

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS-JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR-JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Liina Küttis

DNA metülatsiooni roll mikroRNAde ekspressiooni regulatsioonis

Bakalaureusetöö

Juhendaja PhD Tarmo Annilo

TARTU 2013

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	5
1.1 MiRNAd	5
1.1.1 MiRNAd – olemus ja biogenees	5
1.1.2 MiRNAd roll.....	6
1.1.3 MiRNAd funktsioneerimine.....	7
1.1.4 MiRNAd regulatsioon	7
1.1.5 MiRNA ekspressiooni profiilid.....	9
1.2. MiRNA geenide epigeneetiline regulatsioon	9
1.2.1 Metülatsioon.....	9
1.2.1.1 Metülatsiooni roll.....	9
1.2.1.2 DNA metüültransferaasid (DNMT)	10
1.2.1.3 Metüleeritud DNA ülegenoomse detekteerimise võimalusi	10
1.2.1.4 MiRNAd metülatsioon ja kasvajate areng.....	11
1.2.2 Histoonide modifikatsioonid	13
2. UURIMUS	15
2.1 Töö eesmärgid.....	15
2.2 Materjal ja meetodika	15
2.2.1. 450K kiibil olevate CpGde paiknemine miRNA geenide suhtes.....	15
2.2.2 450K kiibil olevate CpGde paiknemine miRNA geenide oletatavate promootoralade suhtes	16
2.3 Tulemused ja arutelu	16
2.3.1 MiRNAdega seotud CpGd	16
2.3.2 MiRNA geenide oletatavate promootoraladega seotud CpGd.....	19
KOKKUVÕTE	21
SUMMARY.....	22
KASUTATUD KIRJANDUS	23
LIHTLITSENTS	27

KASUTATUD LÜHENDID

450K kiip – Illumina HumanMethylation450 chip

AdoMet – S-adenosyl-L-methionine (S-adenosüül-L-metioniin)

CLL – chronic lymphocytic leukemia (krooniline lümfaatiline leukeemia)

DNMT – DNA methyl transferase (DNA metüültransferaas)

H2A.Z – variant of histone H2A (histoon 2A variant Z)

H3K4me1 – monomethylation of histone H3 at lysine 4 (histoon 3 neljandas positsioonis oleva lüsiini monometülatsioon)

H3K4me2 – dimethylation of histone H3 at lysine 4 (histoon 3 neljandas positsioonis oleva lüsiini dimetülatsioon)

H3K4me3 – trimethylation of histone H3 at lysine 4 (histoon 3 neljandas positsioonis oleva lüsiini trimetülatsioon)

H3K9me1 – monomethylation of histone H3 at lysine 9 (histoon 3 üheksandas positsioonis oleva lüsiini monometülatsiooni)

miRNA – microRNA (mikroRNA)

NSCLC – non-small cell lung cancer (mitteväikerakuline kopsuvähk)

pre-miRNA – precursor microRNA (prekursor mikroRNA)

pri-miRNA – primary microRNA (esmane mikroRNA)

RISC – RNA-induced silencing complex (RNA poolt indutseeritud vaigistuskompleks)

Rnase III – ribonucleas III (ribonukleas III)

TSS – transcriptional start site (transkriptsiooni algussait)

UTR – untranslated region (mittekodeeriv ala)

Sissejuhatus

Geeniekspressiooni regulatsioon leiab aset väga erinevatel tasemetel: 1) genoomne – DNA pakkimine ning genoomne imprinting; epigeneetilised modifikatsioonid nagu metülatsioon, kromatiini struktuuri muutused ja histoonide modifikatsioonid; 2) transkriptsiooniline – hõlmab transkriptsioonifaktorite ja RNA polümeraasi seondumist, võimendajate ja vaigistajate kohalolekut. Peamiseks geeniregulatsiooni kontrollimise etapiks on transkriptsiooni initsiatsioon, mis on reguleeritud põhiliselt ekstratsellulaarsete signaalide poolt 3) post-transkriptsiooniline:

- RNA protsessimine (splaissimine, 5`cap ja polü-A saba lisamine)
- mRNA transport ja lokaliseerumine;

4) translatsiooniline – initsiatsiooni ja repressiooni faktorid, nende hulgas ka miRNAd; 5) post-translatsiooniline – valgu protsessimine, seondumine ja lagundamine, keemiliste rühmade lisamine, lõikamine, voltimine, import organellidesse.

MikroRNAd (miRNA) – väikesed, mittekodeerivad RNAd – on olulised post-transkriptsioonilised geeniregulatsiooni faktorid, mis põhjustavad mRNAdega seondudes nende lagundamise. Üheks võimalikuks miRNAd ekspressiooni reguleerimise mehhanismiks on DNA metüleerimine.

DNA metülatsioon on epigeneetiline modifikatsioon, mis põhjustab geenide ekspressioonitaseme muutusi, takistades transkriptsioonifaktorite seondumist promootoralale. Transkriptsiooni seisukohalt oluline metülatsioon leiab aset CpG rikastes piirkondades, mida nimetatakse CpG saarteks (Tang jt. 2009). CpG rikkaid regioone on inimese genoomis umbes 29000, mis moodustavad 1% kogu genoomist (Tang jt. 2009). Ligikaudu pooled geenidest omavad promootoralaga seotud CpG saarekesi (Antequera and Bird 1993).

Laialdaselt kasutatav Illumina metülatsioonikiip katab firma poolt toodud andmete põhjal ka miRNA promootoralasid. Mitmeetapilisest biogeneesist tulenevalt on miRNAd puhul promootorpiirkonna eksperimentaalne tuvastamine ja bioinformaatiline ennustamine aga oluliselt keerukam kui kodeerivate geenide puhul.

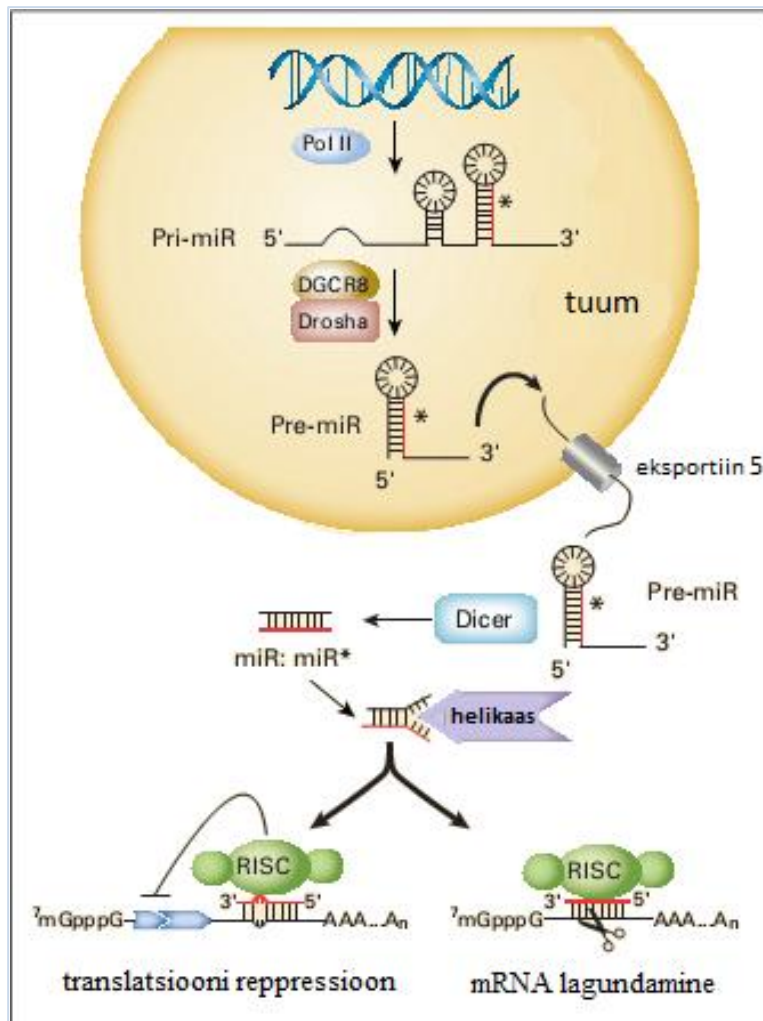
Käesoleva töö eesmärgiks oli täpsemalt kaardistada Illumina poolt väidetavalt miRNAdega assotsieerunud CpG dinukleotiidide positsioone ja võrrelda neid eksperimentaalselt tõestatud miRNAd promootoraladega.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 MiRNAd

1.1.1 MiRNAd – olemus ja biogenees

Mikro-RNAd (miRNAd) on väikesed mittekodeerivad 18-25 nukleotiidi pikad üheaahelised RNA molekulid, mis reguleerivad geenide ekspressiooni (Lee, Ambros 2001; Lau jt. 2001; Lagos-Quintana jt. 2001). Esimesteks avastatud miRNAdeks olid *lin-4* and *let-7* (Lee jt. 1993). MiRNAd sünteesitakse RNA polümeraas II poolt pikkade, kuni mitme tuhande nukleotiidini ulatuvate, esmaste transkriptidena (pri-miRNA), mis lõigatakse ribonukleas Drosha poolt ~70 nukleotiidi pikkusteks juuksenõela struktuuri sisaldavateks oligonukleotiidideks ehk pre-miRNAdeks (prekursor miRNA) (Lau jt. 2001; Lagos-Quintana jt. 2001; Lee jt. 2002; Lee jt. 2003). Drosha on ~160kDa suurune tuumasisene valk, mis koosneb kahest ribonukleas IIIst (Rnase III) ja kaheaahelalisest RNAd siduvast domäänist (Wu jt. 2000; Han jt. 2004). Rnase III ensüümid kuuluvad klass II proteiinide hulka ja on kõrgelt konserveerunud kaheaahelalise RNA endonukleasid (Wu jt. 2000; Han jt. 2004). Pre-miRNAd transporditakse tuumast tsütoplasmasse eksporditiin 5 abil (Lund jt. 2004). Eksporditiin 5 peamiseks ülesandeks ongi tõenäoliselt pre-miRNAd transportimine tuumast välja, kuigi ta toimib ka teisejärgulise tRNAd transporterina, sidudes kaheaahelalist RNAd järjestusest sõltumatult (Bohnsack jt. 2004). Tsütoplasmas toimub järgmine lõikamine ribonukleas Dicer poolt (Hutvågner jt. 2001), mis on samuti kõrgelt konserveerunud klass III proteiin ja on olemas kõigis eukarüootsetes organismides. Selle tulemuseks on kaheaahelaline 18-25 nukleotiidi pikk miRNA, mis lülitatakse RNA poolt indutseeritud vaigistuskompleksi (RISC - RNA-induced silencing complex) koosseisu, kus toimub ahelate eraldamine ning saateahela degradeerimine (Hammond jt. 2000; Hutvågner ja Zamore 2002). RISC katalüütilise tsentri imetajates moodustab Argonaut perekonda kuuluv valk Argonaute2 (Ago2), mis vastutab mRNA äratundmise ja endonukleasse lagundamise eest (Liu 2004).



Joonis 1. MiRNA biogeneesi rada. miRNAd transkribeeritakse peamiselt RNA pol II poolt esmaste miRNA transkriptidena, millelt eemaldatakse enne tsütoplasmasse transportimist ensüüm Drosha kompleksi poolt 5`cap ja polü-A saba. Tsütosoolis toimub edasine lõikamine Diceri poolt ja sidumine RISC koosseisu, kus toimub translatsiooni repressioon või ideaalse paardumise korral sihtmärk mRNA lagundamine.

1.1.2 MiRNAde roll

MiRNAd moodustavad olulise geeniekspressiooni regulaatorite klassi tänu oma võimele moduleerida ekspressiooni, ilma seda täielikult maha surumata. Hinnatakse, et miRNAd reguleeruvad rohkem kui 30% inimese mRNAdest ning mängivad tähtsat rolli sellistes fundamentaalsetes protsessides nagu organismi areng ja diferentseerumine ning rakkude proliferatsioon, apoptoos, stressivastus ja rasvade metabolism (Calin jt. 2004; Kumar jt. 2008). Seega omavad miRNAd suurt rolli erinevate haigusseisundite kujunemises, eriti suurt tähelepanu on

pälvinud nende osa just tumorigeneesis. Enamikes vähikolletes erineb miRNA ekspressioon tervetest kudedest (Zhang jt. 2006). Ülegenoomiline profileerimine on näidanud, et selline ekspressiooni erinevus võimaldab väga täpselt eristada erinevaid vähitüüpe. MiRNAd mängivad olulist rolli ka kasvaja arengus, funktsioneerides nii tuumorsupressoritena kui ka onkogeenidena, sealjuures on paljude miRNAd aktiivsus vähitüübi spetsiifiline (Lujambio jt. 2008).

1.1.3 MiRNAd funktsioneerimine.

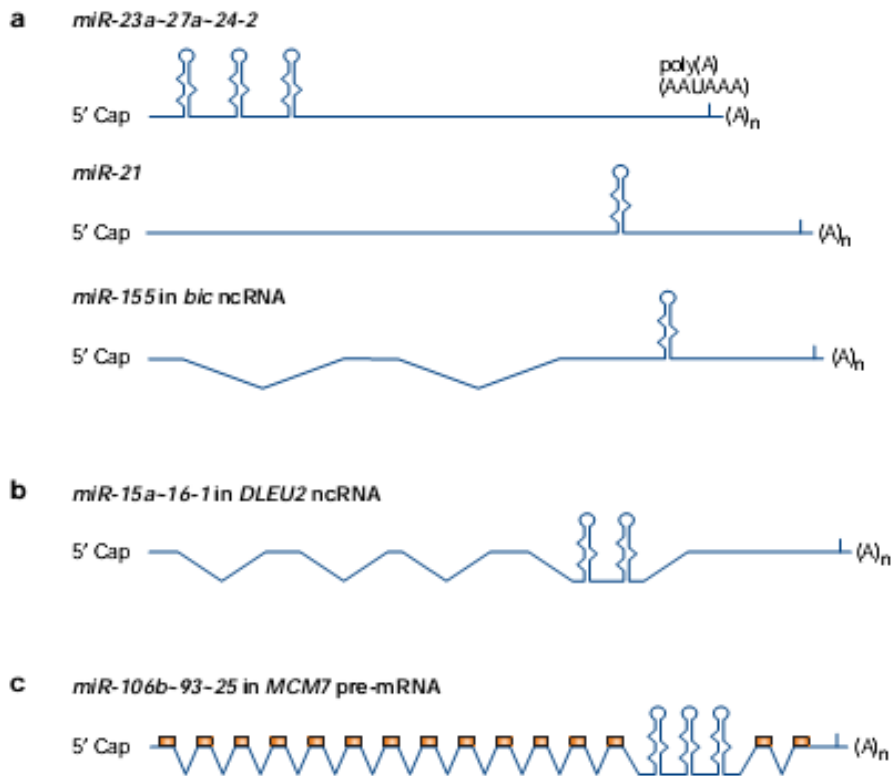
RISC on valgukompleks kus toimub ka interaktsioonide loomine miRNA ja sihtmärk-mRNA vahel (Hammond jt. 2000; Hutvågner ja Zamore 2002). Sihtmärgiga seondumine toimub komplementaarsuse alusel miRNA 5`otsa 2. – 8. nukleotiidi ja sihtmärk - mRNA 3`UTR vahel (Lewis jt. 2003). MiRNA seondumiseks piisab osalisest komplementaarsusest sihtmärkgeeniga, tänu sellele võib ühel miRNA olla mitu sihtmärki (Brennecke jt. 2005). Kui toimub miRNA ja mRNA perfektne paardumine, algatab RISC mRNA degradatsiooni (Bartel 2009). Mittekorrektse paardumise korral surutakse esmalt alla valgu translatsioon, millele võib järgneda ka mRNA lagundamine (Djuranovic, Nahvi, Green 2012). Hoolimata sellest, milline on miRNA ja mRNA vaheline paardumine, on tulemuseks mRNA poolt kodeeritava valgu hulga vähenemine (Garzon jt. 2010).

Igal miRNA perekonnal võib olla kuni 500 sihtmärkgeeni (Lewis jt.2003; Garzon jt. 2010). Ligikaudu 60% mRNA del on vähemalt üks konserveerunud järjestus, mis võib olla miRNA sihtmärgiks (Garzon jt. 2010). Sageli võib ühe geeni 3`UTR olla sihtmärgiks mitmele erinevale miRNAle (Lewis jt. 2003). Lisaks tavapärastele seondumistele, on leitud ka, et mõned miRNAd võivad seonduda kodeerivale alale või 5`UTR regiooni (Ørom jt. 2008).

1.1.4 MiRNAd regulatsioon

MiRNAd regulatsioonist on praeguseks suhteliselt vähe infot nende genoomis paiknemise iseärasuste tõttu (joonis2). Ligikaudu 50% miRNAdest asuvad genoomi fragiilsetes piirkondades või regioonides, mis on inimese kasvajates amplifitseerunud või deleteerunud (Calin jt. 2004). MiRNA erinev ekspressioon kasvajates ja normaalsetes kudedes võib olla tingitud genoomi ümberkorraldustest või promootorregioonide muutunud metülatsiooni tasemest. Samuti võivad miRNAd deregulatsiooni põhjuseks olla somaatilised punktmutatsioonid. Lisaks võivad miRNAd ekspressiooni muutused olla tingitud ka DNA koopiaarvu muutustest miRNA gene sisaldavates regioonides, aga ka miRNAd biogeneesi rajas osalevate ensüümide geenides, nagu on täheldatud

Dicer1 ja Argonaute2 puhul munasarjaaksvajas (Zhang jt. 2006). Näiteks vähiga seotud miRNAde, peamiselt just mir-200 perekonna, ekspressiooni mõjtavad p53 perekonna (p53, p63, p73) valgud (Knouf jt. 2012). P53 valkude perekonna valgud on transkriptsioonifaktorid (TF), praeguseni eriti p53, mis on seostatud kasvaja välja kujunemisega. Hulk miRNAsid asuvad kodeerivate geenide intronites ning tõenäoliselt transkribeeritakse koos vastava mRNAga (Zhang jt. 2006).



Joonis 2. Kirjeldab miRNAde paiknemist genoomis. a) eksoonsed miRNAd mittekodeerivate transkriptidena – miR-23a-27a-24-2 transkribeeritakse klastrina; b) introonsed miRNAd mittekodeerivates transkriptides; c) introonsed miRNAd proteiini kodeerivate transkriptide osana (Kim 2005).

Leitud on seoseid ka miRNAde regulatsioonis sõltuvalt kasvaja staadiumist ning haige paranemisest. See lubab oletada, et miRNA regulatsiooni muutus avaldab otsest mõju kasvaja arengule. Näiteks on leitud, et madal let-7 ja kõrge miR-155 tase on seotud madala elulemusega mitteväikerakulise kopsuvähiga (NSCLC) patsientide hulgas (Kumar jt. 2008; Takamizawa jt. 2004; Xie jt. 2010). miR-17 ja miR-21 ülesregulatsioon käärsoole-, rinna-, mao-, eesnäärme- ja

pankreasevähis on kinnitatud korduvate uuringute käigus erinevatel patsientide gruppidel (1). Sarnased tulemused on olnud ka teiste vähitüüpide puhul (1). miR-29 on aga allareguleeritud kroonilise lümfaatilise leukeemia, akuutse müeloidse leukeemia, rabdomüoomi, mantelrakulise lümfoomi, kopsu-, rinna- ja maksavähi puhul (1). Mir-17 – 92 polütsistronne klaster inimese 13q31 kromosoomis on sageli amplifitseerunud lümfoomides (He jt. 2005). Mir-17 – 92 klaster on transkriptsiooniliselt aktiveeritud tuntud onkogeeni, c-myc, poolt, ning nende miRNAde kunstlik ekspressioon lümfoomi mudelhiirtes viib väljakujunenud ja veelgi agressiivsema haiguse tekkele (O'Donnell jt.2005; He jt. 2005). On leitud ka miRNAsid, mis on omased kasvaja varasele arengustaadiumile või metastaasidele. See annab võimaluse kasutada miRNAde ekspressiooniprofiili ravi optimeerimiseks vastavalt patsiendi seisundile.

1.1.5 MiRNA ekspressiooni profiilid

MiRNA ekspressiooni profiilid koostatakse suure hulga kasvaja proovide analüüsi tulemusena, et saada infot kasvajate fenotüüpide kohta, mis teeb võimalikuks ebaselge päritoluga metastaaside klassifitseerimine. See omadus on oluline eelkõige selle tõttu, et ligikaudu 5% -l juhtudest on avastamise ajaks tegemist metastaatilise kasvajaga, mis 85% puhul tähendab surma ühe aasta jooksul (Brigden ja Murray 1999;). Varane kasvaja päritolu kindlakstegemine annab võimaluse sihipäraseks raviks ning välistab vajaduse empiirilise kemoteraapia järele, millel on vähene efektiivsus ning hulgaliselt ebasoovitavaid kõrvalnähte (Cummins ja Velculescu 2006). Kroonilise lümfaatilise leukeemia (CLL – chronic lymphocytic leukemia) ja kopsuvähi puhul on teatud spetsiifilised ekspressiooni mustrid seotud kas heade või halbade ravi väljavaadetega, võimaldades rakendada kehvade võimalustega patsientidele agressiivsemat ravi või saada palliativset hooldust (Cummins ja Velculescu 2006).

1.2. MiRNA geenide epigeneetiline regulatsioon

1.2.1 Metülatsioon

1.2.1.1 Metülatsiooni roll

DNA metülatsioon on oluline epigeneetiline mehhanism, mis vastutab geeniekspressiooni ja genoomi terviklikkuse eest (Tang jt. 2009). Metülatsiooni rolliks on geeniekspressiooni mahasurumine, tagades kromosoomide stabiilsuse, telomeeride pikkuse säilitamise ning koespetsiifilise geenide avaldumise. Selgroogsetes on kõige levinum DNA metülatsiooni vorm 5-

metüülsütosiin (5mC), mis esineb 70 – 80% CpGdest. DNA metülatsioon omab tähtsat rolli paljudes erinevates bioloogilistes protsessides, nagu genoomne imprinting, transposaalsete elementide vaigistamine, tüvirakkude diferentseerumine, embrüonaalne areng ja küpsemine (Bock 2012). Promootorpiirkonna CpG saarte hüper- või hüpometülatsioon on miRNAde ekspressiooni muutuste üks sagedasemaid põhjuseid. Seega mängib DNA metülatsioonimustri muutumine rolli nii vähi kui ka teiste haiguste kujunemisel. MiRNAde promootoreid saab kindlaks teha näiteks RNA polümeraas II-e ja histoon 3 neljandas positsioonis oleva lüsiini trimetülatsiooni (H3K4me3) (tuntud aktiivse transkriptsiooni kromatiini modifikatsioon) olemasolu kaudu (Baer jt. 2012).

Ülegenoomsed metülatsiooni uuringud on tõestanud, et metülatsioon mõjutab transkriptsiooni sõltuvalt asukohast geeni suhtes. Näiteks kui metüleeritud regioon asub transkriptsiooni algussaidi (TSS) vahetus läheduses toimub initsiatsiooni blokeerimine, samas kui geeni enda metülatsioon võib hoopis soodustada transkriptsiooni elongatsiooni ning mõjutada ka splaiisingut (Jones 2012).

1.2.1.2 DNA metüültransferaasid (DNMT)

Metülatsiooni eest vastutavad metüültransferaasid: DNA metüültransferaas 1 (DNMT1), DNA metüültransferaas 3a (DNMT3a) ja DNA metüültransferaas 3b (DNMT3b). Kõik DNMTd omavad C-terminuses katalüütilist domeeni, mis sisaldab mitmeid α -heeliksi ja β -lehe motiivi (Tang jt. 2009). DNMTd sisaldavad kuut tugevalt konserveerunud aminohappe elementi, mida nimetatakse I, IV, VI, VIII, IX ja X. Motiivid I ja X moodustavad enamuse S-adenosüül-L-metioniin (AdoMet) seondumissaidist (Tang jt. 2009), mis on DNA metüültransferaaside metüülrühma doonoriks (Santi jt). DNMTe afiinsus hemimetüleeritud DNAdes suhtes on 7-21 korda suurem kui metüleerimata substraatide suhtes (Tang jt. 2009).

1.2.1.3 Metüleeritud DNA ülegenoomse detekteerimise võimalusi:

- 1) Metülatsioonitundlike restriksiooniensüümide ja DNAGA seonduvate metülatsioonitundlike valkude kasutamine, mida detekteeritakse II põlvkonna sekveneerimise abil;
- 2) metüül-DNA immuunsadestamine – eraldatud ja puhastatud DNA fragmenteeritakse ja denatureeritakse ning seejärel sadestatakse kasutades 5mC vastaseid antikehi või rekombinantset valku ;
- 3) DNA töötlemine bisulfitiga – bisulfit töötlus muudab metüleerimata C-d U-deks, mis PCRi käigus amplifitseeritakse T nukleotiidena. Bisulfitiga töödeldud DNA analüüsimiseks võib kasutada näiteks firma Illumina HumanMethylation450 kiipi (edaspidi 450K kiip). See kiip võimaldab analüüsida rohkem kui 485 000 potentsiaalselt metüleeritavat positsiooni inimese

genoomis. Kuid parima aluspaarilise täpsuse annab sekveneerimine. Bisulfit töötamise probleemiks on see, et see meetod ei suuda eristada 5mC-d 5-hüdroksümetüültsütosiinist. Lahenduseks võib olla paralleelanalüüs näiteks SNPdega, mis võimaldab oodatavate ja katsetulemuste kalibratsiooni (Jones 2012).

1.2.1.4 MiRNAde metülatsioon ja kasvajate areng

Praeguseks on kindlaks tehtud rida miRNAsid mis on mõjutatud CpG saarte metülatsiooni poolt. Sageli on hüpermetülatsiooni tagajärjeks kasvaja areng, sest see põhjustab tuumor-supressorite transkriptsiooni vaigistamise. MiRNAd mõjutavad olulisel määral kasvajate arengut ja metastaseerumist. Näiteks on metastaseerumine – sageli läbi lümfiteede - surma põhjuseks 90%-l tahkete kasvajate juhtudest (Lujambio jt. 2008). miR-148, miR-34b/c ja miR-9 epigeneetiline vaigistamine CpG hüpermetülatsiooni kaudu on märkimisväärselt seotud lümfisõlmede abil metastaseeruvate kasvajatega (Lujambio jt. 2008). Kui miR-10b põhjustab rakkude migratsiooni ja invasiooni läbi homeobox D10 inhibitsiooni ning miR-373 ja miR-520c soodustavad metastaseerumist tänu CD44 mahasurumisele, siis miR-126 ja miR-335 käituvad hoopis metastasi supressoritena (Lujambio jt. 2008). Kui enamasti on kasvajate puhul tegemist hüpermetülatsiooniga, siis näiteks kroonilise lümfatilise leukeemia (CLL) puhul omab suuremat rolli just hüpometülatsioon, sest CLLi puhul on suurem osa miRNAdest pigem üles kui alla reguleeritud (Baer jt. 2012). Hüpometülatsioon leiab sageli aset just CpG vaesetes piirkondades, mistõttu on teda ka vähem uuritud (Baer jt. 2012).

Tabel 1. MiRNA geenide promotoralade metülatsioonitaseme muutuste seos kliinilise pildiga. Tabelis on toodud artiklitsest leitud korrelatsioonid kliinilise pildi ja miRNade metülatsioonitasemete muutuse vahel. (Tabel jätkub järgmisel lehel).

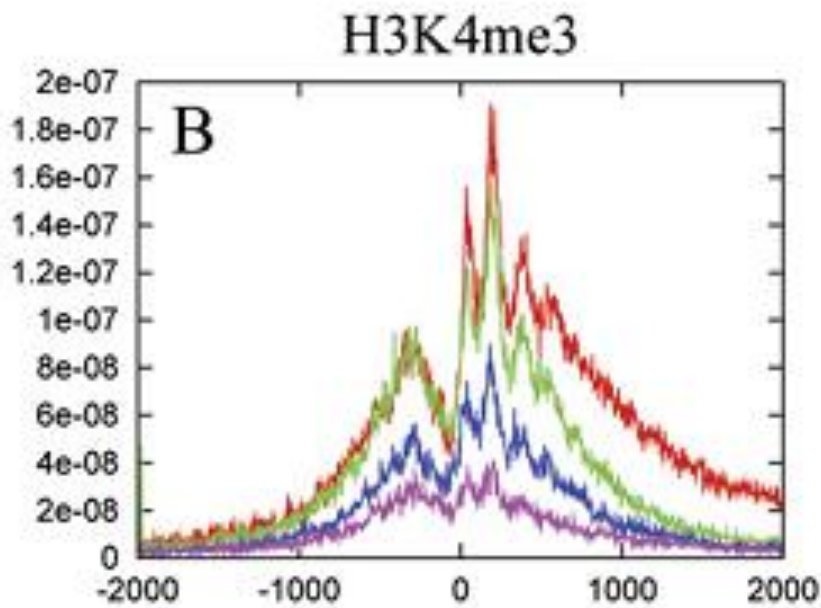
miRNA	positsioon	Metülatsioonitaseme muutus haiguse korral	Fenotüübiline muutus	Publikatsioon
let-7	chr22:46481877-46507518	üles	NSCLC	Kumar jt. 2008, Takamizawa 2004
miR9-1	chr1:156390133-156390221	üles	rinna-, pea ja kaela vähk	Lujambio jt. 2008
mir9-2	chr5:87962671-87962757	üles	CLL, kopsu-, rinna- Vähk, melanoom	Baer jt.2012, Lujambio jt. 2008
miR9-3	chr15:89911248-89911337	üles	kolorektaal-, kopsu-, rinna- pea ja kaela vähk	Lujambio jt. 2008
mir-17-92 klaster	chr13:92000074-92006829	üles	lümfoom	He jt. 2005
miR-21	chr17:57918627-57918698	alla	CLL	Baer jt. 2012
miR-29a	chr7:130561506-130561569	alla	CLL	Baer jt. 2012
miR-29b-1	chr7:130562218-130562298	alla	CLL	Baer jt. 2012
miR-34a	chr1:9211727-9211837	alla	CLL	Baer jt. 2012
miR-34b/c	chr11:111383663-111384240	üles	rinna-, kopsu-, käärsoole-, pea ja kaela vähk, melanoom	Lujambio jt. 2008
mir-124-2	chr8:65291706-65291814	üles	CLL	Baer jt. 2012
mir-129-2	chr11:43602944-43603033	üles	CLL, kolorektaal, mao, emaka	Baer jt. 2012
miR-135a-1	chr3:52328235-52328324	hüpo	CLL	Baer jt. 2012
miR-148a	chr7:25989539-25989606	üles	Kolorektaal-, pea ja kaela, rinnavähk, melanoom	Lujambio jt. 2008
mir-155	chr21:26946292-26946356	hüpo	CLL	Baer jt. 2012, Lujambio jt. 2010
miR-340	chr5:179442303-179442397	üles	neuroblastoom	Das jt. 2012
mir-551b	chr3:168269642-168269737	üles	CLL	Baer jt. 2012
mir-574	chr4:38869653-38869748	hüpo	CLL	Baer jt. 2012
mir-596	chr8:1765397-1765473	hüpo	CLL	Baer jt. 2012

Tabel 1 (järg). MiRNA geenide promotoraalade metülatsioonitaseme muutuste seos kliinilise pildiga. Tabelis on toodud artiklitsest leitud korrelatsioonid kliinilise pildi ja miRNAde metülatsioonitasemete muutuse vahel.

mir-664	chr1:220373880-220373961	hüpo	CLL	Baer jt. 2012
mir-708	chr11:79113066-79113153	üles	CLL	Baer jt. 2012

1.2.2 Histonide modifikatsioonid

Histonide modifikatsioonid on DNA metülatsiooni kõrval teine oluline epigeneetiline mehhanism geeniekspressiooni reguleerimiseks. Eukarüootse DNA pakkimisega on seotud nelja tüüpi histoonid: histoon 2A (H2A), histoon 2B (H2B), histoon 3 (H3) ja histoon 4 (H4). Histonid, peamiselt nende N-terminaalne saba, alluvad paljudele posttranslatsioonilistele modifikatsioonidele (Barski jt. 2007; Kouzarides 2007). TSS ümbruses on täheldatud histoon 3 neljandas positsioonis oleva lüsiini monometülatsiooni (H3K4me1), histoon 3 neljandas positsioonis oleva lüsiini dimetülatsiooni (H3K4me2), histoon 3 neljandas positsioonis oleva lüsiini trimetülatsiooni (H3K4me3), histoon 3 üheksandas positsioonis oleva lüsiini monometülatsiooni (H3K9me1) ja histoon 2A variant Z (H2A.Z) kõrget taset (Barski jt. 2007). Üldiselt on H3K4 metülatsioon seotud aktiivsete geenide promotoraaladega (joonis 3), samas kui H3K27 metülatsioon korreleerub geenide repressiooniga. Kuigi histoonide modifikatsioonid on head TSSide markerid, on nende kasutamine miRNAde puhul limiteeritud, sest paljude miRNAde ekspressioon on rakuliini või koe spetsiifiline (Knouf jt. 2012).



Joonis 4. H3K4me3 paiknemine TSS suhtes. Joonis kirjeldab Chip-Seq analüüsil saadud H3K4me3 piikide intensiivsust TSS vahetus läheduses. TSS on tähistatud 0-ga. Punane piik märgib kõrge ekspressiooni tasemega geenide, roheline keskmise ekspressiooni tasemega geenide, sinine madala ekspressiooni tasemega geenide ja lilla vaigistatud geenide H3K4me3 intensiivsusi. H3K4me3-l on kaks maksimumi, üks -300bp ja teine +100bp TSSi suhtes.

2. UURIMUS

2.1 Töö eesmärgid

Üheks DNA metülatsioonitaseme muutuste ülegenoomse kaardistamise võimalikuks meetodiks on Illumina HumanMethylation450 kiip (450K kiip). Väidetavalt hõlmab see kiip ka miRNA geenide regulatsioonis osalevaid CpG dinukleotiidide. Kuna sama firma madala lahutusvõimega kiibi (Infinium 27k Human Methylation Beadchip) puhul oli miRNAdega väidetavalt assotsieerunud CpGde annotatsioon äärmiselt vigane (T. Annilo, personaalne kommunikatsioon), siis otsustasime detailselt üle kontrollida ka 450K kiibi annotatsiooni.

Käesoleva töö eesmärgiks oligi täpsemalt kaardistada Illumina 450K kiibil leiduvate väidetavalt miRNAdega assotsieerunud CpG dinukleotiidide positsioone ja võrrelda neid eksperimentaalselt tõestatud miRNAde promotoraladega.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1. 450K kiibil olevate CpGde paiknemine miRNA geenide suhtes

Inimese miRNAde genoomsed koordinaadid saadi andmebaasist miRBase (<http://www.mirbase.org/>) jaanuaris 2013. See miRBase versioon (Release 19: August 2012) sisaldas informatsiooni 1594 inimese miRNA kohta. Illumina metülatsioonikiibi andmed saadi Illumina võrgulehelt (<http://www.illumina.com/>). Antud kiip sisaldab informatsiooni ka väljaspool CpG dinukleotiidide olevate võimalike metülatsioonipositsioonide kohta, kuid neid käesolevas töös ei analüüsitud (miRNAdega assotsieerunud oli selliseid positsioone kolm). Et selekteerida välja miRNAdega assotsieerunud CpGd, valiti edasiseks tööks sellised positsioonid, mille puhul 450K kiibi annotatsioonifaili veerus "UCSC_RefGene_Name" sisaldus geeni nimes "MIR" või "LET". Leiti kokku 3439 positsiooni, mis olid seotud 578 erineva miRNAga. Järgnevalt vormistati nii miRNAde kui ka nendega seotud CpGde genoomsed koordinaadid UCSC Genome Browser'i jaoks sobivasse formaati. Kõik kiibil olevad CpGd on unikaalsed.

Selleks, et analüüsida Illumina 450K metülatsioonikiibil olevate CpGde reaalselt paiknemist miRNAde suhtes, kasutasin avalikke andmebaase ning UCSC Genome Browser'is inimese genoomi 2009 aasta versiooni GRCh37 (<http://genome.ucsc.edu/>).

Töö käik: 1) laadisin üles CpG dinukleotiidide ja miRNA geenide koordinaate sisaldavad tabelid

2) tekitasin miRNA geenide naabruskoordinaatidega failid funktsiooni: „custom track“ abil

3) selleks, et leida kui palju 450K metülatsioonikiibil miRNAdega assotsieeritud CpGdest asuvad mingil kaugusel (näiteks 1500 bp) miRNA stem-loop järjestusest 5' suunas, kasutasin funktsiooni “intersection“, mille tulemusel sain tabeli, kus esimene rida oli " item count“, mis näitab, kui palju CpGd 3439st asuvad näiteks 1500 bp ulatuses miRNA geenidest 5' suunas. Kordasin kogu toimigut suurendades huvipakkuvat piirkonda 300 bp kaupa, kuni sain miRNA geenide naabruskoordinaatidega failid, mis katsid 1800 bp ala suuruse miRNA 5' otsast.

2.2.2 450K kiibil olevate CpGde paiknemine miRNA geenide oletatavate promotoralade suhtes

Selleks, et uurida 450K kiibil olevate CpGde paiknemist potentsiaalsete miRNAde promotoralade suhtes, võtsin aluseks Baer jt. poolt läbi viidud uuringu, mille käigus saadi andmed miRNA geenidest 5`suunas paiknevate H3K4me3 rikaste piirkondade kohta. Baer jt. töös tuvastati 1374 sellist miRNAdega seotud piirkonda. Sellel meetodil saadud koordinaate valides lähtusin asjaolust, et H3K4me3 rikkad regioonid on teadaolevate transkriptsioonisaitide uuringutel seostatud transkriptsiooni algussaitidega (Joonis3) ja oli analüüsi teostamiseks piisav hulk andmeid (annoteeritud 781 miRNA suhtes).

Töö käik: 1) laadisin üles CpG dinukleotiidide, miRNA geenide ja H3K4m3 rikaste regioonide koordinaate sisaldavad tabelid

2) võrdlesin CpGde paiknemist H3K4m3 poolt rikastatud piirkondades

3) uurisin H3K4me3 rikaste piirkondade paiknemist 1500 bp kauguseni miRNA geeni 5`suunast.

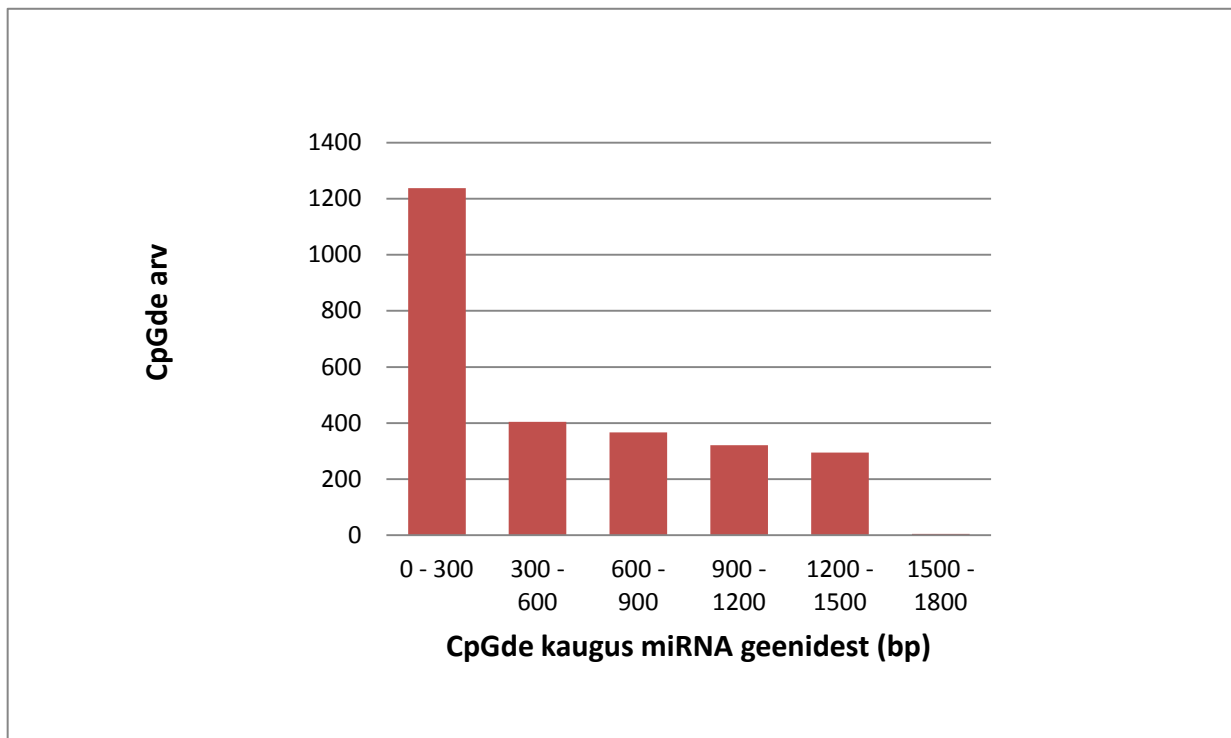
2.3 Tulemused ja arutelu.

2.3.1 MiRNAdega seotud CpGd

Potentsiaalselt miRNA geenide regulatsioonis osalevate CpG dinukleotiidide kaardistamiseks kasutasin Illumina 450K kiibi ja miRBase andmebaasist saadud miRNAde andmeid, mida võrdlesin UCSC Genome Browseri abil. Eesmärgiks oli leida, milline on Illumina 450K kiibil olevate miRNAdega assotsieerunud CpGde tegelik paiknemine.

Esimeseks etapiks oli 450K kiibi ja miRBase ühisosa leidmine, mille tulemusel tuvastasin 2624 CpGd 1500 bp upstream suunas. Kirjanduse andmetel on 1000 - 1500 bp keskmine kaugus kus asuvad miRNAde promootorpiirkonnad.

Selleks, et näha CpGde jaotuse sõltuvust kaugusest, analüüsisin CpGde arvu liikudes miRNAst 5`suunas 300bp kaupa, mille tulemused on antud alloleval graafikul.



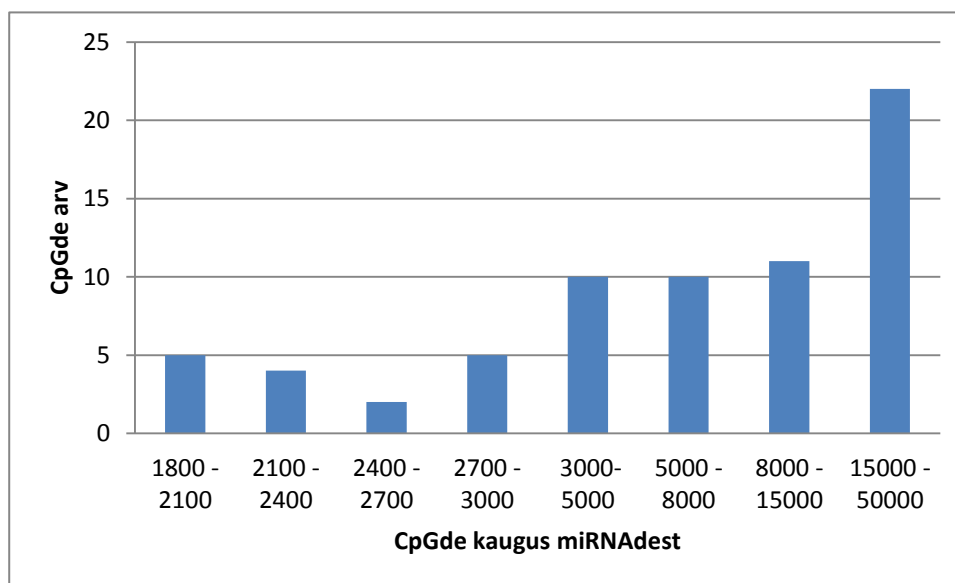
Joonis 5. CpGde jaotus 5`suunas 300 aluspaari kaupa kuni 1500 bp kauguseni. Kirjeldab CpGde jaotuvust miRNA geenide algusest 5`suunas. Kõigist miRNA geenidega 5`suunal seotud CpGdest (2624) umbes pooled asuvad 300 bp kaugusel ning teine pool jaotub enam-vähem ühtlaselt järgneva 1200 bp vahel. Alates 1500 bp kauguselt väheneb aga CpGde arv drastiliselt.

Nagu töö tulemustest lähtub, ei vasta miRBase'i ja Illumina kiibi andmed üksühele. Illumina 450K metülatsioonikiibil olevast 3439 positsioonist tuvastasin 2624 CpGd, mis paiknevad miRNA juuksenõelstruktuuri kodeerivatest geenidest 1500 bp 5`suunas. See võib olla tingitud sellest, et: 1) mõned Illumina kiibi poolt analüüsitavad CpGd paiknevad tegelikult miRNA geenidest 3' suunas; 2) Illumina kiibil olevad CpGd jäid analüüsitud piirkonnast kaugemale; 3) miRNAde annotatsioon 450K kiibil ja kasutatud miRBase versioonis on erinev.

Et kontrollida kiibil toodud CpGde paiknemist 3`suunas tekitasin miRNA geenide naabruskoordinaatidega failid ka 3`suunas. Vaatluse alla võtsin kaugused 2000 bp, 4000 bp ja

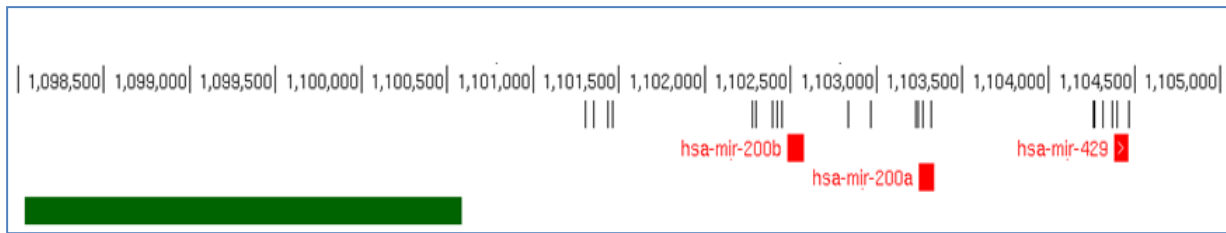
6000 bp, mille tulemuseks olid vastavalt 575 CpGd 2000 bp kaugusel, 681 CpGd 4000bp kaugusel ja 753 CpGd 6000 bp kaugusel. Kontrollisin ka CpGde paiknemist miRNA geenides, mille tulemuseks sain 355 CpGd, mis kattusid miRNA geenide koordinaatidega. Antud tulemuste valguses võib öelda, et 450K kiibil on esindatud ka CpGd, mis paiknevad miRNA geenist 3`suunas ja miRNA juuksenõela struktuuri kodeeriva geeni sees.

Selleks, et kontrollida CpGde paiknemist tunduvalt kaugemal, kui promotootalade keskmine kaugus, sai korratud katset 50kb kauguseni, mis ei andnud märkimisväärselt suuremat CpGde saagist (joonis 5).



Joonis 6. CpGde jaotus 5`suunas kuni 50 000 bp kauguseni. Kirjeldab CpGde jaotuvust miRNA geenide algusest 5`suunas alates 1800 bp kauguselt.

Analüüsi käigus selgus ka üks 450K kiibi annotatsiooni oluline puudus. Nimelt ei ole klasterdunud miRNAde puhul arvestatud, et klatri ekspressiooni kontrollitakse ühe ühise promotori poolt ning algselt transkribeeritakse kogu klaster ühe pre-miRNA. Seega on Illumina annotatsiooni kohaselt paljudel juhtudel klatri keskel asuvate miRNAdega seotud sellised CpG, mis paiknevad samuti klatri keskel, mitte aga vastava klatri promotoralas. Näiteks miR-200 perekonna liikmed transkribeeritakse kahe klatriks: miR-200b/a/429 ja miR-200c/141, kuid Illumina 450K kiibi annotatsioon sellega ei arvesta ning CpG dinukleotiidid on anoteeritud iga klatri liikme kohta eraldi, umbes 1000 bp ulatuses küpse miRNA järjestusest 5' suunas (joonis 7).



Joonis 7. CpGde paiknemine miRNA geenide suhtes. Joonis annab ülevaate CpGde paiknemisest miRNA geenide 5`suunal ja kirjeldab hästi 450K kiibi annotatsiooni puudulikkust klastrite suhtes. Joonisel on toodud ära miR-200b/a/429 klastri (kujutatud punasega) suhtes paiknevad 450K kiibil olevad CpGd (tähistatud mustade püstjoontega) ja genoomne CpG saar (kujutatud rohelisega).

2.3.2 MiRNA geenide oletatavate promotoraladega seotud CpGd.

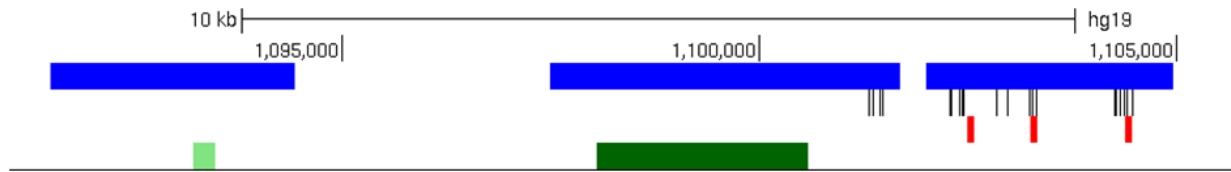
MiRNAdega seotud H3K4me3 ja kiibil olevate CpGde andmete omavahelise analüüsi tulemusena selgus, et H3K4me3 poolt rikastatud piirkondades asus 1411 CpGd 3439st. Võttes aluseks oletuse, et H3K4me3 kannab informatsiooni transkriptsiooni algussaidi paiknemise kohta (joonis 3), võib antud tulemuste põhjal järeldada, et need 1411 CpGd, mis moodustavad ~53% miRNA geenidest 5`suunas asuvates CpGdest, võivad suure tõenäosusega olla seotud miRNA geenide promotoralade metülatsiooni regulatsiooniga.

324 H3K4me3-rikka piirkonna koordinaadid kattusid vähemalt mingil määral miRNA koordinaatidega ja 325 H3K4me3 rikast piirkonda asusid miRNA geenidest 5`suunas, mis võib olla märgiks, et need miRNAd transkribeeritakse iseseisvatelt miRNA geenidelt, kuna nende promotori piirkond asub geenile suhteliselt lähedal, kuid ei kirjelda siiski klastrites paiknevaid miRNAsid.

Nagu eespool öeldud, oli: 1) 324 H3K4me3-rikastatud piirkonda, mis kattusid miRNA geenidega ja põhimõtteliselt ka sama palju H3K4me3 rikkaid alasid, mis asusid miRNA geenidest 1500 bp ulatuses ülesvoolu ning; 2) 1411 CpGd, mis olid seotud H3K4me3 rikaste piirkondadega 5`suunas miRNA geenidest. Seega oletades, et igale miRNAle vastab üks H3K4me3ga rikastatud regioon, saab järeldada et 450K kiibil on ligikaudu 1411 CpGd, mis võivad reguleerida umbes 324 miRNA geeni ekspressiooni taset metülatsiooni kaudu.

1229 H3K4me3 rikast piirkonda asusid miRNA geenidest 35kb ulatuses 5`suunas, andes põhjuse oletada, et need miRNAd võivad asuda teiste geenide intronites, mistõttu jääb nende

promootorala geenist suhteliselt kaugele, ning nende geenide promootorala seost metülatsiooniga ei saa ennustada 450K kiibi abil.



Joonis 8. CpGde paiknemine miRNAde ja H3K4 rikaste piirkondade suhtes. Joonis kajastab CpGde (tähistatud mustade püstjoontega) paiknemist nii miRNAde (kujutatud punasega), CpG saarte (kujutatud rohelisega) kui H3K4me3 rikaste piirkondade (kujutatud sinisega) suhtes, kui ka H3K4me3 rikaste piirkondade paiknemist miRNA geenide suhtes. Joonisel on näha miR-200b/a/429 klasteri genoomne lookus

KOKKUVÕTE

MiRNAd on uurimisobjektina suhteliselt uus, kiiresti arenev ja paljutõotav suund, kuid siiski on praeguseks päris palju teada nende rollist erinevate haiguste, eriti aga just kasvajate, tekkes ja arengus. Samas on veel üpris vähe infot miRNAdede endi regulatsioonimehhanismide kohta ning pole ka ühtset ja efektiivset meetodit miRNA geenide regulatsiooni uurimiseks. Peamiseks põhjuseks on asjaolu, et miRNA geenide transkribeerimine on väga varieeruv, mis on tingitud neid kodeerivate geenide struktuursetest mitmekesisusest. Ka antud uurimistöökinnitab miRNA geenide paiknemisest tingitud komplikatsioone nende uurimisel.

Käesoleva töö eesmärgiks oligi täpsemalt kaardistada Illumina 450K kiibil leiduvate CpG dinukleotiidide asukoht miRNAdede oletatavate promootoralade suhtes. Probleemseks osutus asjaolu, et 450K kiibil olid klastris paiknevad miRNAd annoteeritud iseseisvatena.

Minu poolt läbiviidud uurimuse käigus selgus, et miRNA geenidest 5`suunal asub 2624 Illumina 450K kiibil olevast 3439st CpGst, kuid tõenäoliselt on miRNA promootoraladega seotud 1141 CpGd. Samas 578st kiibil olevast miRNAst umbes 324 puhul võib kiip anda infot promootoralade metülatsiooni kohta. Nagu käesolevast uurimusest lähtub, asuvad 450K kiibil olevad CpGd küll miRNA geenide vahetus läheduses, kuid annavad suhteliselt vähe infot nende regulatsiooniga seotud alade kohta.

Kuna miRNAd mängivad olulist rolli paljudes tähtsates füsioloogilistes protsessides, siis on nad selgelt väärt rohkemat mõistmist ja lähemat uurimist. Oluline oleks mõista kogu miRNAdede biogeneesi ja selle tagajärgi, mis eeldab intensiivset tööd miRNA geenide paiknemise, transkribeerimise ja reguleerimise alal.

SUMMARY

The role of DNA methylation in the regulation of microRNA expression

Liina Küttis

MiRNAs are small single-stranded non-coding RNAs which modulate the expression of many genes. MiRNAs are important regulators of fundamental biological processes such as development and differentiation, cell proliferation, apoptosis, stress response and fat metabolism. Aberrant regulation of miRNAs has been linked to many diseases, including different types of cancer.

One possible mechanism of miRNA expression regulation is the DNA methylation of promoter regions. Since there exists little knowledge about these mechanisms, it was the purpose of my research to examine the positions of CpG dinucleotides allegedly associated with miRNAs by Illumina 450K methylation chip and to compare these with experimentally verified miRNA promoter regions. Human miRNA genomic coordinates were retrieved in January 2013 from the miRBase (<http://www.mirbase.org/>) database which contained coordinates of 1594 miRNAs. The methylation chip annotation data obtained from the Illumina website (<http://www.illumina.com/>) contained 3439 positions associated with 578 different miRNAs.

This study showed that 2624 out of 3439 CpGs on Illumina 450K chip are located on the 5' direction from miRNA genes. However, only 1141 CpGs were mapped to the miRNA promoter regions as defined by publicly available histone modification data. CpGs associated with 324 miRNAs out of the 578 found on the chip actually are located at the promoter region. This research concluded that although about two thirds of CpGs that are annotated as miRNA-associated by Illumina, are indeed located in the close proximity of the miRNA genes, while only one third of them are located in functionally active promoter regions.

KASUTATUD KIRJANDUS

1. [Antequera F.](#) and [Bird A.](#) (1993). Number of CpG islands and genes in human and mouse. [Journal List Proc Natl Acad Sci U S A v.90\(24\); Dec 15, 1993](#) PMC48112
2. Baer C, Claus R, Frenzel LP, Zucknick M, Park YJ, Gu L, Weichenhan D, Fischer M, Pallasch CP, Herpel E, Rehli M, Byrd JC, Wendtner CM, Plass C. (2012). Extensive promoter DNA hypermethylation and hypomethylation is associated with aberrant microRNA expression in chronic lymphocytic leukemia. Department of Epigenomics and Cancer Risk Factors, German Cancer Research Center (DKFZ), Im Neuenheimer Feld 280, Heidelberg, Germany *Cancer Res.* Aug 1;72(15):3775-85. Epub 2012 Jun 18.
3. Barski A, Cuddapah S, Cu K, Roh T-Y, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K (2007). High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell*129, 823–837, May 18, 2007^a2007 Elsevier Inc.
4. Bartel DP. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004 Jan 23;116(2):281-97. Review
5. Bartel DP. (2009). [MicroRNAs: target recognition and regulatory functions.](#) *Cell.* 2009 Jan 23;136(2):215-33. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002.
6. Bazzini AA, Lee MT, Giraldez AJ. (2012) Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish. *Science* 2012; 336:233-237.
7. Bock C. (2012). Analysing and interpreting DNA methylation data. *Nat Rev Genet.* 2012 Oct;13(10):705-19. doi: 10.1038/nrg3273. Review.
8. Bohnsack MT, Czaplinski K, Görlich D (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA.* 2004 February; 10(2): 185–191. doi: 10.1261/rna.5167604
9. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. (2005). Principles of MicroRNA–Target Recognition. *PLoS Biol.* 2005 Mar;3(3):e85.
10. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. (2004). [Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers.](#) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 2;101(9):2999-3004. Epub 2004 Feb 18.
11. Cummins JM, Velculescu VE. (2006). Implications of micro-RNA profiling for cancer diagnosis. *Oncogene.* 2006 Oct 9;25(46):6220-7.

12. Das S, Bryan K, Buckley PG, Piskareva O, Bray IM, Foley N, Ryan J, Lynch J, Creevey L, Fay J, Prenter S, Koster J, van Sluis P, Versteeg R, Eggert A, Schulte JH, Schramm A, Mestdagh P, Vandesompele J, Speleman F, Stallings RL. (2012). [Modulation of neuroblastoma disease pathogenesis by an extensive network of epigenetically regulated microRNAs](#). *Oncogene*. 2012 Jul 16. doi: 10.1038/onc.2012.311.
13. Djuranovic S, Nahvi A, Green R. (2012). MiRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. *Science* 2012; 336:237-240;
14. Garzon R, Marcucci G, Croce CM.(2010). [Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges](#). *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Oct;9(10):775-89. doi: 10.1038/nrd3179. Review.
15. Hammond SM., Bernstein E, Beach D, Hannon GJ (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 2000 Mar 16;404(6775):293-6.
16. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. [Genes Dev](#). 2004 Dec 15;18(24):3016-27. Epub 2004 Dec 1.
17. He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, Hammond SM. (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. [Nature](#). 2005 Jun 9;435(7043):828-33.
18. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, B alint  , Tusch T, Zamore PD. (2001). A Cellular Function for the RNA-Interference Enzyme Dicer in the Maturation of the let-7 Small Temporal RNA. [Science](#). 2001 Aug 3;293(5531):834-8. Epub 2001 Jul 12.
19. Hutvagner G, Zamore P (2002). A microRNA in a MultipleTurnover RNAi Enzyme Complex. [www.sciencemag.org](#) SCIENCE VOL 297 20 SEPTEMBER 2002 2059
20. John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. (2005). [Human MicroRNA targets](#). *PLoS Biol*. 2004 Nov;2(11):e363. Epub 2004 Oct 5. Erratum in: *PLoS Biol*. 2005 Jul;3(7):e264.
21. Jones PA. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*. 2012 May 29;13(7):484-92. doi: 10.1038/nrg3230. Review.
22. Knouf EC, Garg K, Arroyo JD, Correa Y, Sarkar D, Parkin RK, Wurz K, O'Briant KC, Godwin AK, Urban ND, Ruzzo WL, Gentleman R, Drescher CW, Swisher EM, Tewari M (2012). An integrative genomic approach identifies p73 and p63 as activators of miR-200 microRNA family transcription. *Nucleic Acids Research*, 2012, Vol. 40, No. 2 499–510 doi:10.1093/nar/gkr731

23. [Kumar MS](#), [Erkeland SJ](#), [Pester RE](#), [Chen CY](#), [Ebert MS](#), [Sharp PA](#), [Jacks T](#) (2008). Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. [Proc Natl Acad Sci U S A](#). 2008 Mar 11;105(10):3903-8. doi: 10.1073/pnas.0712321105. Epub 2008 Feb 28.
24. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001) Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science* 26 October 2001: Vol. 294 no. 5543 pp. 853-858 DOI: 10.1126/science.1064921.
25. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG., Bartel DP (2001). An Abundant Class of Tiny RNAs with Probable Regulatory Roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 26 October 2001: Vol. 294 no. 5543 pp. 858-862 DOI: 10.1126/science.1065062
26. Lee RC, Ambros V (2001). An Extensive Class of Small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 26 October 2001: Vol. 294 no. 5543 pp. 862-864 DOI: 10.1126/science.1065329
27. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Ra°dmark O, Kim S, Kim VN (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* | Vol. 425 | 25 September 2003 | www.nature.com/nature
28. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. (2002). [MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization](#). *EMBO J*. Sep 2;21(17):4663-70.
29. Lewis [BP](#), [Shih IH](#), [Jones-Rhoades MW](#), [Bartel DP](#), [Burge CB](#).(2003). Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. [Cell](#). 2003 Dec 26;115(7):787-98
30. [Liu J](#), [Carmell MA](#), [Rivas FV](#), [Marsden CG](#), [Thomson JM](#), [Song JJ](#), [Hammond SM](#), [Joshua-Tor L](#), [Hannon GJ](#) (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. [Science](#). 2004 Sep 3;305(5689):1437-41. Epub 2004 Jul 29.
31. Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, Ropero S, Sánchez-Céspedes M, Blanco D, Montuenga LM, Rossi S, Nicoloso MS, Faller WJ, Gallagher WM, Eccles SA, Croce CM, Esteller M. (2008). A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 9;105(36):13556-61. doi: 10.1073/pnas.0803055105. Epub 2008 Sep 3.
32. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE., Kutay U (2004). Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science* 2 January 2004: Vol. 303 no. 5654 pp. 95-98DOI:10.1126/science.1090599
33. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*. 2005 Jun 9;435(7043):839-43.

34. [Parasramka MA](#), [Ho E](#), [Williams DE](#), [Dashwood RH](#). (2012). MicroRNAs, diet, and cancer: new mechanistic insights on the epigenetic actions of phytochemicals. [Mol Carcinog](#). 2012 Mar;51(3):213-30. doi: 10.1002/mc.20822. Epub 2011 Jul 7.
35. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T (2004). Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res*. 2004 Jun 1;64(11):3753-6.
36. Tang M, Xu W, Wang Q, Xiao W, Xu R (2009). Potential of DNMT and its Epigenetic Regulation for Lung Cancer Therapy. *Current Genomics*,2009, 10,336-352
37. Wu [H](#), [Xu H](#), [Miraglia LJ](#), [Crooke ST](#) (2000). Human RNase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing. [J Biol Chem](#). 2000 Nov 24;275(47):36957-65.
38. [Ørom UA](#), [Nielsen FC](#), [Lund AH](#).(2008). MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Molecular Cell*30, 460–471, May 23, 2008^a2008 Elsevier Inc.
39. Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, Liang S, Naylor TL, Barchetti A, Ward MR, Yao G, Medina A, O'brien-Jenkins A, Katsaros D, Hatzigeorgiou A, Gimotty PA, Weber BL, Coukos G.(2006). [MicroRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer](#). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jun 13;103(24):9136-41. Epub 2006 Jun 5.
40. [Xie Y](#), [Todd NW](#), [Liu Z](#), [Zhan M](#), [Fang H](#), [Peng H](#), [Alattar M](#), [Deepak J](#), [Stass SA](#), [Jiang F](#) (2010). Altered miRNA expression in sputum for diagnosis of non-small cell lung cancer. [Lung Cancer](#). 2010 Feb;67(2):170-6. doi: 10.1016/j.lungcan.2009.04.004. Epub 2009 May 14.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina _____ Liina Küttis _____

(autori nimi)

(sünnikuupäev: ____28.05.1981____)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

____ **DNA metülatsiooni roll mikroRNAde ekspressiooni regulatsioonis** _____,

(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on _____ Tarmo Annilo _____,

(juhendaja nimi)

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, _____26.05.2013_____ *(kuupäev)*