti exonok ugyan nem kapcsolódtak össze, és funkcionális EGFP fehérje sem képződött, ugyanakkor megjelent egy alternatív mRNS izoforma, amely egy korábban nem detektált, alternatív 5'SS hely használatával keletkezett. Megfigyeltük továbbá, hogy az intron szekvenciája befolyásolja az alternatív splicing hatékonyságát, feltételezésünk szerint a BP elérhetőségének, az intron másodlagos szerkezetének függvényében. Vizsgálataink során célul tűztük ki, hogy felderítsük a splicing alternatív 5'SS választásának részleteit a mirtronok érésének kontextusában. Távlati célunk továbbá hogy kiderítsük, vajon az alternatív 5'SS hely elérhetetlensége esetén folytatódik-e a splicing menekítése, és ez milyen hatékonysággal megy végbe a különböző mirtronok esetében. Az előadás során a projekt eddig elért eredményei kerülnek bemutatásra.

A projekt az Új Nemzeti Kiválóság Program keretei között valósul meg (azonosító: ÚNKP-20-3-I-ELTE-473), melyet az Innovációs és Technológiai Minisztérium, valamint a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap támogat.



## RNS interferencia alapú géncsendesítés optimalizálása egy jól kiegyensúlyozottan kétirányú promóter használatával szomatikusan transzgenikus egérmódelben

Kopasz Anna Georgina

ELKH SZBK Genetikai Intézet, Szeged

Évtizedeken keresztül a legelterjedtebb állatmodellt a klasszikus knockout (KO) egértörzsek jelentették gének funkcióvesztéses fenotípusának vizsgálatára. Azonban ezen modellek használata rendkívül költséges hiszen minden gén vizsgálatához új egértörzset kell létrehozni, továbbá számos gén kiütése a csírvonalsejtekben embrionális letalitáshoz vezet, megakadályozva ezzel az egértörzs létrehozását. Az RNS interferencia (RNSi) alapú géncsendesítés és a szomatikus transzgenézis kombinálása azonban jó alternatívát jelenthet a klasszikus KO egértörzsek használatára.

Ezért célul tűztük ki egy olyan szomatikusan transzgenikus egérmódel létrehozását, amelyben mint egyetlen tesztrendszerben bármely gén funkcióvesztéses fenotípusa modellezhető.

Laboratóriumunkban gének funkcióvesztéses fenotípusának modellezésére miRNS alapú géncsendesítést használunk. Eddigi kísérleteink alapján az *in vitro* tumorsejt modellekben alkalmazott magas miRNS expressziós szintek gyakran toxikusnak bizonyulnak állatmodellünkben. Ezért érdeklődésünk a mérsékelt expressziós szintet biztosító egér endogén promóterek felé irányult. Ezzel összhangban egy olyan modellrendszer, melyben egy adott gén miRNS alapú géncsendesítéssel létrehozott funkcióvesztéses fenotípusa mellett egy másik gén funkciónyereses fenotípusa is egyidejűleg tanulmányozható új lehetőségeket nyithat meg számos emlős gén funkciójának részletes megismerésében. Több gén koexpresszióját és a mérsékelt génextpressziós szint létrehozását is hatékonyan megoldaná egy kiegyenlített kétirányú aktivitással bíró, endogén génextpressziós szintet biztosító promóter, azonban a jelenlegi biotechnológiai eszköztárban nem található olyan, amely jól használható lehetne kísérleti rendszerünkben.

Ezért célunk volt számos egér endogén promóter aktivitásának *in vitro* vizsgálata. *In vitro* kísérleteink során mCherry és GFP fehérjét egyaránt expresszáló sejt kultúra párokat használtunk az egyes promóterek sense és antisense aktivitásának összehasonlításához. Ezt követően kiválasztottam a legkiegyenlítettebb kétirányú aktivitást mutató promótert *in vivo* kísérleteink elvégzéséhez.

Szomatikusan transzgenikus egérmódelünkben, a hepatociták genetikailag megváltoztathatóak a *Fah* terápiás gén, mint szelekciós markergén bejuttatásával. Ezért egy olyan transzpozon plazmid konstrukciót készítettem el molekuláris klónozással, amely hordozza a *Fah* terápiás gént, az mCherry marker fehérje génjét egy hosszú intronnal és a GFP marker gént. Ezt követően az elkészült plazmidba egy a GFP mRNS-sel komplementer amiR struktúrát építettem. Ezután az egyes transzpozon plazmidokat és transzpozált kódoló helper plazmidot tartalmazó plazmid keverékek hidrodinamikai oltását követő öt hónap elteltével, mind az állatok májában végzett sztereomikroszkópos vizsgálatok mind pedig az RT-qPCR mérések is igazolták az mCherry és a GFP markergének összemérhető kifejeződését, tehát kétirányú promóterünk *in vivo* is megőrizte kiegyenlített kétirányú aktivitását. Továbbá a sztereomikroszkópos vizsgálatok nagymértékű GFP fluoreszcencia intenzitás csökkenést mutattak a miRNS jelenlétében. Ezzel összhangban a miRNS jelenlétében mind az RT-qPCR, mind pedig a Western Blot vizsgálatok is kimutatták a GFP expressziójának nagymértékű csökkenését. Az eddigi eredményeinkből következik, hogy robusztus géncsendesítést tudunk előidézni állatmodellünkben és a mérsékelt génextpressziós szint alkalmazásával elkerülhetővé vált az *in vivo* toxicitás.

A kutatás a Szegedi Tudós Akadémia program (FEIF/433-4/2020-ITM\_SZERZ) és az Új Nemzeti Kiválósági Program (ÚNKP-20-2-SZTE-438) támogatásával készült.



## Effects of miRNA precursor structures on AGO1 loading

Fabio Miloro<sup>1</sup>, Zoltán Havelda<sup>1</sup> and Ágnes Dalmadi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Genetics and Biotechnology, Hungarian University of Agriculture and Life Sciences (MATE), 2100 Gödöllő, Hungary*

miloro.fabio@phd.uni-mate.hu

RNA interference (RNAi) is a fundamental and widespread regulatory mechanism and mediates sequence-specific regulation of target RNAs by the action of small non-coding 20–24 nucleotide long RNAs such as miRNAs and siRNAs. In plants, various RNAi pathways play a crucial role in different developmental processes and responses to biotic and abiotic stress factors. In the cytoplasm, the miRNA loaded AGO1 containing RNA-induced silencing complex (RISC) mediates the sequence-specific repression of target RNAs via mRNA-cleavage or translational repression. Previous studies have identified three pools of sRNAs based on the mobility of nucleoprotein complexes and that miRNAs have different RISC-loading efficiencies indicated by their different distribution between the AGO-bound and -unbound pools. The miR168 and its target, AGO1 mRNA, are transcriptionally co-regulated in terms of time and space. Besides, AGO1 protein regulates the level of the miRNA itself, as well as being adjusted by it. Most miR168 are detected in the AGO-unbound pool, showing a low-efficiency loading into RISC to maintain fine-tuning of the RNA interference in plant. Furthermore, the analysis of different *Arabidopsis* miRNAs showed a different pattern in the loading efficiency into HMW RISC. Since miR171a shows a higher loading efficiency, we decided to investigate if the miR171a precursor structures and the different orientations of the duplex could influence this mechanism.

In this study, we have investigated in *Arabidopsis* the loading efficiency into RISC through the interchange of miR168 and miR171a precursor structures.

Firstly, we analyzed the effects of the overexpression of the hairpin-containing primary transcripts (pri-miRNAs) on the incorporation of mature miRNAs into AGO1, finding an accumulation of miR168 and miR171a in unbound and HMW RISC pool, respectively, without changes in the loading efficiency. These results support the pivotal role of pri-miRNA structures in determining the HMW RISC loading efficiencies of various miRNAs. To further prove this function, we have designed several amiRNAs, keeping the same duplex sequence, but swapping the precursor structures and inverting the mature strand and the star strand in the duplex of the two pri-miRNAs. These constructs were: amiR\_5 (amiR168 with stem/loop from miR171a and inverted duplex), amiR\_6 (amiR168 with stem/loop from miR171a) and amiR171a (stem/loop from miR168 and inverted duplex). In the transient assay, amiR\_5 showed a better cleavage of AGO1-GFP sensor mRNA compared with amiR\_6 and overexpressed miR168a. Transgenic amiR\_5 line showed a more severe phenotype than the others, as stronger delay in flowering and smaller curly leaves. Using gel-filtration to analyze the RISC-loading efficiency, we found a 4-fold increase of loading in HMW RISC of amiR\_5 compared to the other 2 lines. To confirm the opposite effect, we tried to decrease the loading efficiency of miR171a by establishing transgenic *Arabidopsis* lines of miR171a overexpressed and amiR171a. The phenotype of amiRNA plants was less severe than that of MIR171\_ox ones. To further confirm the results, we performed a gel-filtration assay and observed in amiR171a lines a 43% reduction in loading efficiency compared with MIR171a\_ox lines.

These findings suggest the relevance of different miRNA precursor structures in the RISC-loading efficiency, supporting previous observations on the role of duplex structure modification, allowing fine-tuning of the activity of different miRNAs on their gene targets.



## Fázisszeeparált granulomok szerepe a génexpresszió szabályozásában

Szatmári Orsolya<sup>1</sup>, Györkei Ádám<sup>3</sup>, Igaz Nóra<sup>1</sup>, Dr. Rázga Zsolt<sup>2</sup>, Dr. Kiricsi Mónika<sup>1</sup>, Prof. Dr. Boros Imre Miklós<sup>1</sup>, Dr. Villányi Zoltán<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

<sup>2</sup>Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Patológiai Intézet

<sup>3</sup>Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémiai Intézet

Kutatómunkánk fókuszában a fázisszeeparált granulomok – asszemblizómák - vizsgálata áll. Nemrégiben került napvilágra, hogy az Rpt1 és Rpt2 fehérjék, melyek a proteasóma szomszédos alegységei, ko-transzlációsán szerelődnek össze, és az összeszerelődés helyszínéül EDTA és RNáz rezisztens, Not1 tartalmú granulomok szolgálnak, melyeket Not1 tartalmú asszemblizómáknak neveztek el (NCA). Célunk az Rpt1 és Rpt2 tartalmú asszemblizómákhoz hasonló granulomok azonosítása és azok jellemzése.

Bioinformatikai elemzésekkel sikerült olyan fehérjét azonosítanunk, melyek nagy valószínűséggel fázisszeeparált granulomokban tárolódnak. Ezen jelöltek közül az Sgs1 fehérjét vizsgáltuk downstream kísérleteinkben, amely egy DNS helikáz és a kettősszalú DNS károsodások javításában játszik szerepet, az STR (Sgs1-Top3-Rmi1) komplex részeként. Sikerült kimutatnunk az Sgs1 jelenlétét az EDTA rezisztens granulomokban előbb RNS, majd fehérje szinten is. Élesztőkön végzett túlélési tesztek igazolták, hogy 1,6-Hexanediol (mely egy szerves oldószer, és a fehérje-fehérje, illetve fehérje-RNS közti gyenge hidrofób kölcsönhatásokat bontja meg) hozzáadása mellett a sejtek érzékenyebbek az ismételt UV kezelésre. Ez az eredmény arra utal, hogy a granulomokban olyan fehérjék tárolódnak, melyek a stresszválaszban játszanak szerepet, illetve hogy a granulomok fázisszeeparációval jönnek létre. Kísérletes eredményeink azt mutatják, egybehangzóan a fellelhető szakirodalommal, hogy ezekben a granulomokban jelen van a transzlációban megakadt RNS az öt transzláló riboszómával, valamint a riboszómából kilógó naszcens fehérje láncsal együtt. Mivel az Sgs1 fehérje mellett számos olyan fehérjét azonosítottunk *in silico*, melyek a DNS repair folyamatokban játszanak szerepet, ezért megvizsgáltuk az A549 tudó adenokarcinóma sejtvonalat, melyről ismert, hogy sugárrezisztens, feltételezve, hogy a rezisztencia a fázisszeeparált granulomokhoz kapcsolódik. Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatokkal sikerült azonosítani a riboszóma csoportosulásokat a citoplazmában, és azt is bizonyítottuk, hogy ezek a sötétén festődő, gyűrűszerű struktúrák 1,6-Hexanediol érzékenyek. Ismételt besugárzást követően végzett túlélési tesztheink eredményei azt sugallják, hogy kapcsolat van az 1,6-Hexanediol érzékeny gyűrűszerű-riboszómális struktúrák és a DNS károsodásra adott válasza között.

Úgy véljük, hogy a gyakran visszatérő környezeti stresszhatások esetében alapvető jelentősége van a fázisszeeparációnak a válaszreakció felgyorsításában, mivel ez a szabályozás lehetővé teszi, hogy a megtermelt mRNS-ek az őket transzláló riboszómákkal a lebomlás helyett granulomokban tárolódnak a stresszhatás elmúltával.