

A matrilin-1 gén transzkripciós szabályozásának vizsgálata transzgenikus egerekben

Ph.D. értekezés

Nagy Andrea

Témavezető: Dr. Kiss Ibolya

MTA Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézet

Biológia Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar

2011

Szeged

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
1. A PORCSZÖVET FELÉPÍTÉSE, A PORCOS VÁZELEMEK KIALAKULÁSA ÉS A VÉGTAGOK MORFOGENEZISE	6
1.1. A porcszövet és makromolekulái	6
1.2. A matrilin család	7
1.3. A matrilin-1	9
1.4. A porcos vázelemek képződése	10
1.5. A chondrogenézist és a csontok hosszanti növekedését szabályozó fontosabb jelátviteli utak	12
1.6. A vázfejlődés morfogenetikus szabályozása	13
2. AZ EUKARIÓTA GÉNEK TRANSZKRIPCIÓS SZABÁLYOZÁSA	15
2.1. Az eukarióta génexpresszió szabályozásának lehetőségei	15
2.2. A transzkripciós szabályozásban résztvevő fontosabb fehérje komponensek	16
2.3. A transzkripciós szabályozásban résztvevő DNS elemek	17
2.4. A transzgenikus állatmodellek szerepe az eukarióta génreguláció tanulmányozásában	19
3. A PORCSPECIFIKUS GÉNEXPRESSZIÓ TRANSZKRIPCIÓS SZABÁLYOZÁSA	20
3.1. A Sox trió	20
3.2. A Sox trió által szabályozott porc mátrix fehérjéket kódoló gének	22
3.3. A matrilin-1 gén szerkezete és transzkripciós szabályozása	23
CÉLKITŰZÉSEK	25
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	26
1. Plazmid konstrukciók	26
1.1. Tranzien expressziós kísérletekhez használt plazmidok készítése	26
1.2. Transzgenikus egerek előállításához használt plazmidok készítése	27
2. Transzgenikus egerek előállítása	28
3. A transzgének jelenlétének igazolása	28
3.1. PCR	28
3.2. Dot blot	29

4.	A β -galaktozidáz aktivitás detektálása egész embrión és metszeten	29
5.	Alkalmazott sejt kultúrák készítése	30
6.	Tranziens expresszió	31
7.	Fehérje expresszió és tisztítás	31
8.	Sejtmagi kivonatok készítése EMSA és pull down kísérletekhez	31
9.	EMSA	32
10.	Pull down	32
ELŐZETES EREDMÉNYEK		33
EREDMÉNYEK		36
1.	A rövid promoter szerepe a matrilin-1 gén expressziójának szabályozásában	36
1.1.	A rövid promoter aktivitása alacsony transzgenikus egerekben	36
1.2.	Távoli homológ régiók növelik a rövid promoter aktivitását	38
1.3.	A matrilin-1 rövid promoter felülírja az erős heterológ porcspecifikus enhancer elem hatását	41
2.	A rövid promoter szabályozó elemeit érintő mutációk hatása a matrilin-1 génexpresszióra	45
2.1.	A Pe1 elem Sox kötőhelyeinek mutációja megszünteti a hosszú promoter aktivitását porcsejtekben	45
2.2.	Az Ine elem Sox kötőhelyeinek szerepe	49
3.	Távoli homológ reguláló elemek szerepe a matrilin-1 gén expressziójának szabályozásában	53
3.1.	Disztális elemek hatása a rövid promoter aktivitására	53
3.2.	Disztális elemek hatása heterológ promoter aktivitására	58
3.3.	Homológ introni elemek hatása a rövid promoter aktivitására	60
AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA		64
DISZKUSSZIÓ		66
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS		73
IRODALOMJEGYZÉK		74
A TÉZISEK ÖSSZEFOGLALÁSA		86
SUMMARY OF THE THESIS		91
A DOLGOZAT ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK		95

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AER	apikális ektodermális gerinc (apical ectodermal ridge)
AMH	anti-Müllerian hormon
AP	antero-poszterior tengely
ATP	adenozin trifoszfát
BMP	bone morphogenetic protein
BRE	TFIIB felismerő elem (TFIIB recognition element)
cAMP	ciklikus adenzin monofoszfát
CBP	CREB kötő fehérje (CREB binding protein)
CD-RAP	cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein
CEC	csirke embrionális chondrocyta
CEF	csirke embrionális fibroblaszt
CMP	cartilage matrix protein
CREB	cyclic-AMP response element binding
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
Dpe1 és Dpe2	disztális promóter elem 1 és 2
DPE	downstream promóter elem
DTT	ditiotreitol
DV	dorzo-ventrális tengely
ECM	extracelluláris mátrix
EGF	epidermális növekedési faktor (epidermal growth factor)
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
FCS	fetal calf serum
FGF	fibroblaszt növekedési faktor (fibroblast growth factor)
FGFR	fibroblaszt növekedési faktor receptor
GST	glutathion S-transzferáz
HAM (F12)	nutrient mixture (F-12)
HAT	hiszton acetil-transzferáz
HDAC	hiszton deacetiláz
HDM	nagy sűrűségű mesenchyma (high-density mesenchyme)
HMG	high-mobility group
Ihh	Indian hedgehog

IL1	interleukin 1
Ine	iniciátor elem
Inr	iniciáló elemek
<i>Matn1</i>	csirke matrilin-1 gén
MMP	mátrix metalloproteináz
NFI	nukleáris faktor-I
NRE	negatív szabályozó elemek (negative regulatory elements)
PD	proximo-disztális tengely
Pe1	promoter elem 1
PG	proteoglikán
PIC	preiniciációs komplex
PKA	cAMP-függő protein kináz A
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid
polII	RNS polimeráz II
PPR	parathyroid hormone-related peptide receptor
PTHrP	parathyroid hormone-related peptide
RA	retinasav
SF-1	steroidogenic factor-1
Shh	Sonic hedgehog
SI és SII	silencer elem I és II
Sox	sry-type HMG box protein
Sry	sex-determining region Y
TAF	TBP-aszociált faktorok
TBP	TATA-kötő fehérje (TATA-binding protein)
TNF α	tumor nekrosis faktor α
VEGF	vascular endothelial growth factor
vWFA	von Willebrand faktor A
ZPA	polarizációs zóna (zone of polarizing activity)
ZRS	ZPA szabályozó szekvencia (ZPA regulatory sequence)

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1. A PORCSZÖVET FELÉPÍTÉSE, A PORCOS VÁZELEMEK KIALAKULÁSA ÉS A VÉGTAGOK MORFOGENEZISE

1.1. A porcszövet és makromolekulái

A **porcszövet** a gerinces vázfejlődésben és a vázrendszer működésében fontos szerepet betöltő szövettípus. Sejtes komponensei a chondrocyták, melyek a porcszövetre jellemző makromolekulákat termelik. Ezek a sejten kívüli térben egy jól szervezett extracelluláris mátrixot (ECM) hoznak létre, amely meghatározza a szövet fizikai és kémiai tulajdonságait. A porcszövetre jellemző a kiterjedt extracelluláris mátrix és a viszonylag alacsony sejtszám.

A porcszövet a csontosodás folyamatában egy átmeneti struktúra. Egyedülálló szövettípus, mivel a csontfejlődés során teljes mértékben átalakul. Ezalatt a sejtek egy többlépcsős differenciálódási folyamaton mennek keresztül. Minden lépésben az adott stádiumra jellemző markergének kifejeződése figyelhető meg. A porcszövet ezen tulajdonsága miatt rendkívül alkalmas a sejtdifferenciálódás folyamatainak és azok szabályozásának tanulmányozására.

Az **extracelluláris mátrix** a sejtek közötti teret kitöltő sajátos szerkezetű állomány, melynek makromolekuláit a sejtek termelik. Szerepe sokrétű, többek között biztosítja a sejtek működéséhez szükséges teret, támaszt nyújt, elősegíti a sejtek letapadását, vagy mozgását, tápanyagokat, növekedési faktorokat, jel-molekulákat, hormonokat közvetít a sejtekhez. Szoros kölcsönhatásban áll a sejtekkel és a benne lejátszódó változások génexpressziós változásokat is előidézhethetnek.

Az extracelluláris mátrixot három fő molekulatípus építi fel: kollagének és egyéb fibrilláris fehérjék, a hialuronsav és proteoglikánok, multiadhéziós fehérjék.

A **kollagének** minden szövet sejt-közötti állományának fő alkotói. Olyan oldhatatlan glikoproteinek, melyekben a (Gly-X-Y)_n ismétlődések jellegzetes hármas hélixet alkotnak.

A kollagéneken kívül más fibrilláris fehérjék is részt vesznek a sejt-közötti állomány felépítésében. Ilyenek az elasztikus rostokat alkotó *fibrillin* és *elasztin*, melyek főleg az erek falában, tüdőben, bőrben és az ízületi szalagokban fordulnak elő [1].

A *poliszacharidok* szabadon, vagy egy core proteinhez kovalensen kötve fordulnak elő. Jellemzőjük a nagy negatív töltéssűrűség, ami fokozza vízmegkötő képességüket, így aggregátumaiknak szerepük van a sejtek turgornyomásának fenntartásában.

A hialuronsav az egyetlen olyan glükózaminoglikán, ami szabad formában van. 1000-50000 diszacharid egységből épül fel, a hialektánokkal (versikán, aggregkán) kapcsolódva viszkózus, hidratált gélt képez.

A *proteoglikánok* (PG) két nagyobb csoportba sorolhatók: mátrix proteoglikánok és sejtfelszíni proteoglikánok. Ezeken belül a PG-ok további alcsoportokba sorolhatók méretük, szerkezeti felépítésük, a core protein sajátosságai és génhomológia alapján. Biológiai funkciójuk nem merül ki abban, hogy a mátrix szerkezeti elemei, szerepük van még a sejtek osztódásában, migrációban, letapadásban, differenciálódásban [2].

A *multiadhéziós fehérjék* nagy része glikoprotein. Szerepük az ECM-ECM és sejt-ECM kölcsönhatások közvetítése. Ilyen például a link protein, ami a proteoglikánokat és a hialuronsavat kapcsolja össze, illetve a laminin, ami a bazális membrán fő alkotórészeként azt a sejtekhez köti [3].

A *porcszövet sejtközötti állományának* alapját is egy kollagén hálózat alkotja, melynek nagy része II. típusú kollagén, illetve IX. és XI. típusú kollagén [4]. A kollagének fibrillumai hálózatokat képeznek, melyek a nyíróerőkkel szemben nagy ellenállást biztosítanak. A kollagén hálózatokhoz szorosan kapcsolódnak a proteoglikánok, melyek negatív töltésük révén vízmolekulákat kötnek meg. A proteoglikánok legnagyobb része aggregkán, melynek core proteinjéhez kapcsolódnak a kondroitin-szulfát és keratán-szulfát oldalláncok. A szintén nagy vízmegkötőképességű glükózaminoglikánok közül a porcszövetben főként a hialuronsav fordul elő, mely az aggregkánhoz kapcsolódik.

A kollagének, a negatív töltésű proteoglikánok és egyéb fehérjék (link protein, COMP, fibronectin), illetve a kis proteoglikánok (decorin, biglikán, fibromodulin) közötti interakciók biztosítják a porcszövet terheléssel szembeni nyomó- és húzószilárdságát.

Más mátrix fehérjékhez kapcsolódva az ECM-ECM kölcsönhatásokban adaptor szerepet töltenek be a matrilinek (ld. később).

1.2. A matrilin család

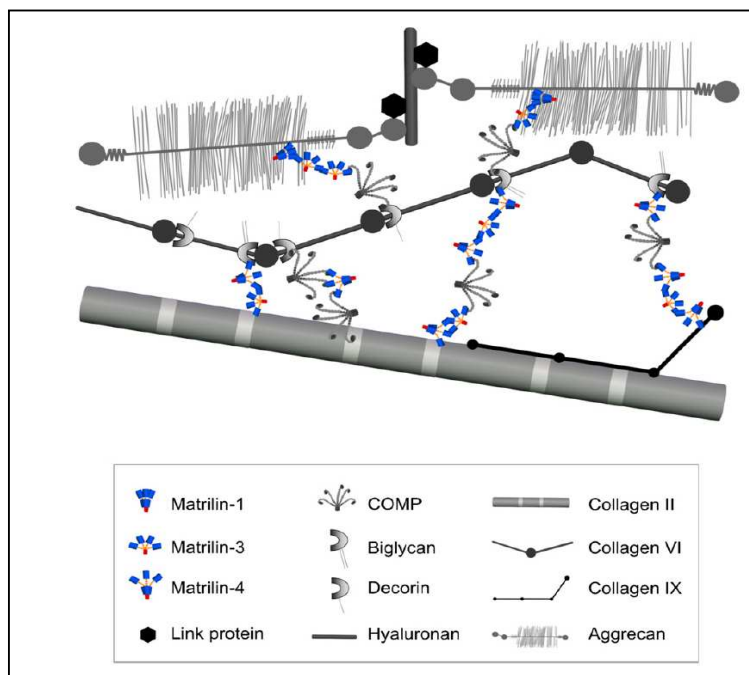
A matrilinek a szövetek sejtközötti állományában lévő nem-kollagénszerű fehérjék, amik a sejt-mátrix kölcsönhatások kialakításában és fenntartásában vesznek részt,

biztosítva ezzel a szövet integritását és a mátrix olyan elrendeződését, amely lehetővé teszi a chondrocyta és más sejtek differenciálódását, valamint a csontfejlődést.

A matrilinek a különböző szövetek sejtközi állományában kollagéntől függő és attól független finom hálózatokat alkotnak (1. ábra). Az ECM szerveződésében betöltött fontos szerepükre utal, hogy minden szövettípus sejtközi állományában előfordul a család egy, vagy több tagja [5, 6].

A matrilin fehérjecsaládnak négy tagja van, melyeket közös moduláris szerkezetük alapján azonosítottak. Érett formájukban mindegyikben meghatározott számú epidermális növekedési faktor (EGF)-szerű domén kapcsol össze két von Willebrand faktor A (vWFA) domént, a C-terminálison pedig egy coiled-coil α -helikális domén található, aminek az oligomerizációban van szerepe. Ettől az általános szerkezettől néhány esetben van eltérés. A matrilin-3-ban nincs meg a második vWFA domén, a matrilin-2 pedig tartalmaz egy egyedi domént a C-terminálison [5, 7].

A géncsalád tagjainak kifejeződése egymással részben átfed. A matrilin-1 és -3 csak a vázrendszerben expresszálódik, míg a matrilin-2 és -4 szélesebb szövetspecifitású, legjelentősebb mennyiségben a laza –és tömötrostos kötőszövetekben fordulnak elő [5-7]. A matrilin-2 legmagasabb szinten a calvariában, az uterusban és a szívben fejeződik ki. Az endochondrális csontosodásban betöltött fontos szerepükre utal, hogy egérben a végtagfejlődés során a matrilin család mind a négy tagja expresszálódik [8].



1. ábra A matrilinek adaptor szerepet töltenek be a porcszövet sejtközi állományának felépítésében [7].

1.3. A matrilin-1

A matrilin-1/CMP (cartilage matrix protein) a fehérjecsalád elsőként azonosított tagja [9]. Először szarvasmarha légcső porcból tisztították. Specifikusan a porcszövetben fejeződik ki, de annak nem minden típusában. Így például nem figyelhető meg a nagy terhelésnek kitett ízületi porcban [10] és a csigolyaközi porcban sem. Ugyanakkor nagy mennyiségben fordul elő orr- és tracheaporcban. A matrilin-1 néhány egyéb szöveten kívül [8, 11] legnagyobb mennyiségben a hialinporcban fordul elő. Az expresszió mértéke függ a porcsejtek fejlődési stádiumától [12-14].

A matrilin-1 a nem kollagénszerű fehérjék csoportjába tartozik. Az 54 kDa tömegű monomer két vWFA doménből, egy EGF-szerű doménből és egy alfa-helikális coiled-coil doménből áll [15-17]. Az extracelluláris mátrix felépítésében diszulfid hidakkal stabilizált homotrimerként vesz részt, de más matrilinokkal heterooligomerek kialakítására is képes [18, 19].

A porcszövet extracelluláris mátrixában a matrilin-1 kapcsolódik az aggregánhoz [20], a II. típusú kollagén rostokhoz [21], illetve az $\alpha 1\beta 1$ integrinhez [22]. Ezt támasztja alá, hogy a matrilin-1 gén inaktiválása transzgenikus egerekben a kollagén rostképződés zavarát okozta [23], viszont ez nem vezetett rendellenes vázfejlődéshez, valószínűleg azért, mert a porcszövetben szintén jelenlévő matrilin-2 és -4 ellátja a matrilin-1 funkcióját [24]. A matrilin-1 a vWFA doménjein keresztül kollagénektől független hálózatok kialakítására is képes [25]. Ezekből az adatokból következik, hogy ez a fehérje adaptor funkciót tölthet be a mátrix szerveződésében.

Az endochondrális csontosodás folyamán a matrilin-1 gén a többi porcspecifikus markergénhez képest később kapcsol be. A késői proliferatív stádiumban lévő chondrocyták kezdik termelni, így e stádium jellemző markergénjének tekinthető [12,14]. *In situ* hibridizációs kísérletekben a matrilin-1 mRNS a fejlődő hosszú csontok növekedési korongjában zonális mintázatot mutat [26]. A kifejeződés mértéke a forrás porcsejtek zónájában alacsony szintű, a proliferatív és a felső hipertróf zónában a legnagyobb mértékű, míg az alsó hipertróf zónában egyáltalán nem figyelhető meg.

1.4. A porcos vázelemek képződése

Gerincesekben a vázfejlődés konzervált, szigorúan szabályozott, egymással összefonódott morfogenetikai és szöveti differenciálódási lépések láncreakciójából áll.

A gerincesek csontos vázelemei két úton fejlődnek ki. Intramembrán (desmogen), vagy endochondrális (chondrogen) csontosodással. Mindkét folyamat során az elkötelezett sejtek (osteochondroprogenitorok) az embrió meghatározott helyein kondenzálódnak és osteoblastokká, vagy chondrocytákká differenciálódnak.

Az **intramembrán csontosodás** során az osteoblastok, melyek a csontszövetre jellemző mátrixot termelik, közvetlenül a kondenzálódott mesenchyma sejtekből alakulnak ki. Így fejlődnek az agykoponya lapos csontjai és a kulcscsont [27,28].

Az **endochondrális csontosodás** során a kondenzálódott mesenchyma sejtekből egy átmeneti porcos váz fejlődik, ami a folyamat végére csonttá alakul. Ez jellemző a végtagok hosszú csontjainak, a bordáknak, a csigolyáknak és az arckoponya legtöbb csontjának kialakulására. Ez többlépcsős, rendkívül szigorúan szabályozott folyamat, melynek során jelentős morfológiai és génexpressziós változások zajlanak le. A differenciálódás folyamatát a Sox9 és két további porcspecifikus Sox faktor irányítja (ld. később). Minden differenciálódási stádiumban az adott állapotra jellemző markergének kifejeződése detektálható.

A porcdifferenciálódás első lépése a mesenchyma sejtek kondenzációja meghatározott helyen, időben és meghatározott sejtszámmal. Ebben a folyamatban olyan jelmolekulák szerepelnek, melyek indukálják a sejtadhéziót, gap junction kialakulást és a citoszeletális váz átrendeződését [29]. A kondenzáció központjában levő sejtek előbb prechondrocytákká, majd chondroblastokká kezdenek fejlődni, amik intenzíven osztódnak és elkezdik termelni a porcszövetre jellemző mátrix fehérjét (II., IX., XI. típusú kollagén, aggregán, chondromodulin-1). A periferián levő néhány sejtréteg fibroblaszt-szerű perichondriális sejtté alakul.

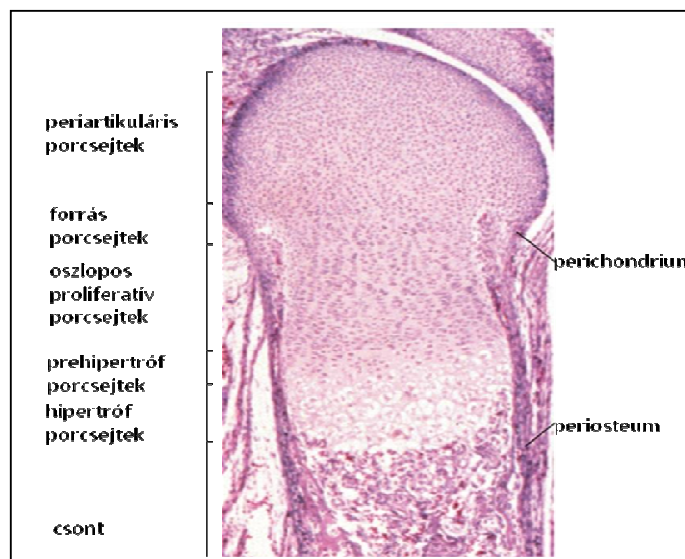
A chondroblastok gyorsan osztódnak, korai és késői proliferatív stádiumokon keresztülhaladva végül hipertróf porcsejteké differenciálódnak, melyek jellemző markereket kezdenek szintetizálni (X. típusú kollagén, osteopontin, MMP9, MMP13). Közben a perichondrium sejtjei és a hipertróf porcsejtek elkezdik termelni az angiogenesisz stimulátorát is, a VEGF-et [30]. A következő lépésben a mátrix mineralizálódik, a perichondriumon keresztül kapillárisok lépnek a fejlődő csontba, amik az apoptózissal elhalt hipertróf sejteket eltávolító chondroclastokat és újabb differenciálatlan mesenchyma

sejteket hoznak. Utóbbiak osteoblastokká alakulnak, amik a X. típusú kollagén előmintázaton csontos mátrixot raknak le, így végül a porcos váz elcsontosodik. A belépő myeloid eredetű sejtekből differenciálódó osteoclastok a csont folyamatos bontását végzik [28]. Az epifízeális porcok felszíni rétege azonban nem fejlődik csonttá, hanem ízületi porcként funkcionál életünk végéig.

Az epifízeális porc és a csontok hosszanti növekedése a felnőtt kor eléréséig egy speciális porcos struktúrához köthető, amit növekedési korongnak nevezünk. Az itt lévő chondrocyták morfológiailag és metabolikusan is elkülöníthető zónákba rendeződnek, melyek megfelelnek az embrionális porcfejlődési stádiumoknak [31] (2. ábra). A zónák egymáshoz viszonyított mérete fajonként eltérő [32,33]. A diafizistól legtávolabb eső sejtek alkotják a forrás (source) chondrocyták zónáját. Ezek a sejtek kicsik, azonos alakúak és gyorsan osztódnak. A következő zónát az oszlopos proliferatív porcsejtek alkotják, ezek lassabban osztódnak, oszlopokba rendeződnek és matrilin-1-et termelnek. Az osztódás intenzitása az oszlopokon lefelé haladva csökken.

A proliferációt követően a sejtek egy átmeneti prehipertróf zónába rendeződnek.

Az epifízis-diafízis határhoz legközelebb eső, nagyobb méretű, szabálytalan alakú chondrocyták alkotják a hipertróf zónát, melynek sejtjei rendkívül fontos szerepet töltenek be a növekedési korong struktúrájának fenntartásában és a csontosodási folyamatok szabályozásában azáltal, hogy a szomszédos szövetekben osteogenezist indukálnak szekretált faktorok és sejt-sejt kapcsolatok módosítása révén [34,35].



2. ábra A hosszú csontok növekedési korongjának felépítése. A forrás porcsejtek zónáját kisméretű, gyorsan osztódó sejtek alkotják. A proliferatív zónában a sejtek lassabban osztódnak, oszlopokba rendeződnek. A proliferációt követően a sejtek egy átmeneti prehipertróf zónába rendeződnek. A hipertróf zónát nagyobb méretű, szabálytalan alakú chondrocyták alkotják [129].

1.5. A chondrogenezist és a csontok hosszanti növekedését szabályozó fontosabb jelátviteli utak

A porcképződést transzkripciós faktorok és különböző növekedési faktorok szoros együttműködése szabályozza. A porcdifferenciálódás fő transzkripciós faktora a Sox9, ami bekapcsolja a Sox5, Sox6 géneket, melyekkel együtt irányítja a porcfejlődés folyamatát a hipertróf stádiumig. A porcdifferenciálódást és a csontok hosszanti növekedését azonban más jelátviteli út befolyásolja. A csontok hosszanti növekedésében a növekedési korong zónáin áthaladó porcsejtek játszanak szerepet. A növekedés mértékét a prehipertrófból a hipertróf stádiumba átlépő sejtek száma határozza meg, melyek helyére majd osteoblastok lépnek. A növekedési korong zonális szerkezetét az alábbi jelátviteli utak tartják fenn.

A **PTHrP** (parathyroid hormone-related peptide) a perichondriális sejtekben, az ízületi felszínen az epifízeális porcsejtekben és a korai proliferatív chondrocytákban expresszálódik [36]. Receptora (PPR) a proliferatív chondrocytákon kis számban expresszálódik, de az oszlopos porcsejtzónán lefelé haladva a receptorok száma egyre nő. A PTHrP a porcsejteket proliferatív stádiumban tartja, megakadályozza a hipertrófiát [37], behatárolva ezzel azoknak a sejteknek a számát, amelyek Ihh-t expresszálnak. A prehipertróf zónában termelődő Ihh fokozza a PTHrP termelődését a periartikuláris régióban. Így az Ihh a PTHrP-vel negatív visszacsatoláson keresztül szabályozza a porcsejt differenciálódás mértékét. Csak a PTHrP termelődés helyétől legtávolabb eső sejtek tudnak a gátlás alól felszabadulni, prehipertróf stádiumba lépni és Ihh-t termelni, mely fenntartja a PTHrP expressziót [38].

A PTHrP receptorokat érintő mutációk mindegyike súlyos fejlődési rendellenességekkel jár. Ilyen például a Blomstrand chondro-osteodisztrófia, ahol a megrövidült végtagok idő előtti csontosodást mutatnak. A betegség minden esetben születés előtti halálhoz vezet [39]. A PTHrP receptorok folyamatos aktivációja Jansen-féle metafízeális diszpláziát okoz, melynek során a megrövidült végtagokban a porcsejtek nem hipertrofizálnak [40]. Az Ihh gén mutációja emberben A1 típusú brachydactyliát okoz, melyet alacsony testmagasság és megrövidült ujjpercek jellemeznek [35].

Szerepet játszanak még a chondrogenezisben az **FGF** (fibroblast growth factor) család tagjai és receptoraik. Az eddig azonosított 22 FGF ligand és 4 FGF receptor közül a porcfejlődés minden stádiumában kifejeződik valamelyik, bár szerepük nem minden folyamatban tisztázott [41]. Közülük legfontosabb az FGFR3, melyet főként a proliferatív

és a korai hipertróf porcsejtek expresszálnak. Ezt a receptort több FGF ligand is képes aktiválni, de a növekedési korongban ezek közül az FGF18 a legjelentősebb [42]. A receptor működése többek között olyan jelátviteli utakat aktivál, melyeknek eredményeképpen a Stat1 transzkripció faktor foszforilálódik, így növeli a p21 sejtciklus inhibitor expresszióját, emiatt a porcsejtek proliferációjának mértéke csökken és továbblépnek a hipertróf stádiumba [29,42].

Az FGFR3 gént érintő mutációk a receptor folyamatos aktivációjához vezetnek, ami emberben a végtagrövidülések különböző formáit okozza. Ezek közül a legismertebb az achondroplasia [42,43].

A **BMP-k** (Bone Morphogenetic Proteins), melyek a TGF β (transforming growth factor β) család tagjai, minden fejlődési folyamatnak fontos résztvevői. A BMP2, -4, -7 együttműködve szabályozza a mesenchyma sejtek kondenzációját és az ízületek kialakulását, illetve később a hosszúcsontokban többek között a BMP-k szabályozzák a porcsejtek érését és terminális differenciálódását. Hatásukra megnő a proliferáció mértéke, így a vázelemek mérete növekszik [44,45]. A BMP jelátviteli út több ponton antagonistaként hat az FGF jelátviteli utakra [46], az Ihh/PTHrP visszacsatolási hurkot pedig azáltal befolyásolja, hogy az Ihh expresszióját indukálja [47].

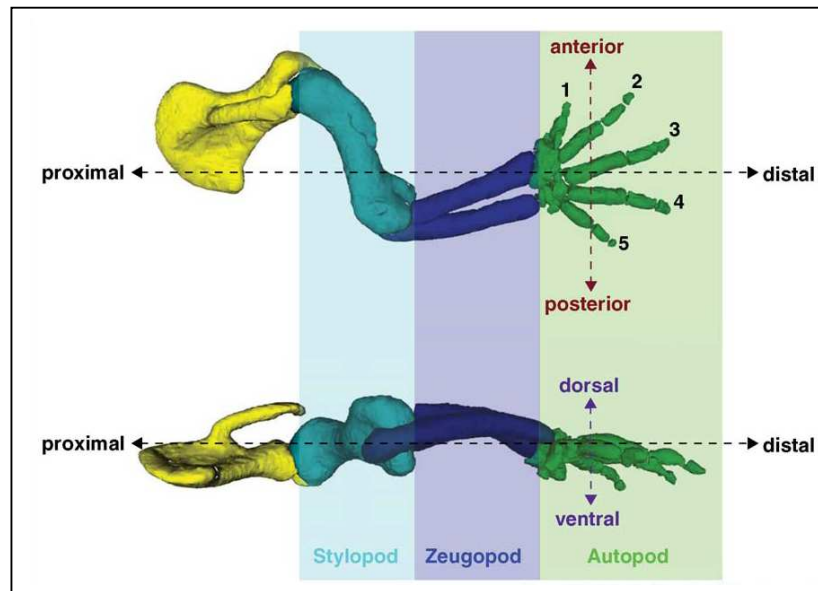
A mesenchyma sejtek kondenzációját szabályozó egyik fontos jelátviteli út a **Wnt/ β -catenin** út. A Wnt jelátviteli út aktivációjának hatására az addig foszforilált állapotban lévő β -catenin stabilizálódik és a sejtmagba transzportálódik, ahol gátolja a Sox9, a chondrogenesis fő regulátorának (ld. később) expresszióját, megakadályozva ezzel a porcfejlődést [48,49]. Ugyanennek az útnak a chondrogenesis későbbi szakaszaiban is fontos szerepe van, hiszen a porcsejtek proliferációját és hipertróffá alakulását szabályozza együttműködve az Ihh jelátviteli úttal [50,51].

Az említetteken kívül számos más faktor is részt vesz a porcdifferenciálódás szabályozásában, melyek egymással kölcsönhatva alakítják ki a vázelemeket.

1.6. A vázfejlődés morfogenetikus szabályozása

A vázfejlődés során a szöveti differenciálódás a morfogenetikus szabályozás függvényében történik. A képződő vázelemek számának, méretének és 3-dimenziós alakjának meghatározása megelőzi a morfológiai megjelenésüket. A morfogenetikai szabályozás a végtagváz esetében a legismertebb. A gerincesek végtagjai a laterális lemez mezodermből alakulnak ki az embrióban. A szabályozási mechanizmusok, melyek a

mesenchymális progenitor sejteket kifejlett végtag elemekké alakítják három tengely mentén hatnak: proximo-disztális (PD), a válltól az ujjak irányába; anterior-poszterior (AP), a hüvelykujjtól a kisujj irányába; dorzo-ventrális (DV), a kézfejtől a tenyér irányába. A végtagok három doménből állnak, melyek különböző struktúrákat tartalmaznak. A stylopodium tartalmazza a humerust, illetve a femurt, a zeugopodium a radiust és ulnát, illetve a tibiát és fibulát, az autopodium pedig a középcsontokat és az ujjakat [52].



3. ábra A végtagfejlődés három tengely mentén történik. A proximo-disztális tengely a válltól az ujjakig, az antero-poszterior tengely a hüvelykujjtól a kisujjig, a dorzo-ventrális tengely a kézfejtől a tenyér irányába mutat. A végtagok három doménből állnak: a stylopodium tartalmazza a humerust, illetve a femurt, a zeugopodium a radiust és ulnát, illetve a tibiát és fibulát, az autopodium pedig a középcsontokat és az ujjakat [51].

A végtagfejlődést három fő szignalizációs központ szabályozza. Az **apikális ektodermális gerinc** (Apical Ectodermal Ridge, AER) a végtagbimbó disztális részén az ektoderma magvastagodása, ahol proliferatív, differenciálatlan sejtek helyezkednek el, melyek a végtagbimbó PD irányú fejlődését biztosítják. Ennek a szignalizációs központnak a működését főként négy FGF szabályozza: FGF4, 8, 9, 17. Ezek mellett a BMP és wnt család több tagja is termelődik ebben a régióban. Egy újabb modell szerint a végtag mesenchyma sejtek elsődlegesen a proximális irányt meghatározó jelet kapnak a laterális mezodermából, ami valószínűleg a retinasav (RA), mely a Meis homeobox transzkripciós faktorok aktiválásán keresztül valósítja meg a proximális struktúrák (stylopodium) kialakítását [53]. Ezután az AER-ből érkező ellentétes FGF szignál hatására alakulnak ki a disztális struktúrák (autopodium). A zeugopodium struktúrái sejtkapcsolatok kialakulásával fejlődnek ki a proximális és disztális domének határán.

A **polarizációs zóna** (Zone of Polarizing Activity, ZPA) a végtagbimbó disztális, poszterior részén lévő sejtek csoportja, mely a Sonic hedgehog (Shh) morfogént szekretálja, amely az AP tengely mentén történő fejlődés (az ujjak kialakulása) fő szabályozója. A ZPA-ban történő Shh expresszióhoz a Hoxb8 és az 5' HoxD gének (HoxD10-13) aktivációja szükséges [54]. Később az autopodium morfogenezise során a gének expressziója Shh függővé válik [55]. Az Shh úgy fejt ki hatását, hogy az AP tengely mentén grádiens képez. Azok a sejtek, melyek magas Shh koncentrációnak vannak kitéve poszterior struktúrákat alakítanak ki, míg az Shh forrástól távolabb lévő sejtekből anterior struktúrák lesznek. Az ujjak kialakulásában nem csak az Shh koncentrációjának van kritikus szerepe, de annak is, hogy a sejtek mennyi ideig vannak kitéve az Shh hatásának [56].

Az Shh és az FGF útvonalak között egy pozitív feedback loop alakul ki, melynek során az Shh hatására az FGF8 folyamatosan termelődik, ami indukálja és fenntartja az FGF4, 9 és 17 expressziót, míg az FGF jelátviteli út az Shh expressziójának fenntartásához szükséges [57].

Klasszikus embriológiai kísérletekkel azonosítottak egy szignalizációs központot a **dorzális ektodermában**, melynek a végtagbimbó DV tengelyének kialakításában van kulcsszerepe. Itt Wnt7a termelődik, mely a wnt útvonalon keresztül szabályozza az Lmx1b LIM homeobox gén expresszióját, melynek a dorzális struktúrák kialakításában van szerepe [58].

A dorzális ektoderma és a ZPA jelátviteli útjai között is van kapcsolat, mivel a Wnt7a szükséges a normál Shh expressziós szint fenntartásához [59].

2. AZ EUKARIÓTA GÉNEK TRANSZKRIPCIÓS SZABÁLYOZÁSA

2.1. Az eukarióta génexpresszió szabályozásának lehetőségei

A génexpresszió szabályozásának legmagasabb szintje a **kromatin szintjén** történő szabályozás. Eukariótákban a transzkripció templátja nem a szabad DNS, hanem a kromatin. Ennek ismétlődő egységei a nukleoszómak, melyekben 145-147 bp-nyi DNS tekeredik fel egy hiszton oktamerre, mely a core hisztonokból (H2A, H2B, H3, H4) két-két molekulát tartalmaz. A nukleoszóma közötti linker DNS-hez a H1 hiszton kötődik. Ez a konzervált nukleoprotein komplex 200 ± 40 bp-nyi távolságokban fedi le az eukarióta

genomot [60,61]. Eukariótákban két mechanizmus van, ami a kromatint hozzáférhetővé teszi a transzkripció faktorok és kofaktoraik számára. Kromatin módosító és kromatin remodeling komplexek. A kromatin módosítások a hisztonokon történő poszttranszlációs módosítások, melyek általában a hisztonok N-terminális régióját érintik (acetiláció, metiláció, foszforiláció, ubiquitináció, sumoyláció, ADP-ribóziláció) [62]. A módosításokat enzimkomplexek végzik, közülük legjobban jellemzettek a hiszton acetil-transzferázok (HAT). A folyamat reverzibilis, az acetil csoportok eltávolítását a hiszton deacetilázok (HDAC) végzik. A hiszton remodeling komplexek közös tulajdonsága, hogy a nukleoszómák elmozdításához ATP hidrolíziséből nyerik az energiát [63].

A génszabályozás második szintje a **transzkripció szintjén** történő szabályozás. Ez a nyitott kromatin régiókon megy végbe és lehetővé teszi az eukarióta gének szövetspecifikus és fejlődési stádiumspecifikus kifejeződését egy előre meghatározott program szerint. Ezt a programot különböző transzkripció faktorok (*transz* faktorok) irányítják, amelyek a DNS specifikus szakaszaikhoz (*cisz* elemek) kötődnek azon gének környezetében, melyeknek működését szabályozzák. Együtműködésük biztosítja, hogy a megfelelő gén promotere hozzáférhető legyen a transzkripció apparátus számára.

Amikor a transzkripció komplex összeszerelődik, az RNS polimeráz II (polII) C-terminális doménje foszforilálódik, elindul a transzkripció. Az elongációt a polIII aktivitásának szabályozásával több faktor irányítja [64].

A kromatin- és transzkripció szintű szabályozás mellett lehetőség van még a génexpresszió szabályozására a splicing és a transzláció szintjén is.

2.2. A transzkripció szabályozásban résztvevő fontosabb fehérje komponensek

Az általános transzkripció faktorokon (TFIIA-J) és asszociált faktorokon (TAF) kívül a transzkripció szabályozás fontos résztvevői a tulajdonképpeni transzkripció faktorok. Ezek általában nagy affinitással, szekvencia-specifikusan kötődnek a DNS nagy árkába. A transzkripció faktorok moduláris felépítésűek, többségük rendelkezik DNS-felismerő és -kötő, dimerizációs és transzaktivációs doménnel is. A DNS-kötő domének lehetnek Zn-finger, helix-loop-helix, Leu-zipper, vagy homeodomén motívumok. Ilyen tulajdonképpeni transzkripció faktorok például az NF1, IL1 és Hox faktorok. Ezek általában kooperatívan kötődnek a szabályozó régiókhoz. Több fehérje-fehérje interakcióra van szükség ahhoz, hogy a szabályozó fehérjék a megfelelő affinitással kötődjenek a megfelelő DNS szakaszhoz. Az enhancereken kialakuló olyan nukleoprotein

komplexeiket, melyeket a transzkripció faktorok, aktivátorai és a szerkezeti fehérjék alkotnak, enhanceoszómáknak nevezzük.

Az említett faktorokon kívül a transzkripció szabályozásban szerepet játszanak még a hisztonok és a nem-hiszton kromatin komponensek. Utóbbiak közül a HMG (High Mobility Group) szuperfamilia kiemelkedő jelentőségű. Három fehérjefamilia tartozik ide: HMGA (HMG-AT hurok), HMG (HMG-nukleoszóma-kötő) és HMGB (HMG-box). A különböző HMG családok tagjai a legtöbb eukarióta sejtben kifejeződnek, változatos funkciókat látnak el. Különböző struktúrájú, egyedi DNS-kötő motívumokat tartalmaznak. A HMGB családba tartozó összes fehérje rendelkezik DNS-kötő doménnel (HMG-box), de nincs transzaktivációs doménjük. Nem szekvencia-specifikusan a DNS kis árkába kötődnek, ezzel meghajlítva azt [75].

Vannak a HMG fehérjék és a tulajdonképpeni transzkripció faktorok közötti átmeneti tulajdonságokkal rendelkező transzkripció faktorok is. Ilyenek a Sox familia tagjai, melyek HMG doménjükkel kis szekvencia-specifitással és kis affinitással kötődnek a DNS kis árkába. Egyes Sox fehérjék rendelkeznek transzaktivációs doménnel is, ilyen például a kondrogenezis fő regulátora, a Sox9 (ld. később).

Az RNS polimeráz II a számos alegységével és aktivitását szabályozó több faktortal az eukarióta transzkripció motorja [64].

2.3. A transzkripció szabályozásban résztvevő DNS elemek

A **core promoter** a gén transzkripció start helye (+1) körüli régió, amely egy, vagy több felismerő helyet tartalmaz a szabályozó fehérjék részére. E fehérjék kötődése szükséges a preiniciációs komplex (PIC) összerendeződéséhez. A legismertebb ilyen szekvencia a TATA-box, egy konszenzus AT gazdag régió, ami köthelyet biztosít a TBP (TATA-kötő fehérje) részére [65]. Ez a transzkripció startpont előtt 25-30 bázispárral helyezkedik el, biztosítva, hogy a transzkripció pontosan a +1 pozícióban induljon el. A TBP a TAF-okkal (TBP asszociált faktorok) együtt alakítja ki a több alegységből álló iniciációs komplexet, a TFIID-t. A TFIID kötődése a TATA boxhoz az első lépése a stabil transzkripció komplex kialakulásának. Más általános transzkripció faktorok (TFIIA-J) és az RNS polimeráz II kötődésével alakul ki a PIC [66].

A TATA boxon kívül más DNS elemek is vannak a core promotereknek. Ilyenek az Inr (initiator element), DPE (downstream promoter element), BRE (TFIIB recognition element). Alacsonyabbrendűek core promoterében egyetlen transzkripció starthely van,

míg a magasabbrendű eukarióták core promotereire jellemző, hogy több potenciális transzkripciós starthellyel rendelkeznek, melyek egy 50-100 bp-os szakaszon belül helyezkednek el [67,68].

A TATA-boxtól 5' irányban - általában 40-110 bp távolságban - egyéb promoter elemek is találhatóak, lehetnek általánosan előforduló aktivátorok felismerőhelyei. Ezek megléte nem jellemző minden génre, de ha jelen vannak, akkor a transzkripció intenzitását szabályozzák. Ilyenek például a CCAAT-box és a GC-box.

Vannak **pozitív és negatív szabályozó elemek**, melyek bizonyos távolságon belül, vagy pozíciójuktól függően aktiválják, vagy gátolják a promoter működését.

Az **enhancerek** a transzkripciós starthelytől sokkal távolabb elhelyezkedő szabályozó régiók, amelyek a géntől mért távolságuktól és orientációjuktól függetlenül képesek nagyságrendekkel megnövelni a promoter aktivitását. Elhelyezkedhetnek exonban, intronban, az 5' és 3' nem transzlálódó régiókban. Egér és humán szövetspecifikus enhancerekre jellemző, hogy akár 100 kbp távolságra is elhelyezkedhetnek a génhatároktól [69]. Működésükre jellemző, hogy bizonyos enhancerek a TATA boxot tartalmazó promotereket preferálják, mások viszont a DPE tartalmúakat [70].

Az enhancerek szekvenciája a halaktól az emlősökig rendkívül konzervált, jelentőségüket az is jelzi, hogy bizonyos betegségek kialakulásában az enhancer szekvenciákban bekövetkező deléciók, mutációk játszanak szerepet. Ilyen például a vázfejlődés szabályozásában kulcsfontosságú Shh gén regulátorában, a ZRS (ZPA regulatory sequence) végtagspecifikus enhancerben bekövetkezett pontmutáció, amely preaxiláris polydactiliát okoz [71,72].

A **silencerek** az enhancerekkel ellentétes működésű reguláló elemek, amelyek az adott gén kifejeződését távolságtól és iránytól függetlenül erőteljesen gátolják.

A silencer elemek rövid motívumok, melyek pozíciójuktól függetlenül, a hozzájuk kötődő represszor fehérjék által megakadályozzák a PIC összeszerelődését. Ezek általában a transzkripciós starthelytől 3' irányban helyezkednek el [66,73].

Az enhancerek és silencerek több gén működését is irányíthatják, de bizonyos esetekben ezek az interakciók nem kívánatosak. Kivédésükre alakultak ki az **inzulátorok**, melyek olyan cisz reguláló elemek, amik megakadályozzák, hogy a szabályozó régiók a szomszédos géneken is kifejtsék hatásukat. Az inzulátorok két módon működhetnek. Ha az enhancer és a promoter között helyezkednek el, akkor direkt módon akadályozzák az enhancer-promoter komplex kialakulását. Ha az eu- és heterokromatin határokon

helyezkednek el, akkor pedig akadályozzák a kromatin túlzott mértékű átrendeződését [74].

2.4. A transzgenikus állatmodellek szerepe az eukarióta génreguláció tanulmányozásában

A transzgenikus technikák lehetőséget kínálnak többek között a génreguláció és a sejtdifferenciálódás tanulmányozására, szövet- és fejlődési állapot-specifikus szabályozó elemek *in vivo* azonosítására, valamint humán genetikai betegségek modellezésére emlős rendszerekben. A leggyakrabban használt modell állat az egér, mivel rövid a generációs ideje, viszonylag könnyen tartható, valamint a rendelkezésre álló transzgenikus technikák jelentős részét egérben írták le.

Transzgenikus állatok előállítása többféle módszerrel lehetséges.

A rekombináns DNS technikával előállított DNS vektorok mikroinjektálással való direkt bejuttatása megtermékenyített petesejtek hím előmagjába az egyik elsőként leírt [76], leginkább elterjedt és sikeres módja a transzgenikus állatok előállításának. Ez a rendszer lehetővé teszi a bejuttatott konstrukció hatásának tanulmányozását a normál embrionális fejlődés során. Az injektáláshoz linearizált DNS-t használnak, amit előzőleg baktériumokban szaporítanak fel. A rekombináns DNS-ből általában több kópia jut be, ezek legtöbbször együtt, fej-láb elrendezésben integrálódnak a genomba. A kromoszómán az integrációs helyet a véletlenszerűen létrejövő kromoszómális törések szolgáltatják. A beépülés a kromoszómaszerkezetben átrendeződéseket, deléciókat, duplikációkat, inverziókat is okozhat, így az integrálódás helye módosíthatja a kifejeződési mintázatot. Hasonló hatású lehet, ha erős promotor/enhancer, illetve represszor környezetébe integrálódik a transzgén. Létfontosságú génbe való beépülés fenotípusváltozást okozhat, vagy inszerciós mutáció lehet a következménye, ami több biológiai funkciót is befolyásolhat, vagy embrióhalált okozhat [76]. A pozíció effektusok kiküszöbölésére a transzgén konstrukciókba célszerű inzulátor szekvenciákat építeni. A genomi környezetből adódó hatásokat pedig megfelelő számú alapító embrió, illetve az azokból létrehozott transzgenikus vonalakból származó állatok vizsgálatával detektálhatjuk.

Általában jellemző, hogy a transzgénben jelenlévő intronok növelik az expresszió szintjét [77], mivel ezek jelenléte lehetővé teszi a transzgén splicing-ját, ami stabilabb mRNS

kialakulását és az RNS hatékonyabb transzportját eredményezi a sejtmagból a citoplazmába [130].

Korlátai ellenére a pronukleusz mikroinjektálás egyszerűbb és gyorsabb módja a reguláló régiók működésének *in vivo* vizsgálatára, mint az ES sejtekben történő homológ rekombináción és blasztocishta injektáláson alapuló, költségesebb módszer.

3. A PORCSPECIFIKUS GÉNEXPRESSZIÓ TRANSZKRIPCIÓS SZABÁLYOZÁSA

3.1. A Sox-trió

A porcfejlődésben szerepet játszó transzkripció faktorok közül a legfontosabbak a HMG (high mobility group) domént tartalmazó Sox (Sry-related HMG box) család tagjai. Nevüket az Y kromoszómán lévő here fejlődést meghatározó SRY (Sex-determining region on Y chromosome) fehérje után kapták. Azok a transzkripció faktorok tartoznak ebbe a családba, amelyek HMGB doménje legalább 50%-os homológiát mutat a SRY HMGB doménjével. Az ide tartozó transzkripció faktorokat szekvencia homológia alapján emberben és egérben nyolc alcsoportba lehet osztani [78].

A tipikus transzkripció faktorokkal ellentétben a Sox fehérjék a DNS kis árkába gyengén kötődve hajlítják meg azt. A kötődés kis szekvencia specificitású, konszenzus felismerőhelyük a következő: 5'-(A/T)(A/T)CAA(A/T)G-3' [78,79].

A chondrogenesis szempontjából kiemelkedően fontos Sox faktorok az ún. Sox trió tagjai: A **Sox5/L-Sox5** és **Sox6** a D csoportba tartoznak, nem rendelkeznek transzaktivációs doménnel, inkább a transzkripció komplexek szerkezetének kialakításáért felelősek.

A **Sox9** az E csoport tagjaként rendelkezik transzaktivációs doménnel, transzkripció faktorként direkt szerepe van több porc mátrix fehérjét kódoló gén, többek között a matrilin-1 gén szabályozásában is [80].

A Sox-trió tagjai közül a Sox9 a porcképződés fő regulátora, de más szervek, szövetek (hím nemi szervek, szív, oligodendrociták) embrionális fejlődése során is jelentős a szerepe [81,82]. A porcfejlődés során már az elkötelezett osteochondroprogenitorokban expresszálódik és a mesenchyma sejtek kondenzációjától egészen a prehipertróf stádiumig aktív. Emberben a Sox9 gén haploid mutációja campomelic displasiát okoz, mely a hosszú csontok abnormális görbületével és egyéb fejlődési rendellenességekkel jár [83]. Egérben

heterozigóta Sox9 mutánsok a campomelic displasiahoz hasonló vázfejlődési rendellenességeket mutatnak, a mesenchyma sejtek kondenzációja nem, vagy késve megy végbe, a hipertróf zóna kiterjedtebb, a porc idő előtt mineralizálódik [84,85]. További „loss-of-function” és „gain-of-function” mutánsok vizsgálata során bebizonyosodott, hogy a Sox9-nek nem csak az osteochondroprogenitorok elköteleződésében és a mesenchyma sejtek kondenzációjában van szerepe, hanem a porcsejtek osztódásában,érésében a hipertróf stádium eléréséig [82].

Annak ellenére, hogy a Sox9 a porcfejlődés fő regulátora, szabályozásának pontos mechanizmusa még nem ismert. Több kísérleti rendszerben azonban kimutatták, hogy a chondrogenézisben szerepet játszó bizonyos jelmolekulák a Sox9 szabályozói transzkripció, illetve fehérje szinten is.

Mesenchyma és chondrocyta sejtekben több FGF ligand is jelentősen megnöveli a Sox9 kifejeződési szintjét a MAPK jelátviteli úton keresztül [86].

A Sox9 két konszenzus foszforilációs helyet tartalmaz a cAMP-függő protein kináz A (PKA) számára. A foszforiláció megnöveli a fehérje DNS-kötő kapacitását és transzkripció aktivitását [87]. Mivel a PKA a PTHrP jelátviteli út egyik komponense, valószínű, hogy a Sox9 a PTHrP út egyik célmolekulája. Ezt támasztja alá az az eredmény is, hogy a H89, ami a PKA specifikus inhibitora, gátolja a Sox9 foszforilációját [87].

Az IL1 és a TNF α gátolják a Sox9 gén expresszióját. Ezt a hatásukat valószínűleg az NF κ B úton keresztül érvényesítik [88], ahogy azt humán csigolyaközi porckorongokból izolált sejtek esetében tapasztalták *in vitro* kísérletekben [89].

Leírták továbbá, hogy a Sox9 a CBP/p300 (Creb-binding protein) komplexhez kapcsolódva kötődik a *Col2a1* gén enhanceréhez, aktiválva ezzel a transzkripciót [90].

Ezek az adatok is azt támasztják alá, hogy a Sox9 a porcfejlődés szabályozásában nélkülözhetetlen.

A chondroblastok differenciálódásához és a növekedési korong zonális szerkezetének kialakulásához a Sox9-en kívül L-Sox5/Sox6-ra is szükség van. Hiányukban nem aktiválódik a matrilin-1 gén és csökken a többi porcfehérje gén (*Agc*, *Crt11*) expressziós szintje is.

Az L-Sox5 (a Sox5 hosszabb izoformája) és Sox6 gén kifejeződési mintázata a porcfejlődés során nagymértékben átfed a Sox9 génével [91]. Ezen gének külön-külön kiütése kisebb vázrendszeri eltéréseket okoz, viszont mindkét gén együttes kiütése általános chondrodysplasiához vezet [92].

3.2. A Sox-trió által szabályozott porc mátrix fehérjéket kódoló gének

A Sox-trió több porc mátrix fehérjét kódoló gén szabályozásában fontos résztvevő. A Sox9 az N-terminális HMGB doménjein keresztül homodimerként, míg a Sox5, Sox6 az N-terminális coiled-coil doménjein keresztül homo-, illetve heterodimerként kapcsolódik a kötőhelyeihez [93,94].

A Col2a1 gén porcspecifikus szabályozó régiójának első intronjában azonosítottak egy 48 bp hosszúságú enhancer elemet, amelynek jelenléte elégséges feltétele a gén porcspecifikus expressziójának [95]. Ez az enhancer elem négy Sox kötőhelyet tartalmaz, melyen keresztül a Sox-trió más transzkripciós faktorokkal együttműködve aktiválja a *Col2a1* működését [96].

A Col9a1 gén enhancer elemében négy Sox konszenzus motívumot azonosítottak, melyek kettesével rendeződnek párokba. Ezekhez két Sox9 dimer kötődése szükséges a transzkripció aktiválásához [97].

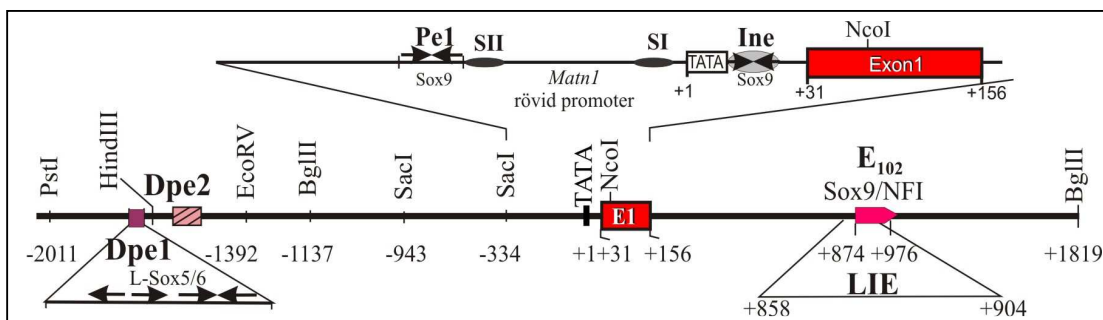
Hasonló HMGB domén kötőhelyeket találtak a Col11a2 gén promoterének 5' régiójában, melyekről szintén kiderült, hogy képesek Sox9-cel (és egyéb faktorokkal) transzkripciós komplexet létrehozni, mely porcspecifikus expressziót eredményez [98].

A legutóbb felfedezett kollagén, a Col27a1 gén enhancer elemében szintén találhatók Sox9 kötőhelyek, melyek aktív szerepet játszanak a gén transzkripciós szabályozásában [99].

A kollagéneken kívül más mátrix fehérjéket kódoló gének szabályozásában is részt vesznek a Sox-trió tagjai. Ilyen például az aggregán gén, melynek a 4,5 kb-os első intronja tartalmaz Sox9 kötőhelyeket [100]. A CD-RAP (cartilage-derived retionic acid-sensitive protein) gén promoterében szintén található Sox konszenzus motívum, melyhez a Sox9 kötődése aktiválja a transzkripciót [101].

Ezen gének Sox faktorok által történő szabályozásának közös vonása, hogy a Sox kötőhelyek minden esetben több kópiában, ellentétes orientációban helyezkednek el, hozzájuk a Sox9 mindig dimer formában kötődik. Számos kísérlet támasztja alá, hogy a Sox9 dimerizációjára csak a chondrogenézis szabályozásában van szükség, míg a nemi jelleg kialakításában szerepet játszó két ismert gén, az *SFI* (Steroidogenic Factor 1) és az *AMH* (anti-Müllerian hormon) esetében a Sox9 monomer formában kapcsolódik az egy kópiában jelen lévő kötőhelyéhez [102].

3.3. A matrilin-1 gén szerkezete és transzkripció szabályozása



4. ábra A csirke matrilin-1 gén szabályozó elemei és a hozzájuk kötődő transzkripció faktorok. Dpe1 és Dpe2, disztális promotor elemek; E₁₀₂, 102 bp-os introni elem; Ine, iniciátor elem; LIE, introni elem; Pe1, proximális promotor elem; SI és SII, silencer elem I és II.

Csoportunk korábbi kísérletekben már felderítette a csirke matrilin-1 gén szerkezetét és fő szabályozó régióit. Ez a gén a csirke genomban egy kópiában található meg. 18 kb hosszúságú, nyolc exonból és hét intronból épül fel [103]. A génnek két transzkripció startpontja van, amik egymástól nyolc bp távolságra helyezkednek el. A promotor régióban egy CAT- és egy TATA-szerű szekvencia (TTAATA) található. A TATA-box és annak közvetlen környezete szövetspecifikusan működik, tranziens expressziós kísérletekben CAT riporter gén elé építve minimálpromoterként funkcionál, mely fibroblasztokban is aktív [103].

Korábbi tranziens expressziós vizsgálatokból kiderült, hogy mind az első intron, mind pedig a hosszú promotor szakasz tartalmaz porcspecifikus szabályozó régiókat [104]. Mivel a gén minimál promotere viszonylag alacsony aktivitású, ezért valószínűnek látszott, hogy a transzkripció hatásfokának megnöveléséhez erős pozitív szabályozó elemek jelenléte szükséges. Ilyen porcspecifikus enhancer elemet azonosítottak az első intronban a +578 és +966 bázispárok között [104]. A matrilin-1 gén szabályozásában silencer elemek is közreműködnek. Ilyen régió található a gén promotere előtt 10.7 és 6.8 kb távolságban, amely chondrocyta-specifikusan működik. A-334 és -15 helyzetű proximális promotor szakasz két negatív szabályozó elemet hordoz, melyek tranziens expressziós kísérletekben mind chondrocytáiban, mind fibroblasztokban működnek és Nfi transzkripció faktor kötőhelyeket tartalmaznak [105] (4. ábra).

Korábbi kísérletek azt mutatják, hogy a csirke gén transzgenikus egerekben is jellegzetes, szűkített porcspecifikus kifejeződést mutat és nem aktív a fiatal chondroblastokban [106]. A hosszú promotor egyedül, vagy az introni szakasszal együtt

képes az endogén génre jellemző szövet- és fejlődési állapot-specifikus riportergén kifejeződést irányítani porcsejtekben. A legmagasabb szintű expresszió a növekedési korong proliferatív és prehipertróf zónáiban figyelhető meg. A rövid promoter az introni szakasszal együtt is képes hasonlóan szűkített, porcspecifikus mintázatú, de sokkal kisebb aktivitású riportergén expressziót irányítani [107].

CÉLKITŰZÉSEK

A matrilin-1 gén egyedi tulajdonsága, hogy kifejeződése az endochondrális csontosodás során a növekedési korong proliferatív és prehipertróf zónáira korlátozódik. Ez olyan szabályozó mechanizmusokat feltételez, melyek hasonlóak, illetve különbözőek lehetnek más porc mátrix fehérjéket kódoló gének transzkripció szabályozásától.

Kísérleteinkkel arra keressük a választ, hogy a gén korábban már azonosított szabályozó elemei közül melyik és milyen mértékben befolyásolja a szövet- és fejlődési állapot-specifikus kifejeződést, valamint hogy azonos, vagy különböző DNS szakaszok felelősek-e ezért a szabályozásért.

Ennek érdekében a következő kísérleti feladatok megvalósítását tűztük ki célul:

- A már korábban leírt szabályozó elemek különböző kombinációival riporter konstrukciók létrehozása. A konstrukciók aktivitásának meghatározása transziens expressziós kísérletekben különböző sejt kultúrákban.
- Olyan konstrukciók kiválasztása, melyek hatással vannak a gén szövet- és fejlődési állapot-specifikus kifejeződésére.
- A szabályozásban részt vevő Sox faktorok kötődésének igazolása *in vitro* EMSA kísérletekben.
- A megfelelő DNS-elem kombinációkkal *LacZ* riporter konstrukciók készítése, melyekkel transzgenikus egereket hozunk létre, hogy hatásukat *in vivo* vizsgálhassuk.
- Az injektálásból származó alapító (F0), és a transzgenikus vonalából származó embriókban a transzgén expresszió térbeli és időbeli vizsgálata hisztológiai módszerekkel.
- A fenti kísérletek alapján a különböző transzgének expressziós mintázatának összehasonlító vizsgálata és a mintázat kialakításáért felelős DNS elemek behatárolása.
- DNS elemekben pontmutációt hordozó *LacZ* konstrukciók létrehozása és a mutációk *in vivo* hatásának vizsgálata transzgenikus egerekben.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Plazmid konstrukciók

1.1. Tranziens expressziós kísérletekhez használt plazmidok készítése

A rövid (-334/+67), illetve a teljes hosszúságú (-2011/+67) *matrilin-1* promoter által irányított luciferáz riporter gént tartalmazó konstrukciók (FO15Luc és AC8Luc) már rendelkezésünkre álltak [80].

A promoter rövidítési sorozathoz a *matrilin-1* PstI-SacI (-2011/-948), PstI-BglII(feltöltött) (-2011/-1134), PstI-EcoRI(feltöltött) (-2011/-1394), PstI-HindIII(feltöltött) (-2011/-1741) promoter szakaszokat az FO15Luc vektor PstI-SacI, illetve PstI-SacI(feltöltött) helyeire a szokásos gensebészeti módszerekkel építettük be.

A Pe1M1, Pe1M4, IneM1, IneM2, IneM3 mutációkat tartalmazó rövid promoter konstrukciók PCR-alapú mutagenézissel készültek (QuikChange, Stratagene), melynek templátja az FO15-Luc plazmid volt. A reakcióhoz a megfelelő pontmutációt hordozó oligonukleotidokat használtuk [80]. Az AC8Luc mutáns változatainak előállításához a megfelelő FO15-Luc konstrukciók rövid promoterét egészítettük ki a teljes hosszúságú promoterre [80].

A 8xE_{Col2a1}-FO15-Luc, 16xE_{Col2a1}-FO15-Luc és a Dpe1 és Dpe2 elemeket különböző kombinációkban tartalmazó klónokat Dr. Kénesi Erzsébet készítette.

A 8xE_{Col2a1}-8xE₁₀₂-FO15-Luc konstrukcióhoz a 8xE_{Col2a1}-FO15-Luc plazmid SpeI(feltöltött)-SacI helyeire klónoztuk a 8xE₁₀₂-NAD1 vektorból SalI(feltöltött)-SacI enzimekkel kivágott 8xE₁₀₂ fragmentumot.

A 8xE_{Col2a1}-8xE₁₀₂-PC-Luc előállításához az előző klónból a SacI(feltöltött)-NcoI fragmentumot klónoztuk át az ApaI(feltöltött)-NcoI enzimekkel emésztett PC-Luc plazmidba, melyet úgy állítottunk elő, hogy az FO15-Luc plazmid NcoI-ApaI helyeire építettük a *Col2a1* minimál promotert.

A 8xE_{Col2a1}-8xLIE KpnI-SmaI fragmentumot az ugyanígy emésztett FO15-be építve kaptuk meg a 8xE_{Col2a1}-8xLIE-FO15-Luc klónt.

A 8xE_{Col2a1}-8xLIE-PC-Luc-hoz az előző klón KpnI-SpeI fragmentumát klónoztuk az ugyanígy emésztett 8xE_{Col2a1}-FO15-be.

Minden konstrukciót restrikciós emésztéssel és szekvencia analízissel ellenőriztünk.

1.2. Transzgenikus egerek előállításához használt plazmidok készítése

A pozíciók a csirke *matrilin-1* TATA motívumának első T nukleotidjától számítottak.

A NAD1 konstrukció előállításához a *matrilin-1* gén -334/+67 rövid promoter szakaszát a pUC8CMP14nB/D szubklónból távolítottuk el KpnI(feltöltött)-NcoI emésztéssel, majd a pJB-AD vektor HindIII(feltöltött)-NcoI helyeire építettük. A pJB-AD vektort úgy készítettük, hogy a pJB-HRV vektor [107] NotI-NcoI helyeire ligáltuk a NotI, SalI, PstI, HindIII, BglII, NcoI polilinkert. A *LacZ* kazettát az SV40 nukleáris transzport szignál és az MP-1 poliadenilációs hely határolta.

A PS-NAD1 és PB-NAD1 vektorokat úgy készítettük, hogy a *matrilin-1* -2011/-948, illetve -2011/-1134 szakaszát a megfelelő luciferáz riporteres konstrukcióból SalI, illetve NotI-SalI emésztéssel klónoztuk át a megfelelően emésztett NAD1-be.

A 8xE_{Col2a1}-NAD1 és 16xE_{Col2a1}-NAD1 konstrukciókhoz a *Col2a1* enhancer megfelelő számú kópiáit egy szubklónból vágtuk ki NotI-SalI emésztéssel és az ugyanígy emésztett NAD1 vektorba ligáltuk.

A ΔPe1M4-TR70, ΔIneMI-TR70 és ΔIneM2-TR70 konstrukciókhoz a TR70 transzgén PstI-NcoI szakaszát cseréltük ki a megfelelő mutációt hordozó AC8-Luc konstrukciókból.

A 8xDpe1-NAD1 és a ΔDpe2-NAD1 transzgéneket úgy állítottuk elő, hogy a luciferáz riportert tartalmazó konstrukciókból (8xDpe1-FO15Luc, illetve ΔDpe2-FO15-Luc) KpnI(feltöltött)-PstI, illetve PstI-NcoI emésztéssel a megfelelő szakaszt kivágtuk és a NAD1 vektor SalI(feltöltött)-PstI, illetve PstI-NcoI helyeire építettük.

A PS-PC konstrukció előállításához a *Col2a1* gén promoterét egy szubklónból távolítottuk el ApaI(feltöltött)-SmaI emésztéssel, majd a PS-NAD1 plazmid feltöltött PstI-NcoI helyeire építettük.

A 8xLIE-NAD1 készítéséhez a LIE elem négy kópiáját egy szubklónból ClaI(feltöltött)-XbaI emésztéssel eltávolítottuk és a SmaI-XbaI enzimekkel felnyitott 4xLIE-NAD1 vektorba klónoztuk.

A 4xE₁₀₂-NAD1-hez az enhancer elem négy kópiáját az azokat tartalmazó szubklónból SalI-SmaI emésztéssel vágtuk ki és a NAD1 SalI-PstI(feltöltött) helyeire építettük.

Minden konstrukciót restrikciós emésztéssel és szekvencia analízissel ellenőriztünk.

2. Transzgenikus egerek előállítása

A *LacZ* riporter gént tartalmazó konstrukciókat NotI-KpnI emésztéssel hasítottuk, a szabályozó régiókat és a *LacZ* gént tartalmazó fragmentumot elválasztottuk a vektortól. A tisztított fragmentumokat éjszakán át dializáltuk, majd mikroinjektálással juttattuk az egerek megtermékenyített petesejtjeinek hím előmagjába. Ehhez donorként 4-6 hetes, szuperovuláltatott (C57BL/6XCBA) F1 hibrid, illetve FVB nőstényeket használtunk (Charles River Laboratories, Magyarország). A túlélő zigótákat 2 hónaposnál idősebb, vazektomizált Swiss hímmel párosztatott, álvemhes CD-1 recipiens nőstényekbe ültettük (Charles River Laboratories, Magyarország). A pronukleusz mikroinjektálást Dr. Sinkó Ildikó és Dr. Molnár Annamária végezték.

Az embrionális fejlődés 15,5. napján (E15,5) a nőstényeket cervikális diszlokációval áldoztuk fel, az embriókat császármetszéssel nyertük ki.

3. A transzgének jelenlétének igazolása

3.1. PCR

A *LacZ* riporter gént hordozó egereket a *LacZ* szekvenciára tervezett primer párral azonosítottuk.

LacZ-F 5'-CGCGTTTCATCTGTGGT-3'

LacZ-R 5'-CCGACATCGCAGGCTTC-3'

A reakcióhoz farokból, vagy méhlepényből izolált DNS-t használtunk, melyhez a szöveteket éjszakán át emésztettük 0,5 mg/ml proteináz-K oldatban 55 °C-on, majd a DNS-t fenol:kloroform:izo-amil-alkoholos kicsapással nyertük ki. Negatív kontrollként vad típusú egér DNS-ét használtuk.

3.2. Dot blot

20 µg farokból izolált DNS-t 10 perces forralással denaturáltunk, majd 20xSSPE-vel (3M NaCl, 200 mM NaH₂PO₄ pH7.4, 20 mM EDTA) összekeverve hidegen tartottuk. A Dot blot készülékre vízzel, majd 2xSSPE-vel megnedvesített Amersham nylon filtert és 20xSSPE-vel megnedvesített Watmann 3MM papírt helyeztünk. Minden mintából 2x120 µl-t tettünk a lyukakba, majd vízlégszívóval vákuumot létesítve átszűrtük azokat.

Ezután 3M NaCl és 500 mM NaOH denaturáló keverékkel, majd 3M NaCl és 500 mM Tris-HCl pH7.2 neutralizáló keverékkel itattuk át a filtert. Szárítás után UV fénnel keresztkötöttük. (2 perc, 700 kJ/cm²). A filtert két órán át, 65°C-on, 5xSSPE, 0,5xDenhards, 0,5% SDS keverékében előhibridizáltuk. Ezután 2000000 cpm jelölt próbát adtunk hozzá és egy éjszakán át folytattuk a hibridizálást. Másnap a filtert 65°C-on, 15 percig 1xSSC, 0,1% SDS keverékében mostuk, majd ugyanígy 0,1xSSC, 0,1% SDS keverékében.

A filtereket két napig exponáltuk, a radioaktív jeleket Typhoon 8600 (Molecular Dynamics) készülékkel jelenítettük meg. Kontrollként 2, 5, 10, 20 transzgén kópiának megfelelő plazmid DNS-t használtunk.

4. A β-galaktoszidáz aktivitás detektálása egész embrión és metszeten

Az **embriókat** koruktól függően 10-30 percig tartottuk fixáló oldatban (100 mM nátrium-foszfát puffer (pH 7,3), 0,2% glutáraldehid, 5 mM EGTA, 2 mM MgCl) szobahőmérsékleten, enyhén rázatva. Ezután a fixáló oldatot detergens oldatra cseréltük, majd 3x10-30 perc ráztatás után 1mg/ml X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indol-β-D-galaktopiranozid), 5 mM kálium-ferricianid, 5mM kálium-ferrocianid, 20 mM TRIS-HCl (pH 7,3), 2 mM MgCl, 0,01% nátrium-deoxikolát, 0,02% NP-40 oldatban festettük éjszakán át, 37 °C-on, sötétben. A festés utáni fixálást az előzőhöz hasonló, EGTA nélküli fixáló oldatban végeztük egy éjszakán át 4 °C-on. Másnap az embriókat PBS-ben mostuk. A felvételeket DC300F kamerával felszerelt Leica MZFLIII sztereomikroszkóppal készítettük.

A **metszeten történő festéshez** az embriókat az előzőekben leírtak szerint fixáltuk. Ezután a fixáló oldatot 20% szacharózt tartalmazó 100 mM Na-foszfát pufferre (pH 7,3) cseréltük, és addig tartottuk benne az embriókat 4°C-on, amíg azok lesüllyedtek az edény

aljára. Ezt követően eltávolítottuk róluk a felesleges folyadékot és OCT Tissue Techbe ágyasztuk, szárazjégen lefagyasztottuk és metszésig $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk őket. A blokkokból kriosztáttal $10\text{ }\mu\text{m}$ -es metszeteket készítettünk, melyeket 2 percig acetonban fixáltunk.

Detergens oldattal történő mosás után a metszetekre a fent leírt X-gal festéket tettünk és egy éjszakán át szobahőmérsékleten, sötétben, kevertetve festettük.

A metszeteket másnap detergenses mosóoldattal öblítettük le, majd $100\text{ }\mu\text{l}$, $0,5\text{ }\%$ -os, vízben oldott eozint cseppentettünk rájuk, 1 perc után vízzel lemostuk. Száradás után a metszeteket glicerín-zselatinnal lefedtük. A metszeteket Nikon Eclipse E600 mikroszkópra szerelt Spot RT Slider kamerával fotóztuk. Az ábrák elkészítéséhez Adobe Photoshop 8.0 és CorelDraw X4 programokat használtunk.

5. Alkalmazott sejtkultúrák készítése

Csirke embrió fibroblaszt (CEF)

Csirke primer fibroblaszt kultúrát 8-10 napos embriókból készítettünk [105]. Tripszines kezelés után a fibroblasztokat összegyűjtöttük és 10% szérummal kiegészített DMEM tápoldatban tartottuk. A másnap ismételt tripszinezés után 7×10^5 sejtet 24 lyukú lemezre tettünk ki.

Csirke embrió porcsejt (CEC)

A csirke primer chondrocyta kultúrához $14,5$ napos csirke embriók porcos sternumát eltávolítottuk, majd $0,1\text{ }\%$ -os kollagenázzal emésztettük [105]. A sejteket 10% szérummal kiegészített DMEM tápoldatban tartottuk. 7×10^5 sejtet 24 lyukú lemezre tettünk ki. Ez a kultúra főként késői proliferatív (I.b) stádiumú porcsejtekből áll.

Nagy sejtsűrűségű mesenchyma (HDM)

$4,5$ napos csirke embriók végtag kezdeményeiből tripszines emésztéssel chondroprogenitor sejteket preparáltunk, melyek nagy sűrűségben tenyésztve porccá, míg kis sűrűségben csonttá és kötőszövetté differenciálódnak. A chondrogenesis korai stádiumát képviselő HDM kultúrát úgy készítettük, hogy 5×10^6 sejtet lemeztünk ki 35 mm átmérőjű petri csészére, a sejteket 10% szérummal kiegészített HAM (F-12):DMEM tápoldatok $6:4$ arányú keverékében tenyésztettük.

6. Transziens expresszió

A CEC, CEF és HDM sejt kultúrákat transzfekció előtt 24 órával tripszineztek, majd 7×10^5 , illetve 5×10^6 sejtsűrűségben lemezték ki. A transzfekció a Ca-foszfát koprecipitációs módszerrel történt [105], melyhez a luciferáz riporter konstrukciókból 2, illetve 5 μg -ot használtak. A transzfekció hatékonyságának ellenőrzésére pGL3 kontrol vektort (Promega) használtak. A sejteket 48 (CEC, CEF), illetve 36 (HDM) órával a transzfekció után lecentrifugálták, 200 μl lízis pufferben (50 mM Tris-HCl, 2 mM DTT, 0,5 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 1% NP-40) feltárták. A luciferáz aktivitást a felülúszóból mérték luciferin szubsztrát (Promega) hozzáadásával Luminoscan Ascent (ThermoLabsystem 2.6) luminométeren.

Az eredmények 4-10 független mérés átlagai.

7. Fehérje expresszió és tisztítás

Az EMSA-hoz használt fehérjéket (GST-L-Sox5, GST-Ssox6, GST-SOX9) BL21 codon+RIL E. coli sejtekben termeltették, amelyeket ampicillinnel kiegészített 2YT tápoldatban növesztették. A termelést $\text{OD}_{600}=0,6$ értéknél 0,3 mM IPTG-vel indukálták, a sejteket 4 h múlva lecentrifugálták és lefagyasztották, majd 3 ml lízis pufferben (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 mM EDTA, 25 % szukróz) szonikálással tárták fel. Centrifugálás után a felülúszót glutation-szefaróz 4B oszlopon 4 °C-on 2 órán át forgatták. Háromszor mostuk mosó I. (250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 7,5), majd mosó II. (120 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 7,6) oldattal. Az oszlopról 10mM GSH hozzáadásával eluáltuk, protein tároló pufferrel (20 mM Tris-HCl pH7,9, 50 mM KCl, 4 mM MgCl_2 , 3 mM DTT, 0,5 mM EDTA, 20% glicerín) szemben 4 °C-on éjszakán át dializáltuk. Az aliquotokat felhasználásig folyékony nitrogénben tároltuk.

8. Sejtmagi kivonatok készítése EMSA és pull down kísérletekhez

10^7 CEC, illetve CEF sejtet PBS-sel kétszer mostunk, majd 500 μl A pufferben (10 HEPES pH7,9, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA) 10 percig szobahőn tartottuk. Centrifugálás után a csapadékot 1 ml B pufferben (20 mM HEPES pH 7,9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glicerín) két órán át 4 °C-on erősen ráztuk. Centrifugálás után a felülúszót kis

menyiségekre szétosztva folyékony nitrogénben tároltuk. Mindkét puffert a következő proteáz gátlókkal egészítettük ki: 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 0,001 µg/ µl aprotinin, leupeptin, pepstatin A.

9. EMSA

30 fmol [γ -³²P] ATP végjelölt DNS próbát inkubáltunk 30°C-on 30 percig tisztított, GST-fúziós SOX9, L-Sox5, Sox6 fehérjékkel 500 ng nem specifikus kompetitor [p(dGdC)] jelenlétében a következő pufferben: 100mM TrisHCl (pH7,9), 20 mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA, 11 mM DTT, 0,25% NP40, 8% ficoll, 250 mg/ml BSA. Az elektroforézist előfuttatott (2h, 200V), 5 %-os poliakrilamid gélen 4 °C-on 160 V-tal végeztük 0,25% TBE pufferben. A gélt szárítás után két napig exponáltuk, a radioaktív jeleket Typhoon 8600 (Molecular Dynamics) készülékkel jelenítettük meg.

10. Pull down

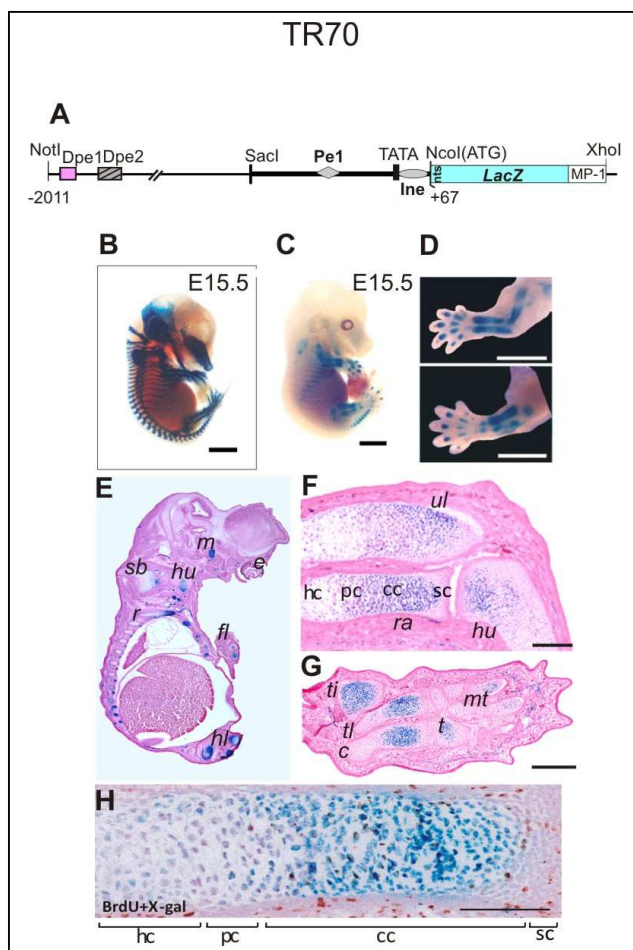
A biotinilált oligonukleotidot (Pe1) a gyártó (Dyna magnetic beads, Invitrogen) utasítása szerint rögzítettük a mágneses gyöngyökhöz. A nem specifikus kötések kivédésére a sejtmagi kivonatokat üres gyöngyökkel inkubáltuk 20 percig szobahőn a következő pufferben: 20 mM Tris pH7,4, 50 mM KCl, 3,5 mM DTT, 0,2 mM EDTA, 4 mM MgCl₂. Ezután a kivonatot 100 µl gyöngyökhöz rögzített oligonukleotidhoz adtuk, ugyanebben a pufferben 40 percig, szobahőn, lassan mozgattuk. Elúciókor a gyöngyökhöz 2xLaemmli mintapuffert adtunk, 5 perc forralás után 10%-os poliakrilamid gélen futtattuk. A gélből Coomassie G250 festés után kivágtuk a specifikus csíkokat, melyeket az SZBK Proteomikai laboratóriumában azonosítottak. Ehhez a diszulfid hidak DTT-vel való redukálása után tripszines emésztést alkalmaztak. A mintákat LC/MSMS készülékkel (Agilent) analizálták, a peptideket a MASCOT, illetve ProteinProspector adatbázisok segítségével azonosították.

ELŐZETES EREDMÉNYEK

A matrilin-1 gén szabályozásáról a csoportban korábban született eredmények

Csoportunk tagjai korábban elsőként klónozták a csirke matrilin-1 gént [103], illetve térképezték annak fő szabályozó régióit [104,105]. Tranziens expressziós kísérletekből kiderült, hogy a -1137/+64 bp promoter fragment képes a szövet-és fejlődési állapotspecifikus kifejeződést irányítani két pozitív (PRI, PRII) és két negatív (SI, SII) szabályozó elem együttműködése eredményeképpen. Az SI elemen Nfi kötőhelyeket azonosítottak [105].

Később transzgenikus egér kísérletekben is bebizonyosodott, hogy a TR70 transzgén, melyet a hosszú promoter (-2011/+67) önmagában irányít, elegendő információt hordoz ahhoz, hogy a transzgén expressziót a fejlődő végtag elemekbe, tengelyvázba és a chondrocraniumba irányítsa (5. ábra). A *LacZ* expresszió megfigyelhető volt még a csigolyatestekben, a notochordban és a szemben is [107].



5. ábra A TR70 transzgén elegendő információt tartalmaz ahhoz, hogy magas szintű expressziót irányítson az összes fejlődő vázelembe. A transzgén (A) kifejeződési mintázata az alapító embrió tengely-és végtagvázában proximo-disztális irányítottságot mutat (C,D), összehasonlítva a minden porcós vázelemet megjelenítő alcian kék festéssel (B). Az expresszió a növekedési korong oszteoproliferatív (cc) és prehipertrof (pc) zónáira korlátozódik (F,H) [107]. A BrdU festés a proliferatív sejteket jelöli. C, calcaneus; cc, oszteoproliferatív porcsejtek; e, szem; fl, mellső végtag; hc, hipertrof porcsejtek; hl, hátsó végtag; hu, humerus; m, Meckel-féle porc; mt, lábközepcsont; pc, prehipertrof porcsejtek; r, borda; sb, lapocka; sc, forrás porcsejtek; ti, tibia; tl, talus. Méretvonal 2mm (B-D); 200 µm (F,G); 100 µm (H).

A VAM2 transzgén, ami a rövid promotert és az introni szabályozó régiót tartalmazta (-338/+1819) szintén képes volt a transzgén kifejeződését a végtagváz, a tengelyváz és a chondrocranium porcos elemeibe irányítani, de a *LacZ* expresszió alacsonyabb szintű volt és a vizsgált embriókban különböző mintázatú ektopikus expresszióval társult más szövetekben is, például középagy, trigeminális ideg, szaglóhám, bőr, tüdő. Mivel ez a mintázat nem egyezett meg az összes vizsgált alapító embrióban és a homozigóta vonalból származó egyedekben, valószínű, hogy a transzgénben jelenlévő porcspecifikus szabályozó elemek az integrálódási hely közelében lévő szabályozó elemekkel kölcsönhatva irányították az expressziót a porcszöveten kívül más struktúrákba is. Ezt támasztja alá az is, hogy a VAM1 transzgén esetében, mely a hosszú promotert és az introni szabályozó régiót tartalmazza (-2011/+1819), ez az ektopikus kifejeződés nem volt megfigyelhető. Ez arra utal, hogy az ektopikus kifejeződést irányító elemek valószínűleg a -2011/-338 régióban találhatók. Mindhárom transzgén kifejeződésére jellemző volt, hogy a növekedési korongok proliferatív és prehipertróf zónáira korlátozódott (5. ábra), illetve, hogy a disztális struktúrákban a kifejeződés mértéke magasabb volt, mint a proximális elemekben. E transzgenikus egér adatok arra utaltak, hogy a matrilin-1 gén porcspecifikus szabályozó elemei elszórtan helyezkednek el a szabályozó régióban, illetve, hogy a génműködést a távoli promoteren és az introni régióban modulárisan elhelyezkedő enhancer és silencer elemek együttműködve irányítják [107]. Mivel a magas aktivitású konstrukciók mindegyike tartalmazta a rövid promotert (-334/+67), valószínűnek látszott, hogy ez a szakasz tartalmazza azokat a fő szabályozó elemeket, melyek a gén szövet- és fejlődési állapot-specifikus expresszióját irányítják, illetve a távoli elemek hatását közvetítik. Ezek azonosítására munkatársaim *in silico* analízist végeztek, melynek során a rövid promoteren belül több, amniotákban különböző mértékben konzervált szekvenciát találtak [80]. Ezek közül a legnagyobb mértékű konzerváltságot egy proximális promoter elem (Pe1) mutatta, amely egy pár, egymással ellentétes irányban elhelyezkedő motívumot tartalmaz, mely jelentős mértékű homológiát mutat a Sox9 transzkripció faktor preferált kötőhelyével. A Pe1 elemről *in vitro* DNS-fehérje kötési kísérletekben kiderült, hogy képes SOX9, L-Sox5 és Sox6 transzkripció faktorokkal, illetve egy eddig azonosítatlan faktorról is komplexet képezni. A Sox motívumok pontmutációi gátolták az elemet a komplexképződést, illetve jelentős mértékben csökkentették a matrilin-1 gén szövetspecifikus működését tranziens expressziós kísérletekben. További *in vivo* footprint adatok megerősítették, hogy a Pe1 elem Sox motívumaihoz porcspecifikus transzkripció faktorok kötődnek [80].

A rövid promoter iniciációs eleme (Ine) emlősökben szintén konzervált, de amniotákban már kevésbé. Ezen az elemen két pár invertált Sox motívum található, melyek *in vitro* kísérletekben szintén komplexet képeztek tisztított Sox9 fehérjével. Csirke chondrocyta sejtmagi kivonattal inkubálva ezen az elemen három nukleoprotein komplex alakult ki, melyek közül kettőt Sox9, L-Sox5 és Sox6 ellenanyagok felismertek, jelezve azt, hogy az Ine elemnek is meghatározó szerepe van a matrilin-1 gén szövetspecifikus szabályozásában.

A csirke matrilin-1 gén rövid promoterében a TATA boxtól 5' irányban egy Nfi kötőhelyet is azonosítottak, melynek szintén lehet szerepe a génexpresszió szabályozásában.

A rövid promoter konzervált elemein kívül két távoli promoter elem (Dpe1 és Dpe2) mutatott kisebb fokú szekvencia homológiát a csirke és emlős gének között. A Dpe1 elemen az L-Sox5/Sox6 transzkripció faktorok preferált kötőhelyével közel azonos szekvencia található [80].

A matrilin-1 gén első intronjában korábban azonosított 102 bp-os enhancer elem (E₁₀₂), és az azon belül található LIE elem [104] valószínűleg szintén szerepet játszanak a gén kifejeződésének szabályozásában. *In vitro* kísérletekben kiderült, hogy ezekhez az elemekhez Sox9 és Nfi faktorok kötődnek [108].

EREDMÉNYEK

1. A rövid promoter szerepe a *matrilin-1* gén expressziójának szabályozásában

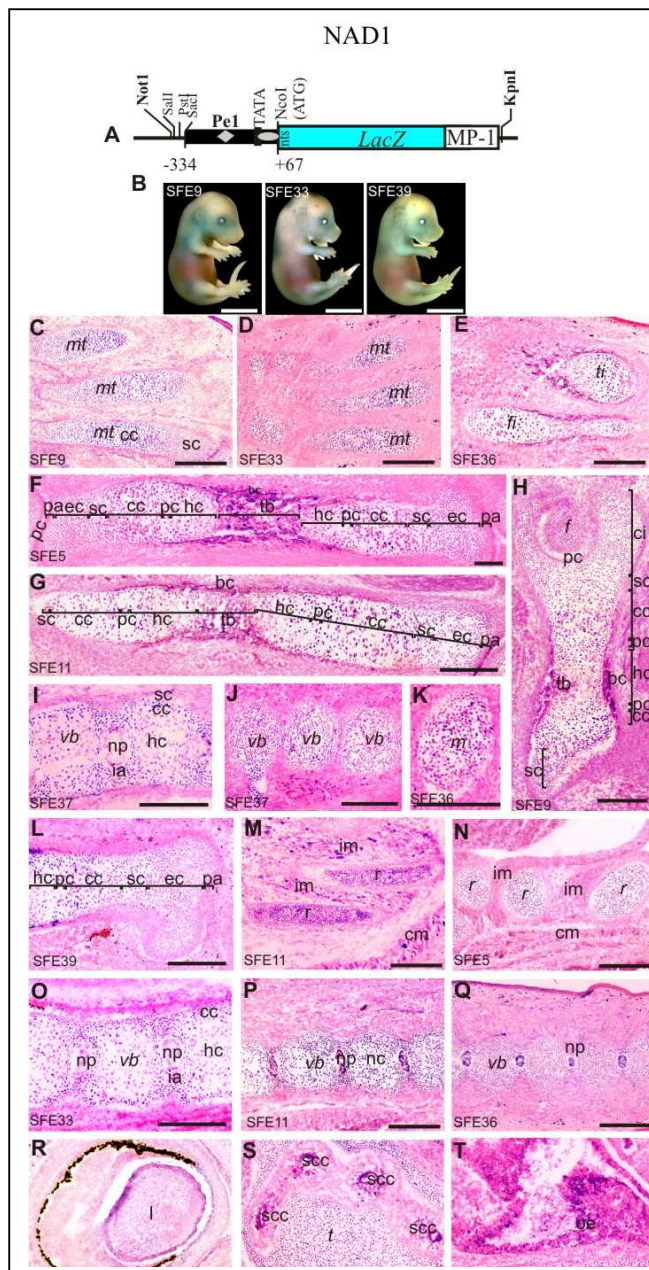
1.1. A rövid promoter aktivitása alacsony transzgenikus egerekben

Az előbbieken említett TR70, VAM1 és VAM2 transzgének szövetspecifikus expressziót mutattak, amely a növekedési korong meghatározott zónáira korlátozódott. Mindhárom konstrukció közös eleme a rövid promoter volt, ezért először ennek szerepét kívántuk tisztázni a gén térbeli és időbeli kifejeződésének szabályozásában *in vivo*. Ebből a célból olyan plazmidot hoztunk létre, ami a *LacZ* riporter gént a *matrilin-1* rövid promoter (-334/+67) irányítása alatt tartalmazta (NAD1) (6. ábra A). A konstrukcióval pronucleus mikroinjektálással hoztunk létre transzgenikus egereket. Összesen 12 alapító embriót izoláltunk, melyek a NAD1 transzgént detektálható mértékben expresszálták (6. ábra B).

A 15,5 napos embriókon végzett hisztológiai vizsgálat arra utalt, hogy a transzgén minden fejlődő vázelemben kifejeződik (6. ábra C-T). Az expresszió mértéke sokkal alacsonyabb volt, mint a VAM2 transzgén esetében, amely a rövid promoter mellett introni elemet is tartalmazott. Az alig detektálható *LacZ* expresszióban bizonyos mértékű zonális különbségek voltak megfigyelhetők, így például a fejlődő hosszú csontokban (pl. femur, humerus) (6. ábra E,F,G,L), a csigolyatestekben (6. ábra I,J,O-Q) a transzgén aktivitása legnagyobb volt a növekedési korong proliferatív és prehipertróf zónáiban, míg az epifízeális, a forrás és a hipertróf porcsejtek zónáiban nem detektáltunk expressziót. További eltérés a már említett transzgénekhez képest, hogy a NAD1 transzgén esetében a kifejeződés mértéke nem tért el a proximális és disztális vázelemekben (pl. nyaki és farki csigolyák) (6. ábra I,J,O-Q). Néhány vizsgált embrió esetében tapasztaltunk különböző mértékű ektopikus kifejeződést például a szaglóhámiban (6. ábra T), a belső fül félkörös ívjárataiban (6. ábra S), a vázizmokban (6. ábra M,N), vagy a tüdőben. Mivel ezek mintázata nem minden embrió esetében egyezett meg, valószínű, hogy az ektopikus kifejeződést a transzgén integrációs helye befolyásolta.

Ezekből az adatokból arra következtettünk, hogy a rövid promoter képes ugyan bizonyos szintű szövet- és fejlődési állapotspecifikus génkifejeződést irányítani, de az aktivitása önmagában alig detektálható, és nem mutat proximo-disztális különbségeket

sem. Tehát a rövid promoter önmagában nem felelős a gén szűkített, porcspecifikus kifejeződését irányítani, ehhez a távoli DNS elemek szükségesek.



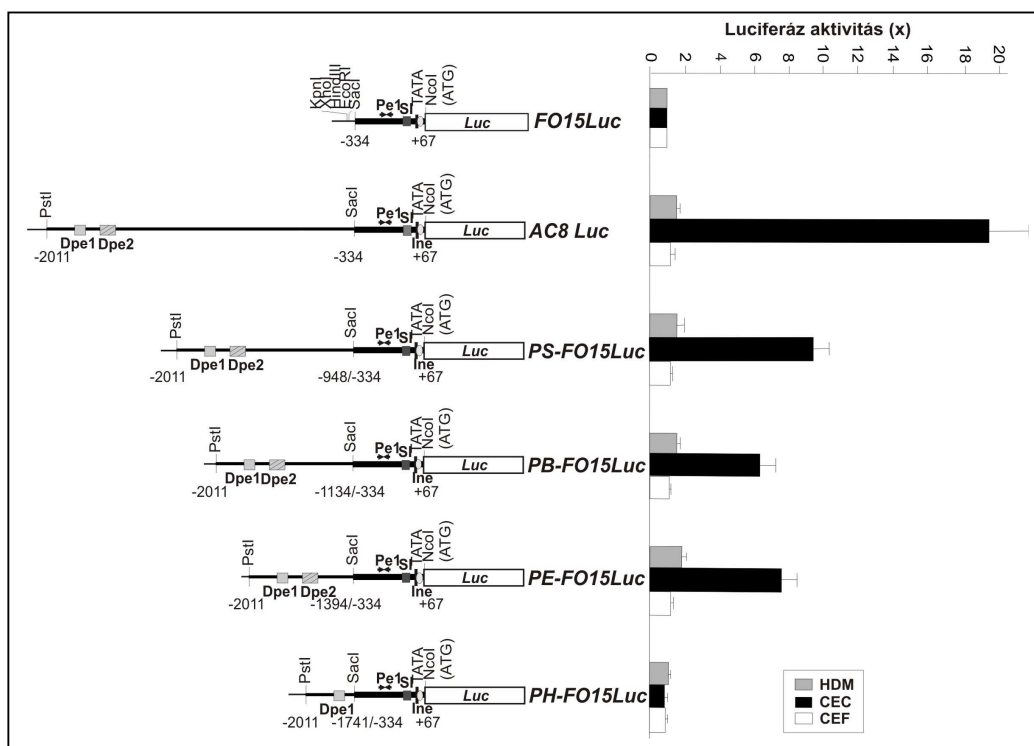
6. ábra A rövid promoter önmagában alacsony expressziós szintet biztosít. A NAD1 transzgén térképe (A) és a 15,5 napos (E15,5) embriók vázelemeiben detektálható kismértékű *LacZ* expresszió (B). A transzgén minden porcos vázelemben alacsony szinten fejeződik ki (C-T). Az expresszió a fejlődő hosszú csontok növekedési korongjának proliferatív és prehipertrof zónáira korlátozódik, míg az epifizeális (epi) és forrás chondroblastokban, valamint a hipertrof zónában nem megfigyelhető (F,G,H,L). Az expresszió mértéke összehasonlítható a craniális (cran) (I), lumbális (lumb) (O) és caudális (caud) (J,P,Q) csigolyatestekben (vb). Gyenge festődés figyelhető meg a Meckel porcban (m) (K), a falcsont kezdeményében (t) (S) és az orrporcban (nb) (T), valamint a bordákban (M,N) és a szemben (R). Ektopikus expresszió detektálható nem porcos szövetekben is: a szaglóhámában (oe) (T), a belső fül félkörös ívjáratának epitheliális sejtjeiben (scc) (S), a bordaközi (im) és bőr alatti izmokban (cm) (M,N). További rövidítések: ib, medencecsont; mc, kézközépcsont; f, femur; l, szemlencse; np, nucleus pulposus; pa, periartikuláris porcsejtek; pl, retina pigment rétege. Egyéb rövidítések: ld. 5. ábra. Méretvonal 2 mm (B) 200 μ m (A-J, H-T), 100 μ m (K).

1.2. Távoli homológ promoter régiók növelik a rövid promoter aktivitását

Mivel a rövid promoter önmagában alacsony aktivitást mutatott, feltételeztük, hogy távolabbi elemek működésére is szükség van a megfelelő mértékű expresszióhoz.

A továbbiakban arra kerestünk választ, hogy a disztális promoter régiók, melyek több, különböző mértékben konzervált szabályozó elemet, illetve transzkripciós faktor kötőhelyet tartalmaznak, milyen módon járulnak hozzá az endogén génre jellemző kifejeződési mintázathoz. Ehhez először **tranzien expressziós** kísérletekben vizsgáltunk meg olyan konstrukciókat, melyek a matrilin-1 gén promoterének különböző hosszúságú szakaszait tartalmazzák (7. ábra).

A konstrukciók aktivitását három különböző sejt kultúrán vizsgáltuk. A nagy sűrűségű mesenchyma (HDM) kultúra a porcfejlődés korai stádiumát reprezentálja, kizárólag korai proliferatív (Ia. stádiumú) porcsejtekből áll [13,14]. Ezzel szemben a csirke chondrocyta (CEC) kultúra késői proliferatív (Ib. stádiumú) porcsejtekből gazdag. A csirke embrionális fibroblaszt (CEF) kultúra pedig a matrilin-1 gént nem expresszáló sejt típus.



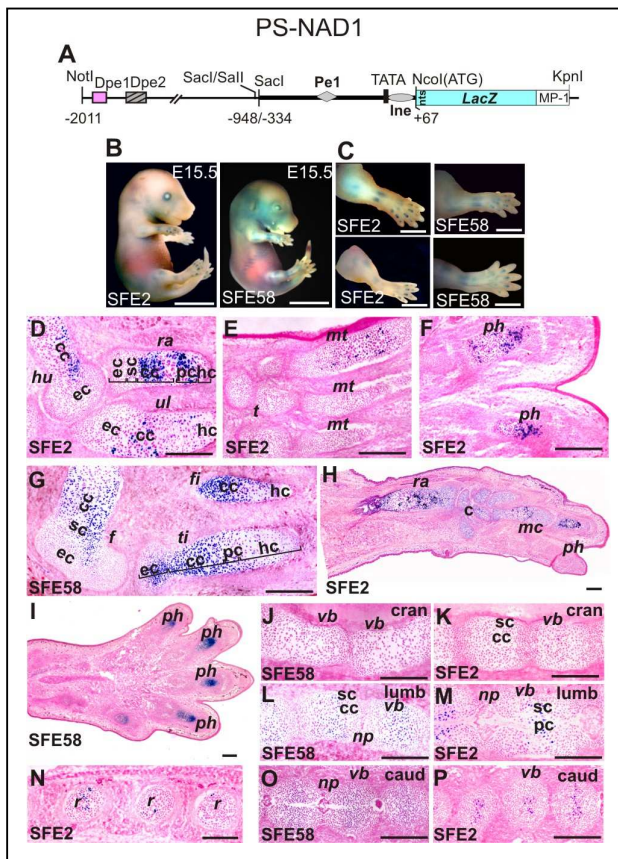
7. ábra A teljes hosszúságú és a rövidített távoli promoter régiók által meghajtott luciferáz riporter konstrukciók szerkezete és szövetspecifikus aktivitása tranzien expressziós kísérletben. A diagram az egyes konstrukciók FO15-Luc-hoz viszonyított relatív aktivitását mutatja nagy sűrűségű mesenchyma (HDM) kultúrában, mely a porcfejlődés korai stádiumát reprezentálja, a *matrilin-1*-et expresszáló csirke chondrocyta (CEC) és az azt nem expresszáló csirke fibroblaszt (CEF) sejt kultúrákban.

Azt tapasztaltuk, hogy a promoter hosszának növelésével a késői proliferatív porcsejtekben mért aktivitás is nő, míg a másik két sejttypusban az expresszió mértéke nem változott lényegesen (7. ábra). Tehát a szövet- és differenciálódási állapot specifikus, magas szintű génexpresszió irányításában valamely távoli promoter elem is szerepet játszik.

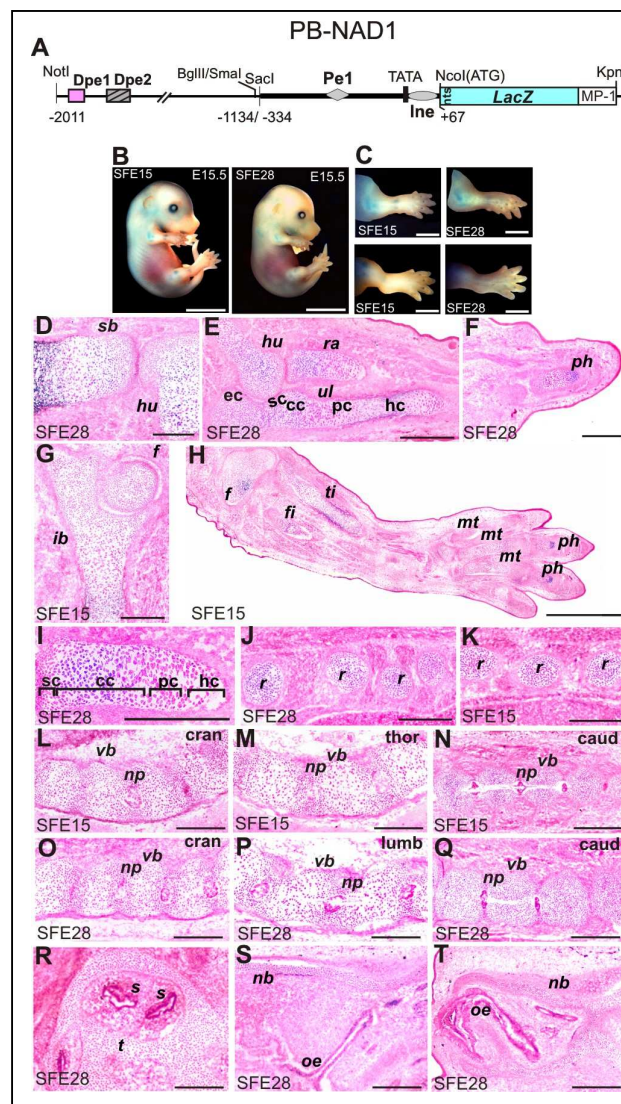
Hogy ezen elemek *in vivo* szerepére is fényt derítsünk, elkészítettük a szabályozó elemek *LacZ* riporter génnel fuzionált változatait, melyek közül azzal a kettővel hoztunk létre **transzgenikus egereket**, melyek a legmagasabb aktivitást mutatták a tranziens expressziós kísérletekben. A PS-NAD1 transzgén a *matrilin-1* promoter -2011/-948 bp szakaszát tartalmazta a rövid promoter elé építve (8. ábra A), míg a PB-NAD1 transzgén a -2011/-1134 bp szakaszt (9. ábra A).

A konstrukciókat expresszáló 15,5 napos embriók hisztológiai vizsgálata azt mutatta, hogy a -2011/-1134 régió kisebb mértékben növelte a rövid promoter aktivitását, mint a -2011/-948 régió, viszont az expresszió proximo-disztális irányú növekedése, illetve a zonális mintázat mindkét esetben megmaradt. A PS-NAD1 és PB-NAD1 transzgéneket hordozó egerek vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy a konstrukciók minden fejlődő vázelemben aktívak (8. ábra B,C, 9. ábra B,C). A *LacZ* expresszió mértéke mindkét esetben meghaladta ugyan a NAD1 transzgénét, viszont alacsonyabb volt, mint a TR70 esetében, mely a teljes hosszúságú promotert tartalmazza. Az expresszió a fejlődő hosszú csontok növekedési korongjának proliferatív és prehipertróf zónáira korlátozódott (8. ábra D,G,H,N, 9. ábra E,I), viszont a PS-NAD1 esetében érdekes módon az adott zónán belül nem minden sejt festődött azonos mértékben (8. ábra D,G,H,N).

Adataink megerősítették azt, hogy a magasabb szintű szövet- és fejlődési állapotspecifikus expresszióhoz szükség van a távoli promoter elemek jelenlétére. Ez alapján arra következtetünk, hogy a *matrilin-1* promoter -2011/-334 szakasza a gén aktivitását a DNS szakasz hosszával párhuzamosan növeli, de a térben és időben szűkített porcspecifitást nem befolyásolja.



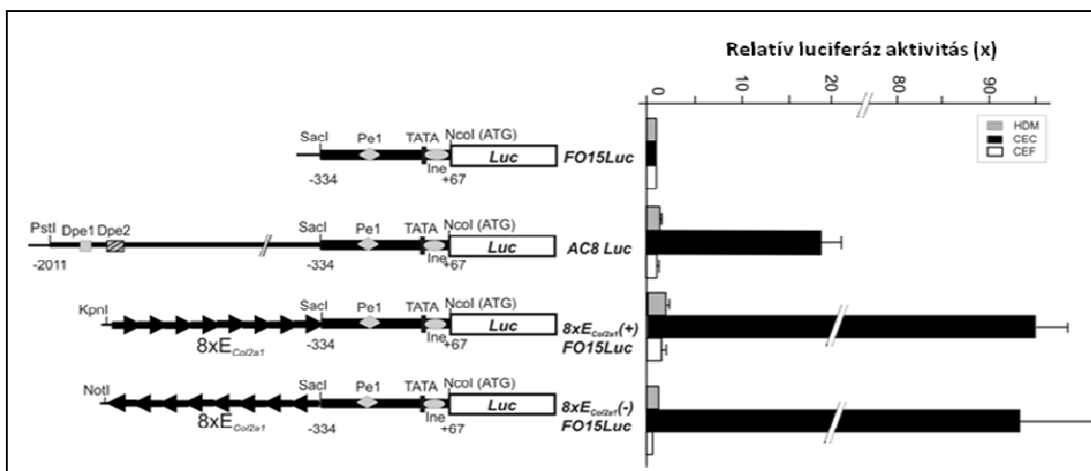
8. ábra A távoli promoter elemek növelik a *Matn-1* rövid promoter aktivitását *in vivo*. A PS-NAD1 transzgén térképe (A) és kifejeződési mintázata a transzgenikus embriókban (B) és azok fejlődő végtagvázában (C). Az eozinnal festett fagyasztott metszeteken látható, hogy a mellső (D,H,N) és hátsó végtag (G) fejlődő hosszú csontjaiban az expresszió az oszlopos proliferatív és prehipertróf porcsejtek zónáira korlátozódik (D,G,H,N). Az adott zónán belül a *LacZ* expresszió csak a sejtek bizonyos csoportjaiban magasabb. A festődés intenzitása nagyobb a caudális (O,P) és lumbális (L,M) csigolyákban, míg a craniális csigolyákban (J,K) nem detektálható. Méretvonal 2 mm (B,C), 200 μ m (D-P). Egyéb jelölések: ph, ujjak; további jelöléseket ld. 5. ábra.



9. ábra A PB-NAD1 transzgén expressziós mintázata. A transzgén térképe (A). Az X-gal festett alapító embriók tengely- (B) és végtagvázában (C) figyelhető meg a hosszabb távoli promoter szakaszt tartalmazó transzgénénél alacsonyabb szintű expresszió. A fagyasztott metszetek hisztológiai analíziséből (D-T) kiderül, hogy a transzgén kifejeződés erősebb a farki (N,Q), mint a nyaki (L,O) és ágyéki (M,P) csigolyákban. A *LacZ* expresszió a disztális struktúrák irányába erősödést mutat, így az ujjakban intenzívebb festődést tapasztalunk (F,H). A transzgén expresszió a fejlődő hosszú csontok növekedési korongjának oszlopok proliferatív és prehipertróf zónáira korlátozódik (E,H,I). Látható még festődés a bordákban (J,K), valamint a fejlődő chondrocranium elemeiben: a falcsonban (R) és az orrporcban (S,T). Méretvonal 2 mm (B,C), 200 μ m (D-T). További jelölések: sb, lapocka; ld. 5.7. ábrák.

1.3. A matrilin-1 rövid promoter felülírja az erős heterológ porcspecifikus enhancer elem hatását

Következő lépésként megvizsgáltuk, hogy a *Col2a1* génben korábban azonosított, 48 bp-os, porcspecifikus minimál enhancer elem [109] milyen hatással van a rövid promoter aktivitására. Irodalmi adatokból ismert, hogy ez az enhancer elem több kópiában, a teljes *Col2a1* enhancerhez hasonlóan, fejlődési állapottól függetlenül, minden porcsejtben magas aktivitással működik és heterológ promotert is hasonlóan aktivál. Először **transziens expressziós** kísérletekhez készítettünk olyan klónokat, melyekben a luciferáz riporter gént a *Matn1* rövid promoter együtt irányítja a *Col2a1* enhancer elem több kópiájával, különböző orientációkban (10. ábra).



10. ábra A *Col2a1* enhancer elem nyolc kópiája orientációtól függetlenül nagymértékben növeli a rövid promoter aktivitását transziens expressziós kísérletekben. A diagram az egyes konstrukciók FO15-Luc-hoz viszonyított relatív aktivitását mutatja HDM, CEC és CEF kultúrákban.

A transziens expressziós kísérletekben azt tapasztaltuk, hogy a *Col2a1* enhancer elem nyolc kópiája orientációtól függetlenül drámaian (>90x) növeli a rövid promoter aktivitását. Mivel ez a növekedés csak a késői proliferatív chondroblastokban gazdag CEC kultúrában volt megfigyelhető, elmondható, hogy az enhancer elem a várt magas aktivitással, de szövet- és fejlődési állapot specifikusan működik (10. ábra).

A *Col2a1* enhancer elemmel végzett **transzgenikus egér** kísérletekhez kontrollként a p3000i3020*Col2a1* transzgént használtuk, melyben a β -galaktozidáz-neomicyn fúziós fehérje (β -geo) expresszióját a *Col2a1* gén hosszú promotere és introni enhancere irányítja (11. ábra A). Ezt a plazmidot B. de Crombrughe bocsátotta rendelkezésünkre.

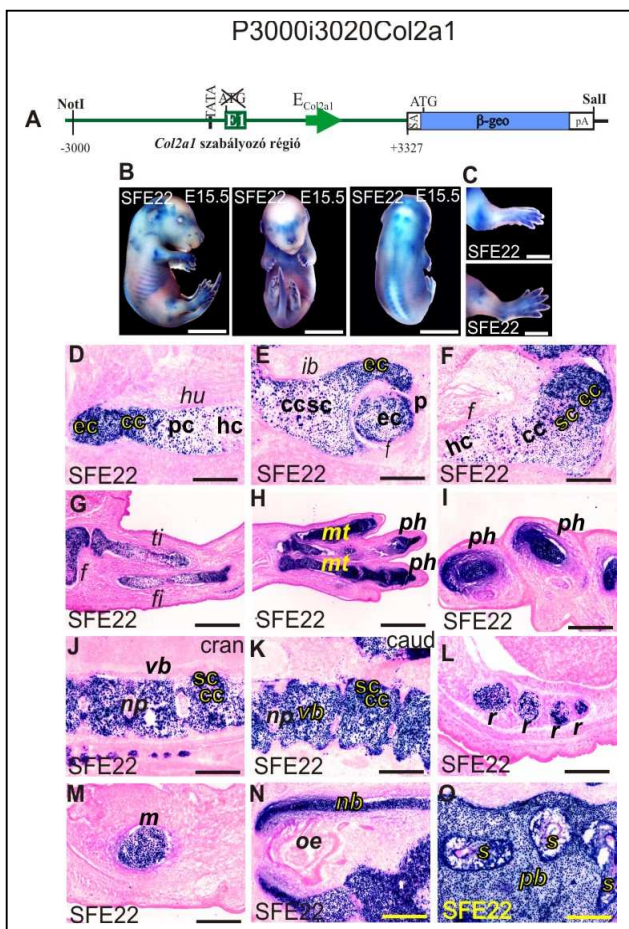
Az irodalmi adatok alapján a transzgéntől azt vártuk, hogy minden porcso elemben egyformán magas aktivitással fog kifejeződni, függetlenül azok fejlődési stádiumától. Ennek megfelelően a 15,5 napos F0 embriók X-gal festésekor nagyon erős és hasonló intenzitású expressziót figyeltünk meg a végtagváz, a tengelyváz és a koponya valamennyi fejlődő porcso vázelemében (11. ábra B,C). A fagyasztott metszetek hisztológiai vizsgálata igazolta a magas szintű *LacZ* expressziót minden fejlődő porcso vázelem valamennyi porcsejtjében (11. ábra C-O). A transzgén kifejeződött minden fejlődési stádiumú porcsejtben és a növekedési korongok minden zónájában, beleértve a perichondriumot, a prechondrocytákat, az ízületi és epifízis porcot, a forrás, proliferatív és prehipertróf zónát. Csak a hipertróf zóna sejtjeiben mutatta a várt, jelentős csökkenést (11. ábra D-G,J,K,N). Az ízületi porcban és más porcsejtben megfigyelt magas szintű génexpresszió alkalmassá teszi a p3000i3020Col2a1 plazmidot arra, hogy általános porcspecifikus vektorként használjuk.

Azt terveztük, hogy a *Col2a1* enhancert a *Matn1* rövid promoter elé építve magas riportergén expressziót érhetünk el **transzgenikus egerekben**, így azok alkalmazott kutatási feladatokra (gyógyszeresztelés) is felhasználhatók. Ezért a *Col2a1* enhancer elemet 4, 8 és 16 példányban beépítettük a NAD1 vektorba, így a *Matn1* rövid promoterrel együtt irányították a *LacZ* gén expresszióját.

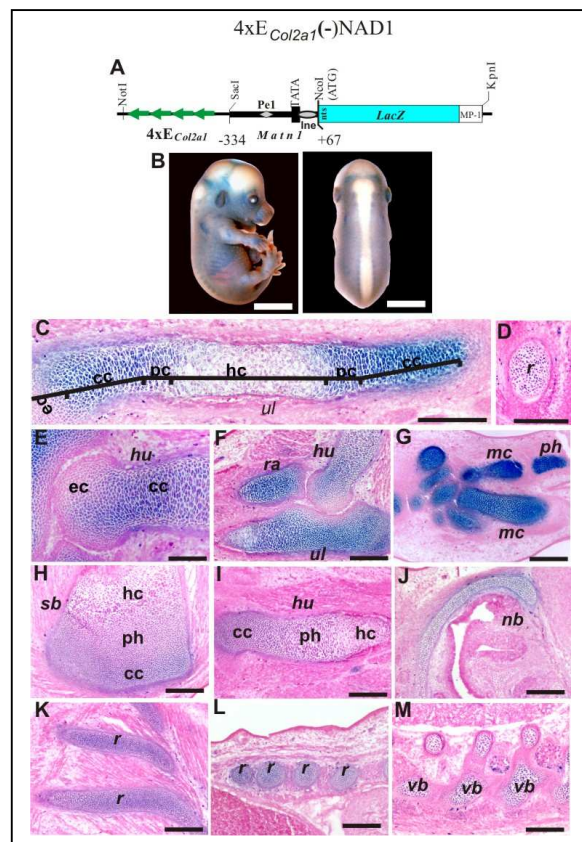
Az **E_{Col2a1} elemet négy példányban** a *LacZ* riportergén elé építve (12. ábra A) minden fejlődő vázelemben jelentős mértékben megnövelte a transzgén expressziót (12. ábra B), de érdekes módon kifejeződési mintázata jobban hasonlított a TR70, mint a p3000i3020Col2a1 transzgénére (11. ábra). Bizonyos mértékű proximo-disztális és zonális különbségeket is mutatott (12. ábra C-J).

Hogy az enhancernek a rövid promoter működésére gyakorolt hatását tovább vizsgáljuk, transzgenikus egerek előállításához olyan konstrukciót hoztunk létre, melyben a *LacZ* riporter gén kifejeződését a ***Col2a1* enhancer nyolc kópiája** és a *matrilin-1* rövid promoter irányítja egymással megegyező orientációban (13. ábra A). Az injektlás után két olyan alapító embrió izoláltunk, melyek minden fejlődő porcso vázelemben magas szinten expresszálták a transzgént (13. ábra B). Részletes hisztokémiai vizsgálat alapján kiderítettük, hogy meglepő módon az expresszió egyáltalán nem a *Col2a1* génre jellemző, általános porcspecifitást mutatja, hanem a matrilin-1 génre jellemző, de még annál is kifejezettebb proximo-disztális irányítotttságot. Ez jól megfigyelhető, ha összehasonlítjuk a festődés intenzitását a craniális, lumbális és caudális csigolyatestekben (13. ábra M-R).

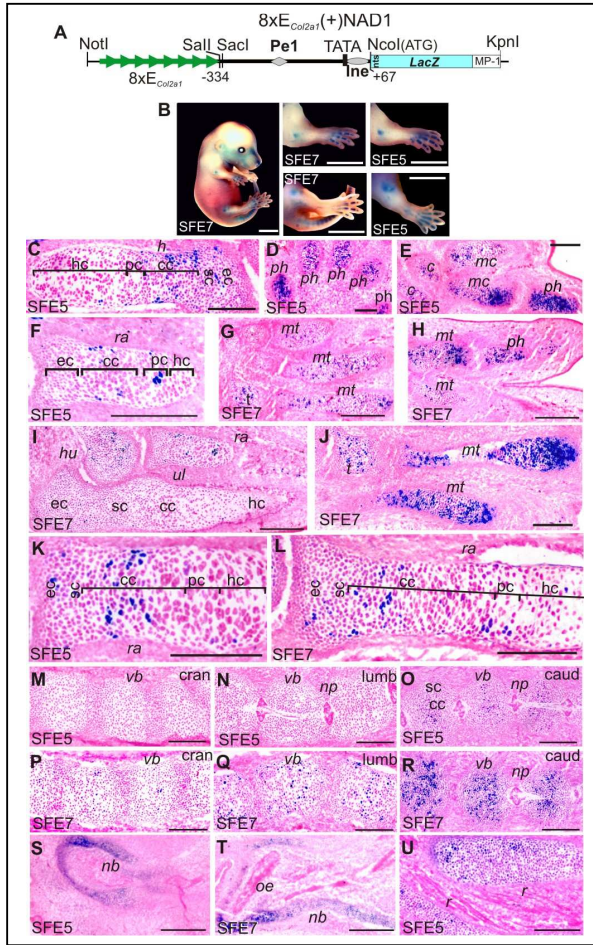
Ugyanez a tendencia látható, ha a végtagok hosszú csontjaiban és az ujjakban vetjük össze a festődés mértékét (13. ábra C-J).



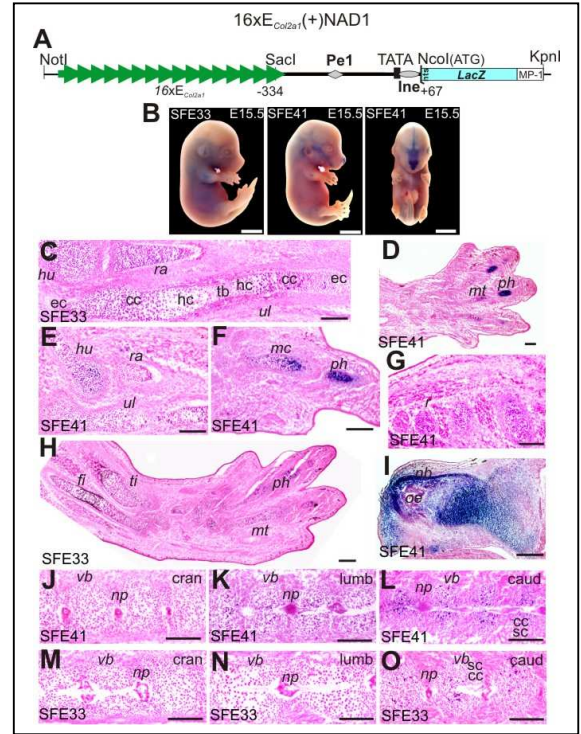
11. ábra A p3000i3020Col2a1 általános porcspecifkus vektor. A vektor térképe (A). Az alapító embriók chondrocraniumában és összes fejlődő vázelemében nagy intenzitású festődés figyelhető meg (B,C). A fagyasztott metszetek hisztológiai vizsgálatából is kiderül, hogy a végtagok fejlődő hosszú csontjainak minden porcsejtje festődik (D-G), hasonlóan a végtagok függesztő öveinek elemeihez (E,F) és az ujjakhoz (H,I). A gerinc nyaki (J) és farki (K) régiójában és a bordákban (L) is egyforma intenzitású a festődés. Ez látható még a Meckel-féle porcban (M), az orrporcban (N) és a falcsonban (O) is. Az expresszió szintje minden porcsejtben magas, függetlenül azok fejlődési stádiumától (D-F, J,K), sőt a perichondrium és a kondenzálódó mesenchyma sejtek is festődnek (D-F,J,K). Méretvonal 2 mm (B,C), 200 μ m (D-O). További jelölések: ld. 5,7. ábrák.



12. ábra Az E_{Col2a1} elem négy példánya jelentősen megnöveli a rövid promotor aktivitását. A transzgén térképe (A) és expressziós mintázata az alapító embrió vázelemeiben (B). Az X-gal festődés intenzitása proximo-disztális irányban nő a lapockától (H) és humerustól (E,F) a radius és ulna felé (C,F,I). A legmagasabb szintű expresszió a kézközépcsontokban és az ujjakban figyelhető meg (G). A legintenzívebb festődés a hosszú csontok növekedési korongjának oszlopos proliferatív és prehipertróf zónáiban figyelhető meg (C,H,I). Gyengébb expresszió figyelhető meg a bordákban (D,K,L), az orrporcban (J) és a csigolyatestekben (M). Méretvonal 2 mm (B), 200 μ m C-M). További jelölések: ld. 5,7. ábrák.



13. ábra Az E_{Col2a1} elem nyolc kópiája nagymértékben növeli a rövid promotor aktivitását. A transzgén térképe (A) és intenzív X-gal festődés a tengelyváz és végtagváz struktúráiban (B). A metszetek hisztológiai vizsgálata (C-U) alátámasztja, hogy a transzgén expresszió a fejlődő hosszú csontok növekedési korongjában az oszlopos proliferatív és prehipertróf zónákban a legmagasabb szintű (C,F,I,K,L). Festődés nem, vagy csak alacsony szinten figyelhető meg a forrás porcsejtek zónájában, illetve az epifízeális porcban (C,F,I,K,L). Magasabb szintű expresszió detektálható az ujjakban (D,E,H,J), mint a kar fejlődő hosszú csontjaiban (C,F,I,K,L). A gerinc farki régiójában (O,R) intenzívebb festődést tapasztalunk, mint a deréktáji (N,Q) és nyaki (M,P) csigolyákban. Látható még transzgén kifejeződés a fejlődő bordákban (U), az orrporcban (S,T). Méretvonal 2 mm (B), 200 μ m (C-U). További jelölések: ld. 5,7. ábrák.



14. ábra A $Col2a1$ enhancer 16 kópiája és a matrilin-1 rövid promotor által irányított transzgénre is a matrilin-1 kifejeződési mintázata jellemző. A $16x E_{Col2a1}$ -NAD1 transzgén térképe (A) és expressziós mintázata (B). A hisztológiai vizsgálat során kiderült, hogy a transzgén aktivitás az ujjakban a legerősebb (D,F), és gyengébb a humerusban, radiusban, ulnában (C,E), illetve tibiában és fibulában (H). Nem detektálható expresszió a nyaki csigolyatestekben (J,M), míg a deréktáji csigolyák tartalmaznak néhány festődő sejtet (K,N). A legerősebb festődés a farki csigolyákban észlelhető (L,O). Nagyon intenzív expresszió figyelhető meg az orrporcban és a környező szövetekben (I), illetve gyengébb festődés látható még a bordákban (G). Méretvonal 2 mm (B), 200 μ m (C-O). További jelölések: ld. 5,7. ábrák.

A növekedési korongon belül szintén a matrilin-1 génre jellemző zonális expressziós mintázat figyelhető meg, tehát a festődő sejtek a fejlődő hosszú csontok proliferatív és prehipertróf zónáiban vannak, míg a kondenzálódott mesenchyma, a forrás, a hipertróf, az epifízis porcsejtek, valamint a perichondrium sejtjei egyáltalán nem festődnek (13. ábra C,F,I,K,L,O,R).

Hasonló expressziós mintázatot figyeltünk meg a 16xE_{Col2a1}-NAD1 transzgént hordozó embriók vizsgálata során is, mivel az enhancer még **16 kópiában** sem volt képes a *Col2a1* génre jellemző expressziós mintázat kialakítására (14. ábra).

Ezen adatok alapján arra következtetünk, hogy bár a matrilin-1 gén rövid promotere önmagában alacsony aktivitású, működéséhez homológ, vagy heterológ pozitív DNS elemek szükségesek. A rövid promoter jelenléte azonban mégis képes felülmúlni egy heterológ, rendkívül erős, általános porcspecifikus enhancer működését. A *matrilin-1* rövid promoter gátolja a *Col2a1* enhancer működését a proximális struktúrákban, és aktivitását a növekedési korong meghatározott zónába irányítja. Tehát a rövid promoteren lévő konzervált DNS elemeknek meghatározó szerepük van a matrilin-1 gén szövettípusra, fejlődési állapotra és disztális vázelemekre specifikus expressziójának irányításában.

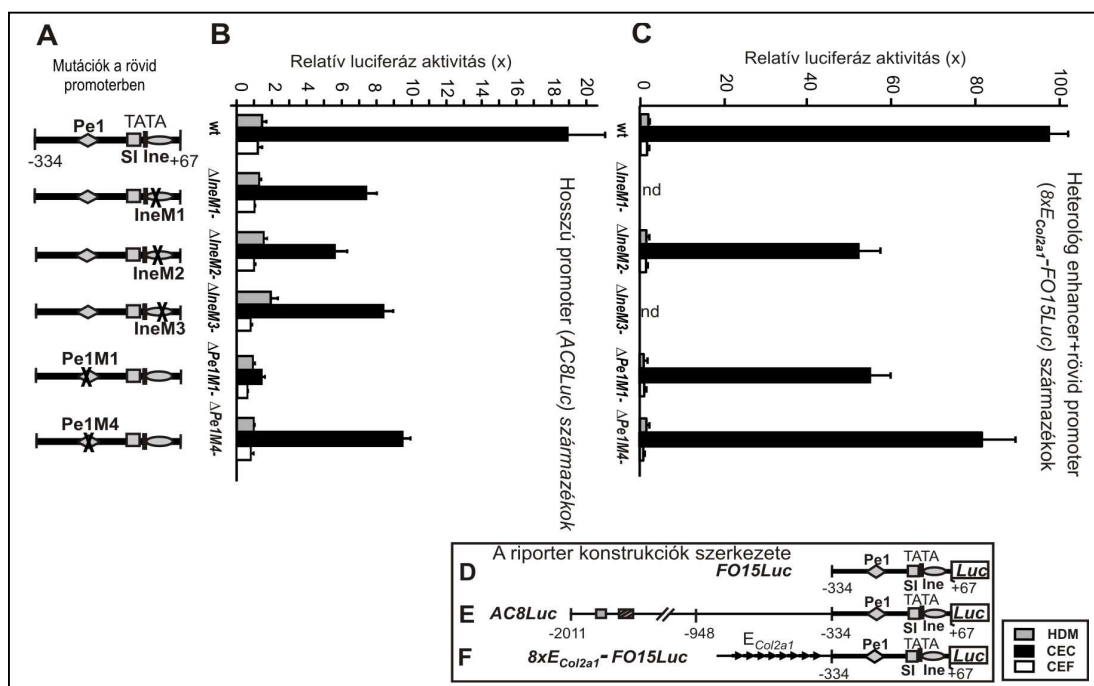
2. A rövid promoter szabályozó elemeit érintő mutációk hatása a matrilin-1 génexpresszióra

2.1. A Pe1 elem Sox kötőhelyeinek mutációja megszünteti a hosszú promoter aktivitását porcsejtekben

A továbbiakban azt kívántuk megvizsgálni, hogy a rövid promoteren korábban azonosított, különböző mértékben konzervált DNS elemek milyen módon járulnak hozzá a matrilin-1 gén szövet- és fejlődési állapot-specifikus működésének szabályozásához *in vivo*.

Ennek érdekében először az amniota fajokban legnagyobb homológiát mutató Pe1 elemet [80] kezdtük vizsgálni. A Pe1 elem a TATA boxtól 100-200 bp távolságra, 5' irányban helyezkedik el. Az elem két, egymással szemben álló motívumot tartalmaz, melyek nagyfokú homológiát mutatnak a Sox9 kötőhellyel [110]. Ezeket a motívumokat két nukleotid választja el egymástól.

A Pe1 elem szerepét először **tranzien্স expressziós kísérletekben** vizsgáltuk, melyekhez olyan konstrukciókat hoztunk létre, amik a Sox9 kötőhelyekben, illetve az azokat elválasztó nukleotidokban hordoztak pontmutációkat (15. ábra D). Korábbi adatok rendelkezésre álltak e mutációk rövid promoterre gyakorolt hatásáról. A Pe1M1 mutáció a páros Sox9 motívumot zavarja meg, ami a rövid promoter aktivitását felére csökkentette, míg a Pe1M4 mutáció a két ismétlődő Sox9 motívum közötti spacer régiót érinti, ami szintén aktivitáscsökkenést okozott chondrocytáknban [126]. CEF és HDM kultúrákban nem volt jelentős változás, ami arra utal, hogy a Pe1 elemnek szerepe van a matrilin-1 gén szövet- és fejlődési állapot-specifikus aktivitásában.



15. ábra Az Ine és Pe1 elemek mutációinak hatása a matrilin-1 hosszú promotor, illetve a 8xE_{Col2a1} és a rövid promotor által irányított konstrukciók aktivitására tranziens expressziós kísérletben. A mutációk helyzete a rövid promoterben (A), hatásuk a hosszú promotor (AC8-Luc) aktivitására (B), illetve a heterológ enhancert és a rövid promotert tartalmazó konstrukciók (8xE_{Col2a1}-FO15-Luc) aktivitására (C) HDM, CEC és CEF sejtkultúrákban. A Pe1 elem és mutáns változatainak szekvenciája (D). A riporter konstrukciók teljes térképe (E,F). A diagramok a konstrukciók AC8-Luc-hoz és 8xE_{Col2a1}-FO15-Luc-hoz viszonyított relatív aktivitását mutatják.

Ezeknek a pontmutációknak a hatását megvizsgáltuk a hosszú promotor (15. ábra B), illetve a nyolckópiás *Col2a1* enhancer elem és a rövid promotor által hajtott konstrukciók tranziens expressziós aktivitására is (15. ábra C). Mindkét esetben drámai aktivitáscsökkenést tapasztaltunk. A Pe1M1 mutáció a hosszú promotor aktivitását kevesebb, mint tizedére csökkentette, a *Col2a1* enhancer és a rövid promotor által irányított konstrukcióét pedig közel felére. A Pe1M4 mutáció a hosszú promotor

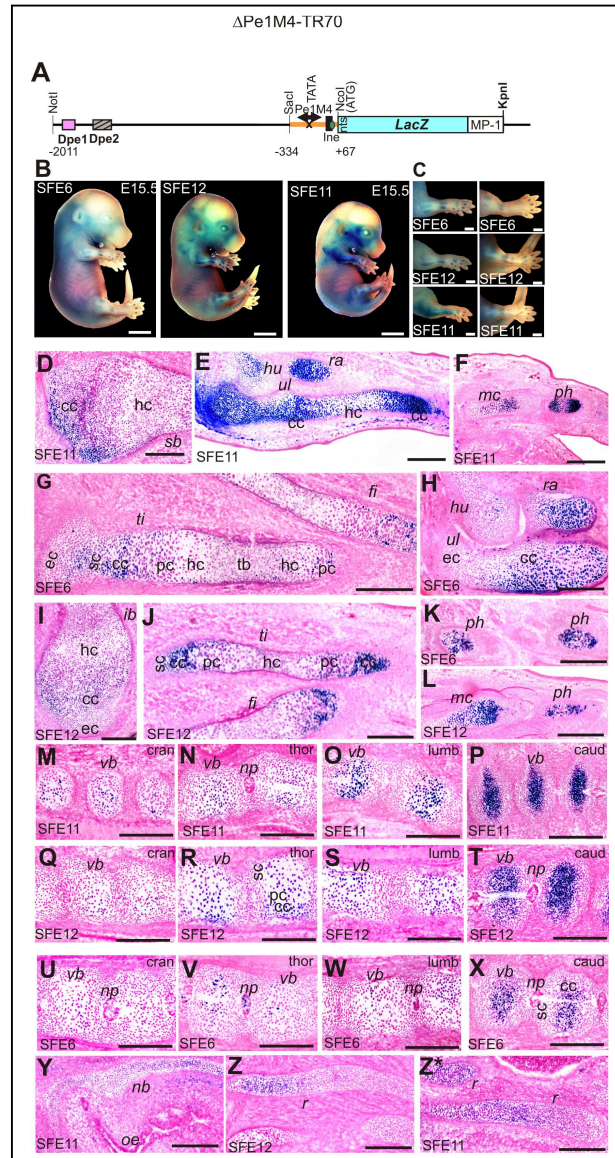
aktivitását felére csökkentette, a heterológ enhanceres konstrukció működésére kevésbé volt hatással (15. ábra B,C).

A tranziens expressziós adatok alapján az a következtetés vonható le, hogy a Sox motívumok mutációja a távoli elemek jelenlétében is gátolja a promoter aktivitását, csökkenti a távoli elemek aktiváló hatását. Tehát a Pe1 elemhez kötődő Sox9-nek kulcsszerepe van a matrilin-1 gén működésének szövetspecifikus szabályozásában. Az említett aktivitásváltozások a másik két sejt kultúrában nem voltak megfigyelhetők.

A tranziens expresszió adatok alapján úgy gondoltuk, hogy a Pe1M1 mutáció *in vivo* is rendkívül nagymértékű aktivitáscsökkenést okozhat, ami transzgenikus egerekben nem detektálható. Ezért **transzgenikus egerek** készítéséhez azt a konstrukciót használtuk, amelyben a hosszú promoter a Pe1M4 mutációt hordozza, tehát a páros Sox kötőhely egyik motívumát rontja el (16. ábra A), mert valószínűnek tartottuk, hogy ennek aktivitását hisztológiai módszerekkel detektálni tudjuk.

Az injektálás után izolált embriók hisztológiai vizsgálata során kiderült, hogy a Pe1 elem spacer régióját érintő mutáció nem befolyásolta jelentősen a transzgén expressziós szintjét, mivel a három vizsgált embrió tengely- és végtagvázának minden elemében magas szinten kifejeződött (16. ábra B-Z). A mutáció a zonális kifejeződési mintázatra sem volt hatással, mivel a növekedési korong oszlopos proliferatív és prehipertróf zónáira korlátozódott (16. ábra D,E,G-J). Ugyanakkor a fejlődő végtagváz proximális struktúrái (pl. humerus, radius, ulna) (16. ábra C,F,K,L) ebben az esetben nem mutattak gyengébb festődést, mint a disztális vázelemek (pl. ujjak) (16. ábra E,G,H,J). Ez azt bizonyítja, hogy a mutáció megszüntette, vagy jelentősen csökkentette a transzgén működés gátlását a proximális vázelemekben. Ugyanakkor a tengelyvázban a proximo-disztális különbségek megmaradtak (16. ábra M-X), bár a különbség a craniális és caudális elemek között csökkent, tehát más DNS elemek felelősek a tengelyváz és a végtagváz proximális elemeiben a génexpresszió gátlásáért.

Ezekből az adatokból arra következtetünk, hogy a Pe1 elem spacer régiójához kötődő, eddig azonosítatlan, valószínűleg egy Sox partnerfaktor felelős a matrilin-1 gén proximo-disztális irányítottságú kifejeződéséért a végtagvázban. Valószínűleg ehhez az elemhez kötődő faktornak van szerepe az expresszió gátlásában a proximális vázelemekben.



16. ábra A Δ Pe1M4 mutáció nem befolyásolja a transzgén zonális aktivitását, viszont a végtagváz elemeiben megszünteti a proximo-disztális irányultságot. A Δ Pe1M4-TR70 transzgén térképe (A) és kifejeződési mintázata az X-Gal festett alapító embriók vázelemeiben (B,C). A fagyasztott metszetek hisztológiai analízise alátámasztotta az egyformán magas szintű *LacZ* expressziót a fejlődő végtagváz függesző öveiben (D,I) és hosszú csontjaiban (E,G,H,J), valamint az ujjakban (F,K,L). A növekedési korongokban az expresszió az oszlopos proliferatív és prehipertrof zónákra korlátozódik. A tengelyváz elemeiben viszont megmaradt a proximo-disztális irányultság, mivel a craniális (M,Q,U), thorakális (thor) (N,R,V) és lumbális (O,S,W) csigolyatestekben a festődés kisebb mértékű, mint a caudális (P,T,X) csigolyák sejteiben. Látható még transzgén expresszió az orrporcban (Y) és a bordákban (Z,Z*). Méretvonal 2 mm (B,C), 200 μ m (D-Z*). További jelölések: ld. 5,7. ábrák.

Mivel szeretnénk volna azt a faktort meghatározni, ami a Sox9-en kívül a Pe1 elemhez kötődik, „pull down” kísérleteket végeztünk. Ehhez biotinilált Pe1 oligonukleotidokat rögzítettünk mágneses gyöngyökhöz, melyeket chondrocyta sejtkivonattal inkubáltunk. A kivonatból a Pe1 elemhez kötődött fehérjék közül MALDI tömegspektrometriával sikerült azonosítani az aggregán promoterkötő fehérjét (APBP), melynek felismerőhelyét *in silico* analízis során több példányban is megtaláltuk a *matrilin-1* szabályozó régióban. Adatainkból arra következtetünk, hogy a Sox9 faktoron kívül APBP és más, a proximo-disztális szabályozásban szerepet játszó, feltehetően morfogén hatású transzkripció faktorok is részt vesznek a *matrilin-1* gén szűkített porcspecifikus kifejeződésének szabályozásában.

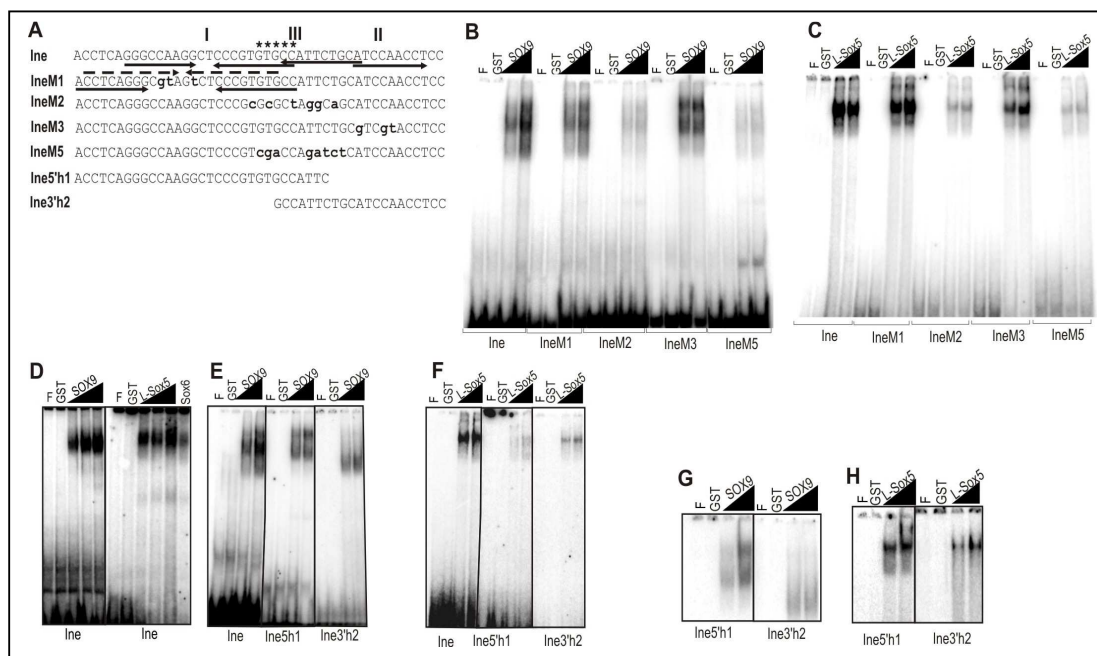
2.2. Az Ine elem Sox kötőhelyeinek szerepe

Amnioták *matrilin-1* génjein végzett korábbi *in silico* analízis során a rövid promoteren a Pe1-nél egy kevésbé konzervált szabályozó elem jelenlétére is fény derült [80]. A csirke génben ez a szekvencia kevésbé konzervált, viszont tartalmaz két, egymással ellentétes irányban elhelyezkedő Sox kötőhelyet. Az Ine elem tartalmazza a csirke *matrilin-1* gén első transzkripció startpontját is (17. ábra A). Korábbi *in vitro* EMSA kísérletek igazolták, hogy chondrocyta sejtmagi fehérjékkel az Ine elem három komplexet képez (I-III.), melyek közül kettő (I., II.) Sox9, L-Sox5 és Sox6 antitestekkel supershift-et mutat, illetve Sox9, HMG és E_{Col2a1} próbákkal kompetálható [111]. Ezek a komplexek valószínűleg tartalmazzák a Sox trió tagjait, míg a harmadik komplex (III.) nem porcspecifikus, nem tartalmaz Sox faktorokat.

Az Ine elem Sox motívumainak pontosabb behatárolására további **EMSA kísérleteket** végeztünk tisztított Sox faktorok kötődésének igazolása végett. Ehhez az elem különböző mutáns, illetve rövidített változatait állítottuk elő (17. ábra A). GST fúziós SOX9, L-Sox5 és Sox6 fehérjék kötődését vizsgáltuk ezekhez az oligonukleotidokhoz. Négy különböző pontmutációt hordozó konstrukció már korábban rendelkezésünkre állt [111]. Az IneM1 és IneM3 oligonukleotidok a Sox kötőhelyek egyikében tartalmaztak pontmutációkat, míg az IneM2 és IneM5 mindkét Sox kötőhelyet elrontotta. Ezekkel az elemekkel végzett EMSA kísérletekben azt tapasztaltuk, hogy az IneM2 és IneM5 mutációk gátolják a komplexképződést a SOX9 fehérjével, illetve nagymértékben csökkentik az L-Sox5 esetében (17. ábra). Az IneM1 és IneM3 mutációk sokkal kisebb hatást gyakoroltak a komplexképződésre (17. ábra), az IneM1 mutáció inkább a Sox9, az

IneM3 mutáció inkább az L-Sox5 kötődését csökkentette. Annak igazolására, hogy mindegyik Sox motívum részt vesz a kötésben, az elem rövidített változatain (Ine5'h1, Ine5'h2, Ine3'h1) is megvizsgáltuk a komplexképződést. Azt tapasztaltuk, hogy különböző intenzitással, de az elem 5' és 3' végén lévő Sox motívumok is képeznek komplexet a Sox trió tagjaival (17. ábra).

Ezekből az adatokból arra következtetünk, hogy az Ine elemen lévő mindkét Sox kötőhely funkcionális és kooperatívan kötik a Sox faktorokat, azaz a megfelelő génműködéshez ezek együttműködésére van szükség.



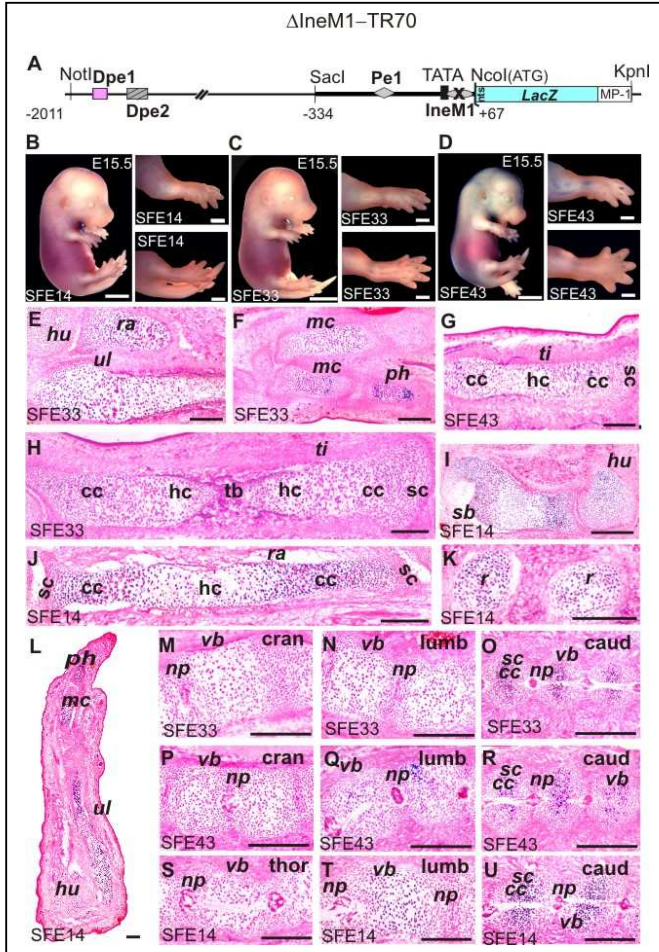
17. ábra Tisztított Sox fehérjék kötődése az Ine elemhez *in vitro*. Az Ine elem és mutáns, illetve rövidített változatainak szekvenciái (A). Tisztított GST-fúziós Sox fehérjék nukleoprotein komplexeket képeznek az Ine elemmel, annak mutáns és rövidített változataival EMSA kísérletekben. Az M2 és M5 mutációk, amik mindkét Sox kötőhelyet érintik megakadályozták a komplexképződést, míg az M1 és M3 mutációk, amik csak az egyik Sox motívumot rontják el, kevésbé voltak hatással a komplexképződésre (B,C). Az 5' végi Sox motívum a Sox9-et preferálta (E), míg a 3' végi motívumhoz inkább az L-Sox5/Sox6 kötődött.

Az Ine elem mutáns változatainak (IneM1, IneM2, IneM3) hatását **transziens expressziós kísérletekben** is megvizsgáltuk. Ehhez olyan konstrukciókat hoztunk létre, melyekben a luciferáz riporter gént a teljes hosszúságú *matrilin-1* promoter, illetve a nyolckópiás *Col2a1* enhancer elem a rövid promoterrel együtt irányítja (15. ábra). Mindhárom mutáció legalább a felére csökkentette a porcsejtekben mért aktivitást a hosszú promoter, illetve a heterológ enhancer-rövid promoter konstrukciók esetében is.

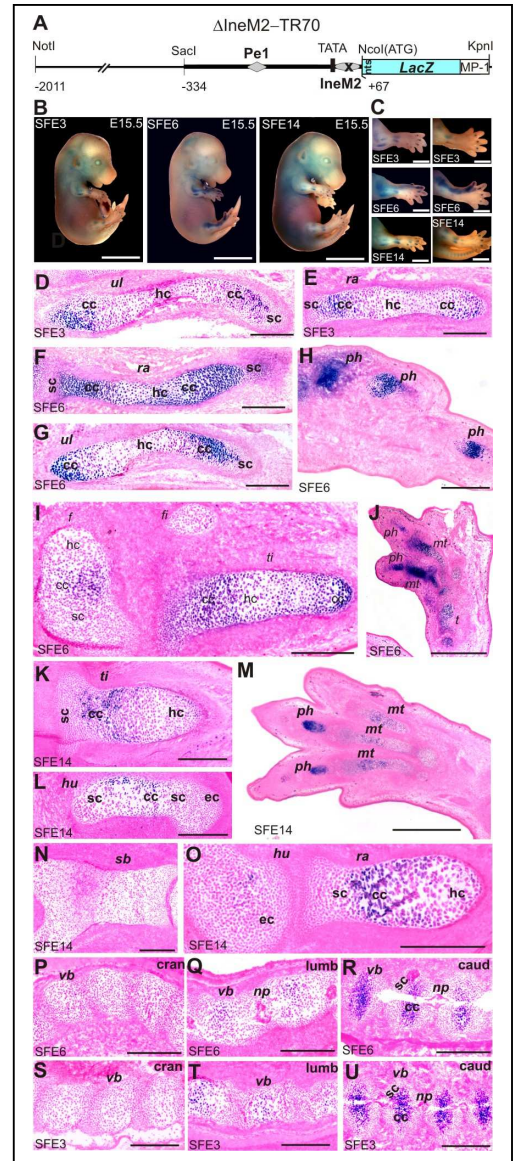
Ezek az adatok is azt támasztják alá, hogy a Sox faktorok kötődése az Ine elem konzervált helyeihez szintén nélkülözhetetlen a promoter teljes aktivitásához.

Ezen adatok alapján két Ine mutáns konstrukciónak készítettük el a **transzgenikus egerek** előállításához alkalmas változatát. A Δ IneM1-TR70 transzgént (18. ábra A) hordozó egerekből készült fagyasztott metszetek hisztológiai vizsgálata arra utalt, hogy az Ine elem 5' Sox motívumát megzavaró mutáció nagymértékben lecsökkentette a transzgén expressziót a fejlődő vázelemekben, de még mindig megfigyelhető volt bizonyos, a TR70 transzgénéhez hasonló proximo-disztális eltérés (18. ábra M-U). Továbbá a növekedési korongon belül a festődés még mindig a proliferatív és prehipertróf zónákra korlátozódott (18. ábra G,H,J). Ebből arra következtetünk, hogy az Ine elem 5' Sox kötőhelye nélkülözhetetlen szerepet játszik a promoter megfelelő aktivitásában *in vivo*.

Az előzővel ellentétben a Δ IneM2-TR70 transzgént (19. ábra A) hordozó egerekben a hisztológiai vizsgálat során a várthoz képest magasabb szintű transzgén expressziót detektáltunk a tengely- és végtagváz összes elemében (19. ábra B). Amellett, hogy ebben az esetben is lecsökkent a génkifejeződés proximo-disztális irányítottsága a végtagvázban (19. ábra C,D-I,K-M), de megmaradt a tengelyvázban (19. ábra P-U). Érdekes módon a vizsgált három embrió közül kettőben az expresszió posztero-anterior irányban megnőtt. Ez jól látszik, ha összehasonlítjuk a festődés intenzitását a radiusban és az ulnában (19. ábra B-G), valamint a hüvelyk- és kisujjban (19. ábra B,C,J). Ez arra utal, hogy az anterior struktúrákban megszűnhetett egy gátló mechanizmus, ami addig akadályozta a magas szintű expressziót. Ebből arra következtetünk, hogy a mutáció az Ine Sox motívumokon kívül még egy morfogén hatású gátló faktor kötődését is megakadályozhatta az Ine elemen. Viszont nem zárhatjuk ki, hogy az integrációs hely eredményezte a poszterior elemekben a gátlás feloldását.



18. ábra A Δ IneM1-TR70 transzgén alacsony zonális aktivitást mutat. A transzgén térképe (A) és expressziós mintázata az alapító embriók vázelemeiben (B-D). Alacsony szintű X-Gal festődés figyelhető meg a fejlődő lapockában (I) és a végtagok hosszú csontjaiban (E,G,H,J,L), amely az ujjak (F,L) irányába kismértékben erősödik. A proximo-disztális különbségek jobban láthatók a tengelyváz esetében, mivel a caudális (O,R,U) csigolyatestekben a *LacZ* expresszió mértéke sokkal nagyobb, mint a craniális (M,P,S) és lumbális (N,O,T) csigolyatestekben. Erősebb festődés figyelhető meg a növekedési korongok oszlopos proliferatív és prehipertróf zónáiban (G,H,J). Alacsony szintű expresszió detektálható még a bordákban (K). Méretvonal 2 mm (B-D), 200 μ m (E-U). További jelölések: ld. 5,7. ábrák.



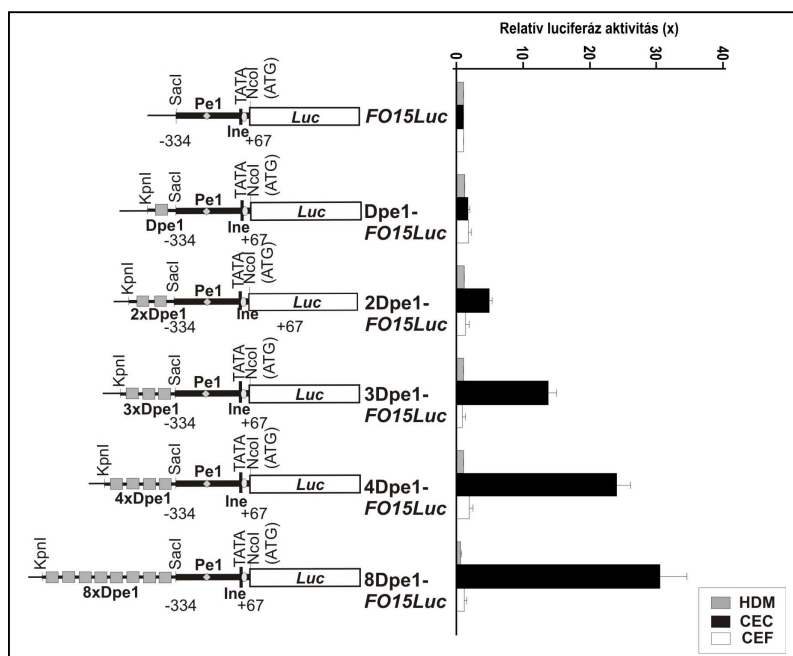
19. ábra Az IneM2 mutáció csökkenti a génkifejeződés proximo-disztális irányítottágát a végtagvázban. A Δ IneM2-TR70 transzgén térképe (A) és a vártnál magasabb expressziós szintje az alapító embriókban (B,C). A hisztológiai vizsgálat azt mutatta, hogy a végtagváz elemeiben csökkent a kifejeződés proximo-disztális irányultsága, mivel a mellső (D-G,L,O) és hátsó végtagok (I,K) hosszú csontjai és az ujjak (H,J,M) hasonló mértékben festődnek. A tengelyváz esetében viszont megmaradt a proximo-disztális irányítottág, mivel a nyaki (P,S) és a deréktáji (Q,T) csigolyákban az expresszió szintje sokkal alacsonyabb, mint a farki (R,U) csigolyatestekben. Érdekes módon a három embrió közül kettőben az expresszió posztero-anterior irányban megnőtt. Ez jól látszik, ha összehasonlítjuk a festődés intenzitását a radiusban és az ulnában (D-G), valamint a hüvelyk- és kisujjban (J). Méretvonal 2 mm (B,C), 200 μ m (D-U). További jelölések: ld. 5,7.

3. Távoli homológ reguláló elemek szerepe a matrilin-1 gén expressziójának szabályozásában

3.1. Disztális elemek hatása a rövid promoter aktivitására

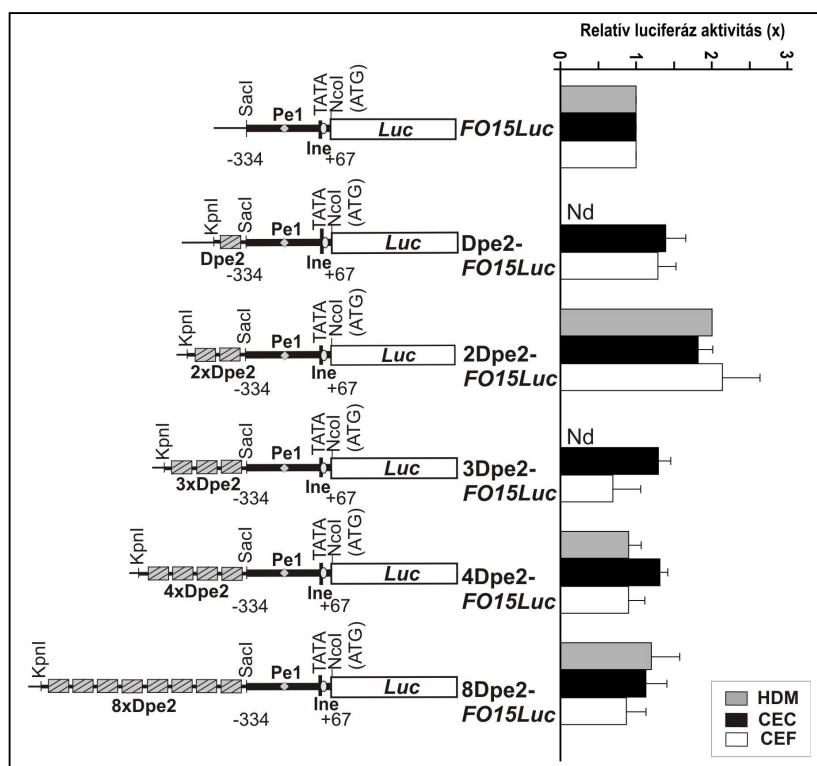
A konzervált Dpe1 és Dpe2 elemeket hordozó -2011/-1394 fragmentum a rövid promoter aktivitását viszonylag jelentősen növelte, de a rövidített fragmentum (-2011/-1741) már nem aktivált transziens expressziós kísérletekben (7. ábra). Ezek alapján valószínűnek látszott, hogy a Dpe1 és Dpe2 szerepet játszhat a promoter aktivitásában.

A távoli elemek szerepének igazolására olyan konstrukciókat hoztunk létre **transziens expressziós** kísérletekhez, melyekben a Dpe1 elem 1, 2, 3, 4, illetve 8 kópiában szerepelt a luciferáz riporter gén előtt (20. ábra). Az elemek számának növelésével a CEC kultúrában mért expressziós szint a rövid promoter aktivitásához képest drámaian megnövekedett, a 8 kópia hatására annak közel 30-szorosára. A másik két vizsgált sejttypusban az aktivitás nem mutatott jelentős változást. Mindez az elem specifikus működését bizonyította a késői proliferatív chondroblastokban gazdag kultúrában.



20. ábra A *matrilin-1* távoli elemének (Dpe1) különböző számú kópiáinak hatása a rövid promoter aktivitására transziens expressziós kísérletben. A diagram az egyes konstrukciók FO15-Luc-hoz viszonyított relatív aktivitását mutatja HDM, CEC és CEF kultúrákban.

A Dpe2 elemmel létrehozott hasonló konstrukciók vizsgálata során viszont azt tapasztaltuk, hogy ez az elem a rövid promoter aktivitását több kópiában sem növeli számottevően (21. ábra). Amikor a magas aktivitást biztosító nyolckópiás Dpe1 elemet tartalmazó konstrukciót a Dpe2 elem különböző számú kópiáival egészítettük ki, chondrocyta kultúrában jelentős aktivitáscsökkenést tapasztaltunk, ami a Dpe2 elemek számának növelésével egyre kifejezettebb volt. A gátlás még kifejezettebb volt, amikor a konstrukció kevesebb számú Dpe1 elemet tartalmazott. Ebből arra következtettünk, hogy a Dpe elemek egymással és a rövid promoterrel együttműködve szerepet játszanak a matrilin-1 gén szövet- és differenciálódási stádium specifikus kifejeződésének irányításában.



21. ábra A *matrilin-1* távoli elemének (Dpe2) különböző számú kópiáinak hatása a rövid promoter aktivitására transziens expressziós kísérletben. A diagram az egyes konstrukciók FO15-Luc-hoz viszonyított relatív aktivitását mutatja HDM, CEC és CEF kultúrákban.

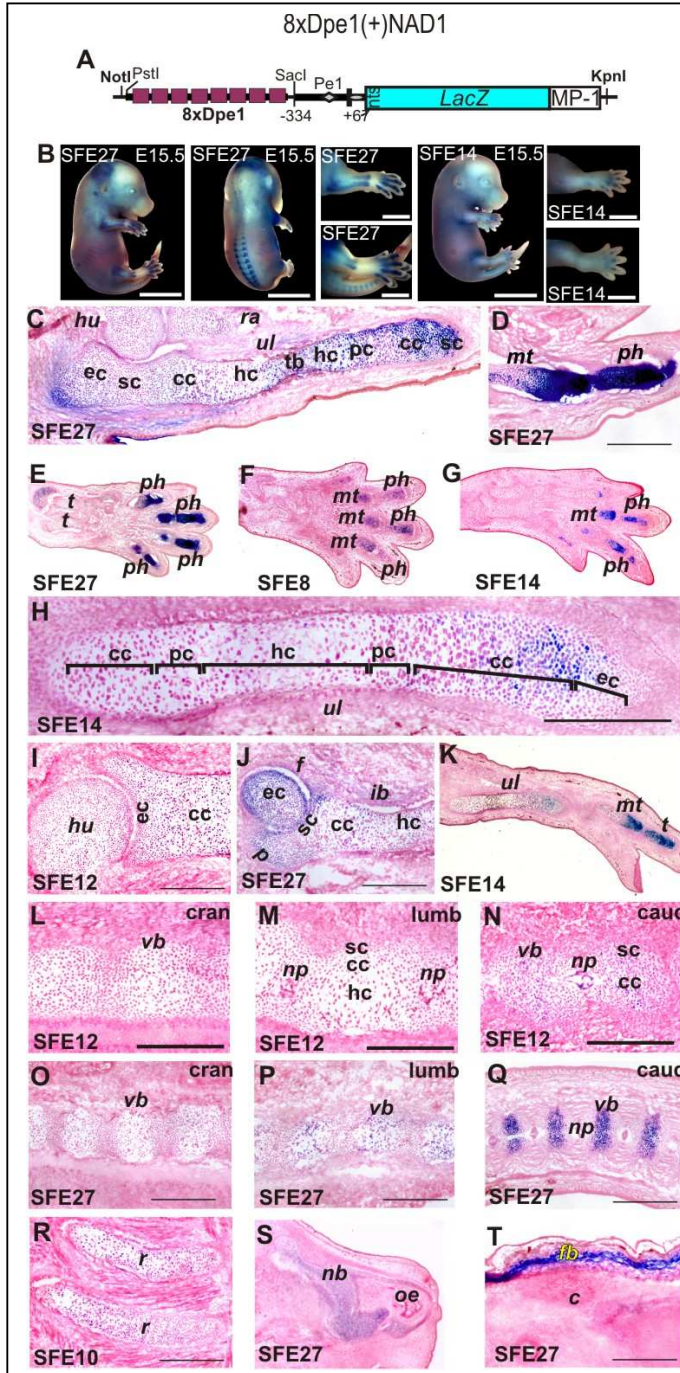
Hogy a Dpe elemek hatását *in vivo* is megvizsgáljuk, először a 8xDpe1-FO15-Luc konstrukciónak készítettük el a *LacZ* riporter gént tartalmazó verzióját (22. ábra A), mivel a transziens expressziós kísérletekben ez mutatta a legmagasabb porcspecifikus aktivitást. Az öt megvizsgált **transzgenikus embrióban** rendkívül magas expressziós szintet figyeltünk meg az összes endochondrális csontosodással kialakuló vázelemben (22. ábra

B). Mindez a TR70-nél is kifejezettebb proximo-disztális irányítottsággal párosult. Nem csak a gerinc és a végtagváz esetében (22. ábra C-I, M-S), hanem a végtagváz egyes elemein belül is jól megfigyelhető volt. Így például a hosszú csontok és az ujjpercek disztális végein az expresszió sokkal nagyobb mértékű volt, mint a proximális végeken (22. ábra C-J,M). A transzgén kifejeződési mintázatára jellemző még, hogy az erőteljes proximo-disztális irányítottság a disztális epifízisekben a zonális kifejeződési mintázatot is módosította, így az ujjpercek disztális végein a proliferatív és prehipertróf zónák mellett a forrás zóna és a perichondrium sejtjei is igen erősen festődtek (22. ábra D,G,I-M). Egyetlen embrió esetében tapasztaltunk ektopikus kifejeződést az intramembrán úton kialakuló koponyatetőcsontban (22. ábra B). Ez arra utal, hogy a transzgén expressziós mintázatát az integrálódási hely genomi környezete nem befolyásolja lényegesen.

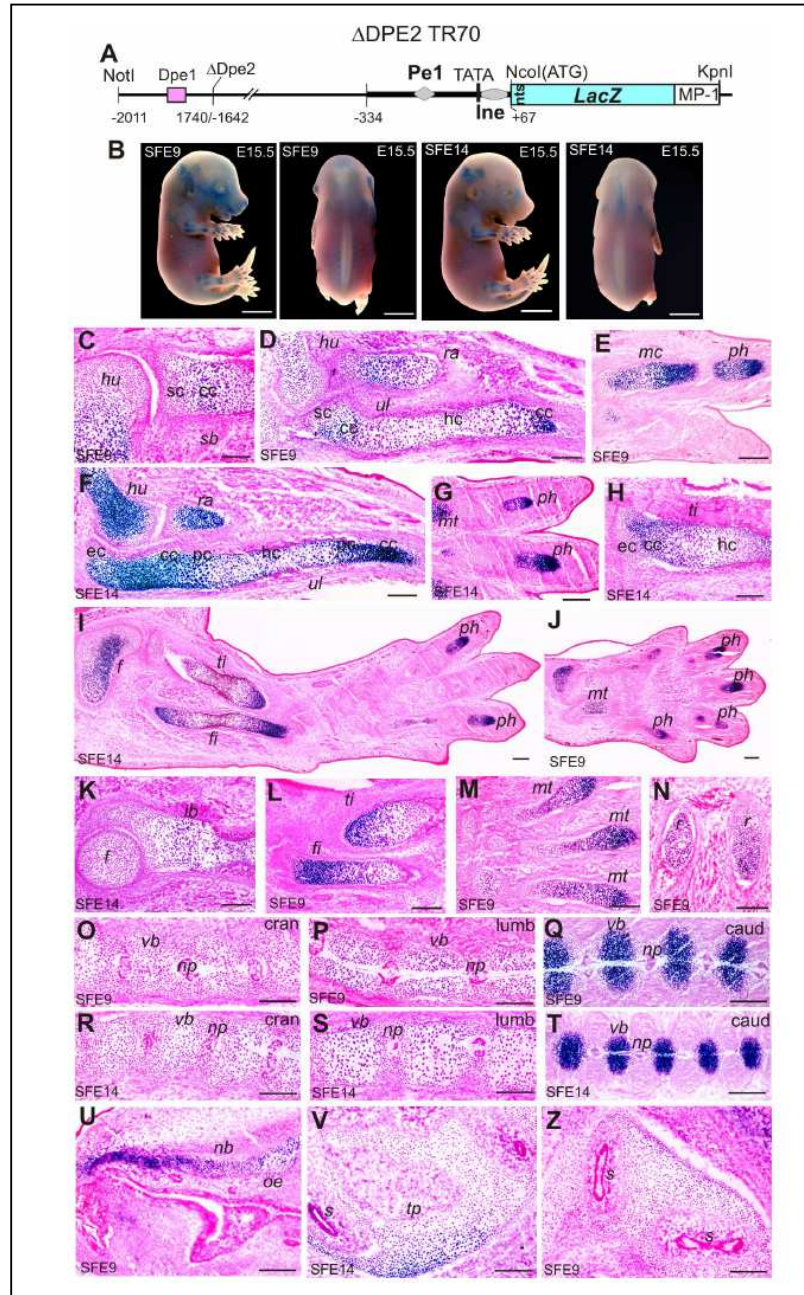
A tranziens expressziós és transzgenikus egér kísérletek eredményei alapján elmondható, hogy a Dpe1 elem meghatározó szereppel bír a matrilin-1 gén szövet- és fejlődési állapotspecifikus aktivitásának, illetve proximo-disztális irányítottságának kialakításában, ezáltal alkalmas lehet arra, hogy egyéb fuzionált gének kifejeződését az ízületi betegségek (rheumatoid arthritis) által legérintettebb disztális struktúrákba (ujjak) irányítsa. Ezért ezzel a konstrukcióval transzgenikus egérvonalat hoztunk létre, ami alkalmas arra, hogy indukált arthritisben nyomon kövessük a génexpresszió csökkenését, illetve a gyógyszerjelölt vegyületekkel való kezelés utáni regenerációt. A 8xDpe1-NAD1 vektorra és alkalmazására transzgenikus egerekben szabadalmat nyújtottunk be.

Ezután arra voltunk kíváncsiak, hogy a Dpe2 elem delécioja a hosszú promoterből hogy befolyásolja annak aktivitását *in vivo*. Ebből a célból eltávolítottuk a -1740/-1642 DNS szakaszt a promoter fragmentumból és így építettük a *LacZ* riportergén elé. A ΔDpe2-TR70 transzgént (23. ábra A) expresszáló embriók vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a festődés intenzitása összehasonlítható a TR70 transzgénével, sőt megmaradt a zónaspecifikus aktivitás is, hiszen a növekedési korongok proliferatív és prehipertróf zónáira korlátozódott az expresszió, ahogy az a végtagok hosszú csontjaiban megfigyelhető (23. ábra C,D,F,H,I,L). Lényeges különbség viszont a TR70 transzgénhez képest, hogy míg a tengelyváz esetében megmaradt a proximo-disztális irányítottság (azaz a nyaki régiótól a farki régió felé haladva a fejlődő csigolyatestekben nagymértékben nőtt az expresszió szintje) (23. ábra O-T), addig ez a fejlődő végtagváz elemeiben megszűnt. Ezt támasztja alá, hogy hasonló mértékű *LacZ* expressziót figyeltünk meg mind a mellső (humerus, radius, ulna) (23. ábra C,D,F), mind a hátsó végtag fejlődő hosszú csontjaiban (femur, tibia, fibula) (23. ábra H,I,L), valamint az ujjakban (23. ábra E,G,I,M). A

végtagváz proximális struktúráiban jelentős mértékben megnövekedett transzgén expresszió arra utal, hogy a Dpe2 elem deléciója egy represszáló hatást szüntetett meg ezekben a struktúrákban. Ez alapján feltételezhető, hogy a Dpe2 elemhez olyan transzkripció faktorok, vagy morfogének kötődnek, melyeknek negatív szabályozó szerepük van a matrilin-1 gén kifejeződésének szabályozásában a végtagok proximo-disztális tengelye mentén.



22. ábra A Dpe1 elem nyolc kópiája nagymértékben növeli a rövid promotor aktivitását és az expressziót a disztális struktúrákba irányítja. A 8xDpe1-NAD1 transzgén térképe (A). Az X-gal festett alapító embriók chondrocraniumában, tengely- és végtagvázában figyelhető meg különböző intenzitású festődés, mely a váz disztális struktúráiban a legerősebb (B). A metszetek hisztokémiai vizsgálata erős festődést mutat a fejlődő ulna (C,J), humerus (E) és radius (F) oszlopos proliferatív és prehipertróf porcsejtjeiben. Az ujjakban megfigyelhető festődés (D,G-I,M) intenzívebb, mint a végtagok hosszú csontjaiban (C,E,F,J,M), illetve a mellső és hátsó végtagok függesztő öveinek fejlődő elemeiben (K,L). A hosszú csöves csontok és az ujjak disztális végein a festődés sokkal erősebb, mint a proximális végeken (C-J,M). Az expresszió proximo-disztális erősödése a tengelyváz esetében is látható. A fejlődő farki csigolyák porcsejtjei (P,S) sokkal intenzívebben festődnek, mint az ágyéki (O,R) és a nyaki csigolyák (N,Q) sejtjei. Megfigyelhető még transzgén expresszió a bordákban (T,V) és az orrporcban (U). Méretvonal 2 mm (B), 200 μ m (C-V). További jelölések: ld. 5,7. ábrák.

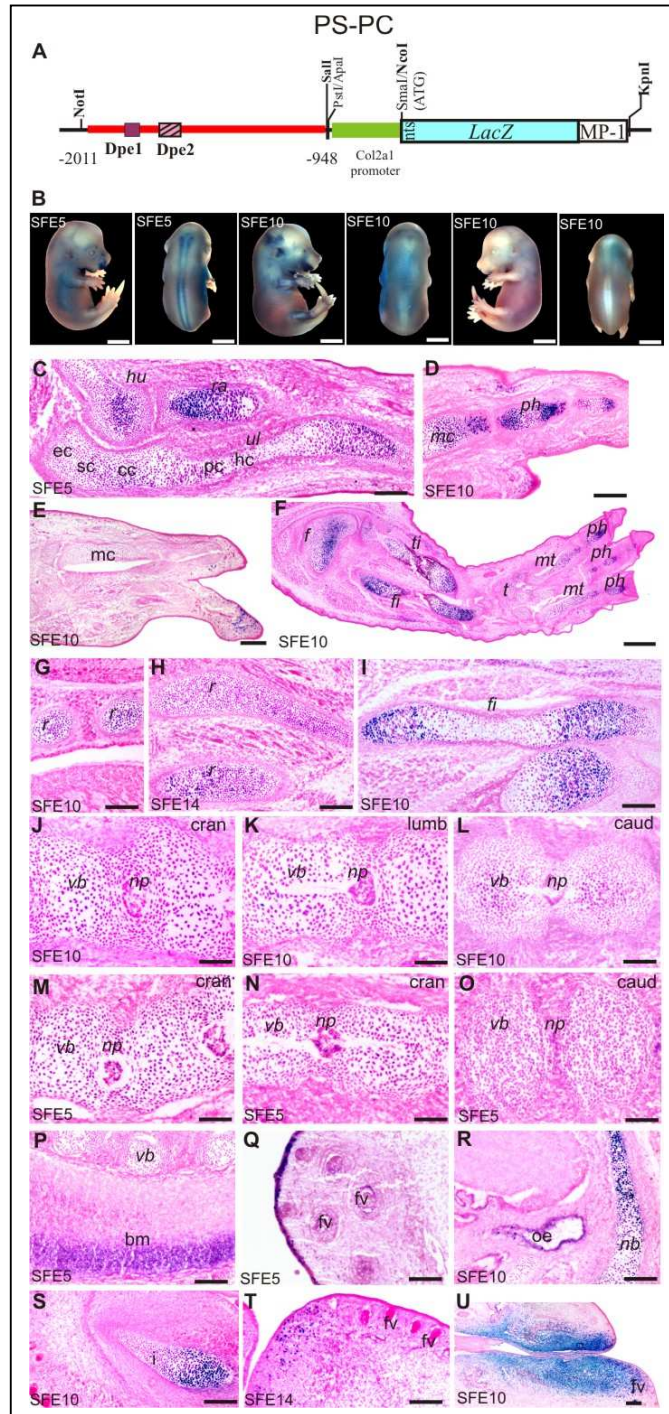


23. ábra A Dpe2 elem deléciója nem befolyásolja a zóna-specifikus expressziót, de a hosszú csontokban megszünteti a proximo-disztális irányítottságot. A Δ Dpe2-TR70 transzgén térképe (A) és kifejeződési mintázata az alapító embriók fejlődő vázelemeiben (B). A fagyasztott metszetek hisztológiai vizsgálata során kiderült, hogy a transzgén expresszió a fejlődő hosszú csontok növekedési korongjának oszlopos proliferatív és prehipertróf zónáira korlátozódik (C,D,F,H). Egyforma mértékű X-gal festődés figyelhető meg a lapocka (C), humerus (C,D,F), radius (D,F), ulna (D,F), kézközépcsontok (E) és az ujjak (E), illetve a medencecsont (K), femur (I,K), tibia (H,I,L), fibula (I,L), lábközépcsontok (G,J,M) és lábujjak (G,I,J) esetében. LacZ expresszió detektálható még az orrporcban (U) és a falcsontr kezdeményében (V). Méretvonal 2 mm (B), 200 μ m (C-Z). További jelölések: ld. 5,7. ábrák.

3.2. Disztális elemek hatása heterológ promoter aktivitására

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a távoli promoter régió is képes-e egy önmagában inaktív, heterológ promoter működését úgy irányítani, hogy a matrilin-1 génhez hasonló expressziós mintázatot kapjunk. Ehhez olyan transzgént állítottunk elő, melyben a matrilin-1 gén -2011/-946 fragmentuma a *Col2a1* minimál promoter elé építve, azzal együtt irányítja a *LacZ* riporter gént (24. ábra A). A PS-PC transzgént hordozó embriók a PS-NAD1 egerekkel összehasonlítható mértékben festődtek (24. ábra B). A transzgenikus állatok hisztológiai vizsgálata arra utalt, hogy a távoli promoter régió képes az inaktív *Col2a1* promotert aktiválni és az expressziót a fejlődő vázelemekbe irányítani. Érdekes módon az expresszió magas volt a fejlődő végtagokban és chondrocraniumban (24. ábra C-F,I,R), de alacsony a tengelyvázban, a gerincben alig detektálható (24. ábra G,H,J-O). A *LacZ* aktivitás szintén az oszlopos proliferatív és prehipertróf zónákra korlátozódott, tehát a zonalitás a távoli promoter elemekre is jellemző. Hasonlóan a VAM2 transzgénhez, egyéb struktúrákban is megfigyelhető volt kifejeződés, pl. az orrban (24. ábra Q,R,T,U), a metszőfog kezdeményében (24. ábra S), a gerincvelőben (24. ábra P). Viszont ellentétben a PS-NAD1 transzgénre jellemző mintázattal, itt nem figyeltük meg az arra jellemző proximo-disztális irányítottságot, sem az azonos zónában lévő sejtek különböző mértékű festődését.

Ebből arra következtetünk, hogy a matrilin-1 génre jellemző zónafüggő, porcspecifikus expresszió irányítására a távoli elemek is képesek, de a disztális struktúrákban erősebb aktivitás a rövid promoteren lévő konzervált szabályozó elemek és a távoli promoter elemek együttműködésének eredménye.

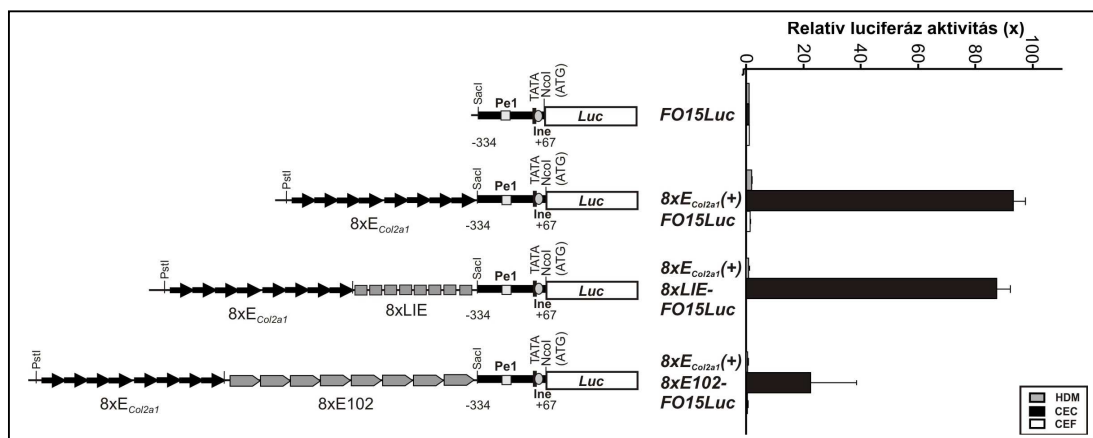


24. ábra A *matrilin-1* távoli promotor régió képes az inaktív *Col2a1* promotert aktiválni. A PS-PC transzgén térképe (A) és expressziós mintázata az alapító embriókban (B). A metszetek histológiai vizsgálatokor detektáltunk expressziót az összes fejlődő vázelemben (C-U). A *LacZ* kifejeződés szintje magas volt a fejlődő mellső (C-E) és hátsó végtagokban (F,I) és a chondrocraniumban (R), de alacsony a tengelyvázban (G,H), a gerincben pedig alig detektálható (J-O). A fejlődő hosszú csontok növekedési korongjaiban *LacZ* aktivitás az oszlopos proliferatív és prehipertrof zónákra korlátozódott (C). Megfigyelhető még transzgén kifejeződés az orrban (Q,R,T,U), a metszőfog kezdeményében (i) (S), és a gerincvelőben (bm) (P). fv, vibrissák follikulusai. Méretvonal 2 mm (B), 200 μ m (C-U). További jelölések: ld. 5,7. ábrák.

3.3. Homológ introni elemek hatása a rövid promoter aktivitására

A matrilin-1 gén intronjában korábban azonosított 102 bp-os elem (E_{102}), illetve azon belül a LIE elem szabályozásban betöltött szerepét is vizsgáltuk tranziens expressziós és transzgenikus egér kísérletekben. Ezek az elemek azért keltették fel érdeklődésünket, mert korábbi kísérletekből kiderült, hogy Sox9 és Nfi kötőhelyeket tartalmaznak [108], melyek a rövid promoteren is megtalálhatók.

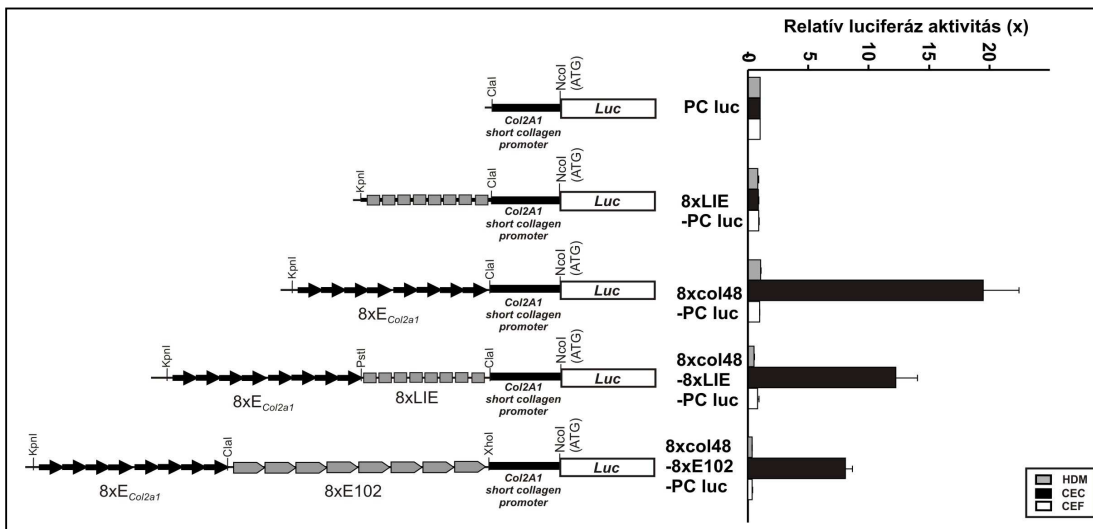
Megvizsgáltuk, hogy az E_{102} és LIE beépítése a *Col2a1* enhancer elemek és a rövid promoter közé milyen hatást gyakorol ennek a konstrukciónak az aktivitására HDM, CEC és CEF kultúrákban **tranziens expressziós** kísérletben (25. ábra). A $8xE_{Col2a1}$ - $8xLIE1$ -FO15-Luc konstrukció viselkedése mindhárom típusú sejt kultúrában lényegében azonos volt a kiindulási, $8xE_{Col2a1}$ -FO15-Luc konstrukcióéval, vagyis ebben a környezetben a LIE elem hatása nem érvényesült. A $8xE_{Col2a1}$ - $8xE_{102}$ -FO15-Luc konstrukció azonban HDM, CEC és CEF kultúrában is ~70% relatív aktivitáscsökkenést okozott, ami szintén a transzkripciós szabályozásban betöltött negatív szerepére utal.



25. ábra A *Col2a1* enhancer elem és a *matrilin-1* introni elemek nyolc kópiájának hatása a rövid promoter aktivitására tranziens expressziós kísérletben. A diagram az egyes konstrukciók FO15-Luc-hoz viszonyított relatív aktivitását mutatja HDM, CEC és CEF kultúrákban.

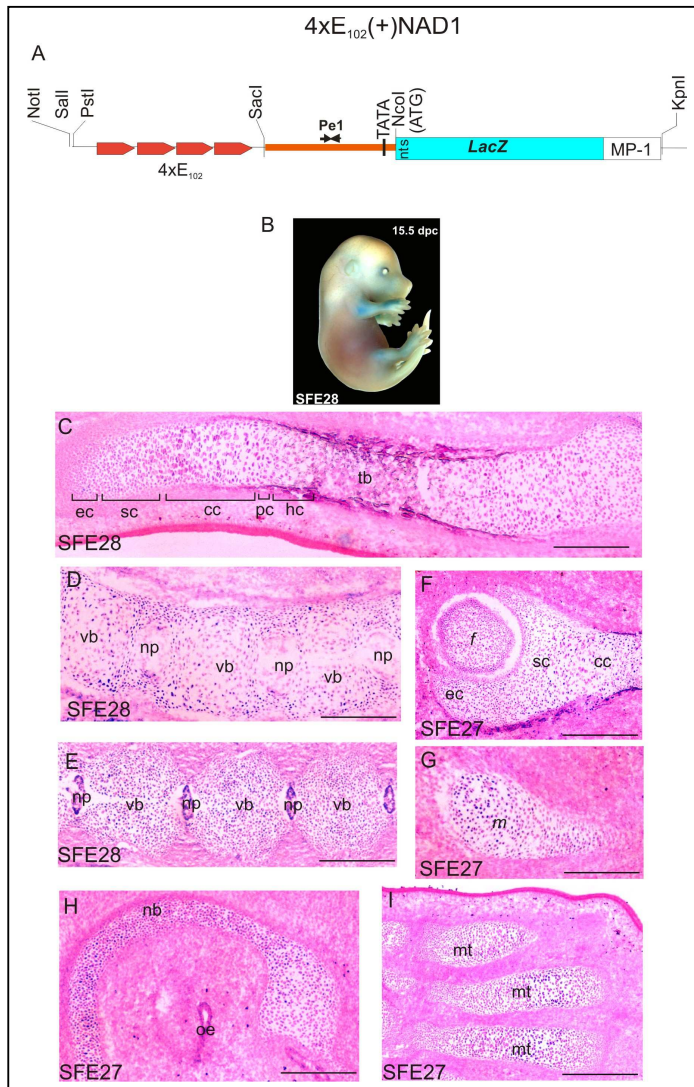
Az *Col2a1* enhancer elemet és az E_{102} , illetve a LIE elemet 8 kópiában az irodalmi adatok alapján inaktív *Col2a1* rövid promoter által meghajtott luciferáz gén (PC-Luc) elé is beépítettük. A kontrollként használt $8xE_{Col2a1}$ -PC-Luc porcspecifikus aktivitása a PC-Luc-hoz képest 23x-ra nőtt. A 102 bp-os elemek jelenléte mindhárom kultúrában jelentősen csökkentette a luciferáz aktivitást a $8xE_{Col2a1}$ -PC-Luc konstrukcióhoz képest. A LIE elemek jelenléte pedig mindhárom kultúrában ~30%-os aktivitáscsökkenéssel járt (26.

ábra). Adataink alapján úgy tűnik, hogy a 102 bp-os elem általános transzkripciót gátló hatással bír, míg a LIE elem gátló hatása késői proliferatív porsejtekben a legkifejezettebb.



26. ábra A *matrilin-1* introni elemek nyolc kópiájának hatása heterológ promoter aktivitására tranziens expressziós kísérletekben. A diagram az egyes konstrukciók PC-Luc-hoz viszonyított relatív aktivitását mutatja HDM, CEC és CEF kultúrákban.

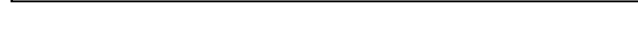
Az E_{102} elem *in vivo* hatásának vizsgálatához olyan konstrukciót készítettünk és állítottunk elő vele **transzgenikus egereket**, ami a rövid promoter előtt 4 kópiában tartalmazza ezt az elemet (27. ábra A). A $4xE_{102}$ -NAD1 transzgenikus alapító embriók vázelemeiben nagyon alacsony szintű expressziót figyeltünk meg, ami a NAD1 expressziós szintjét nem, vagy alig haladta meg és nem mutatott proximo-disztális irányítottságot (27. ábra B). Ezt támasztja alá, hogy a nyaki és farki gerinc régiókból származó csigolyatestek összehasonlítható mértékben festődtek (27. ábra D,E). A növekedési korongok proliferatív és prehipertróf zónáiban detektáltunk gyengén festődő sejteket, ahogy az a fejlődő hosszú csontok esetében látható (27. ábra C).



27. ábra Az E_{102} elem négy kópiája nem növeli a rövid promoter aktivitását *in vivo*. A $4xE_{102}$ -NAD1 transzgén térképe (A) és kifejeződési mintázata a transzgenikus alapító embrióban (B). A vázelemekben nagyon alacsony szintű expresszió figyelhető meg, ami nem mutat proximo-disztális irányítottságot, mivel a nyaki (D) és farki (E) gerinc régiók csigolyatestjei összehasonlítható mértékben festődnek. A növekedési korongok oszlopos proliferatív és prehipertróf zónáiban detektáltunk gyengén festődő sejteket (C). Szintén alacsony szintű expresszió figyelhető meg a medencecsontban (F), a Meckel-féle porcban (G) és az orrporcban (H). Méretvonal 2 mm (B), 200 μ m (C-I). További jelölések: 5,7. ábrák.

A $8xLIE$ -NAD1 transzgént (28. ábra A) hordozó állatok szintén alacsony expressziós szintet mutattak (28. ábra B), ami a NAD1 expressziós szintjét csak a fej és a bordák fejlődő porcós vázelemeiben haladta meg kissé (28. ábra B-G,J,K). Érdekes módon azonban a transzgén a fejben, az orr körüli struktúrákban nagyon magas ektopikus kifejeződést mutatott (28. ábra B-G). A proximo-disztális irányítottság itt sem érvényesült, mivel a nyaki és farki csigolyák ebben az esetben is hasonló mértékű festődést mutattak (28. ábra H,I).

A transzgenikus egér adatok tehát összhangban vannak a tranziens expressziós és az introni elemekre vonatkozó korábbi adatokkal, melyek szerint ezek az introni elemek



AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Transzgenikus egerekben kimutattuk, hogy a *Matn1* rövid promoter alacsony aktivitású a proliferatív és a prehipertróf porcsejtekben. Aktivitását távoli homológ promoter és heterológ porcspecifikus enhancer elemek nagymértékben növelik. Az önmagában alacsony aktivitása ellenére a rövid promoter domináns szerepet játszik a gén porcspecifikus, térben és időben szűkített kifejeződésének szabályozásában, sőt még erős, általános porcspecifikus enhancer aktivitását is képes térben és időben szűkíteni.
2. Kimutattuk, hogy a rövid promoter működésében kulcsszerepe van a konzervált Pe1 elem páros Sox kötőhelyének és az Ine elem Sox motívumainak.
EMSA kísérletekben igazoltuk, hogy az Ine elem két páros Sox motívuma képes tisztított Sox faktorokat kötni. Az 5' Sox kötőhely inkább Sox9-cel, míg a 3' végi Sox kötőhely inkább L-Sox5/Sox6-tal lép kölcsönhatásba.
Mutációk hatását vizsgálva a hosszú promoter aktivitására transzgenikus egerekben megállapítottuk, hogy a Pe1 elem Sox motívumait elválasztó spacer régió mutációja és az IneM2 mutáció feloldja a rövid promoter által irányított gátlást a fejlődő végtagváz proximális elemeiben, de a növekedési korongban a zonális expressziót nem változtatja meg.
3. Behatároltuk a gén távoli promoter elemeit és igazoltuk a Sox motívumokat tartalmazó Dpe1 elem fontos szerepét a rövid promoter aktiválásában.
Transzgenikus egerekben igazoltuk, hogy az elem nyolc kópiája a rövid promoter elé építve magas szintű zonális expressziót alakít ki a növekedési korongokban rendkívül erős proximo-disztális irányítottsággal a fejlődő porcos vázelemekben.
A Dpe2 elem deléciója a hosszú promoterből megszünteti a transzgén expresszió gátlását a végtagváz proximális elemeiben, de a gerinc caudális részén nem, és a zónaspecificitás is megmarad.
A Dpe1 és Dpe2 elemeket tartalmazó távoli DNS szakasz heterológ promoter elé építve is zonális kifejeződést irányít a fejlődő végtagváz elemeinek növekedési korongjaiban és a fejben. Tehát a távoli elemekre is jellemző a zónaspecificitás, de a proximo-disztális különbségek kialakításához a rövid promoter elemekre is szükség van. Más DNS elemek vesznek részt a végtagváz proximo-disztális és a gerinc cranio-caudális irányban erősödő *Matn1* expresszió szabályozásában. Mindettől független a zonális, azaz a fejlődési állapotspecifikus szabályozás.

4. Vizsgáltuk a Sox és Nfi kötőhelyeket tartalmazó introni DNS elemek szerepét is a gén transzkripció szabályozásában. Ezek a DNS elemek nem, vagy csak kis mértékben növelték a rövid promoter aktivitását például a fejben és a bordákban, és a fejben erős ektopikus kifejeződést irányítottak. A vizsgált introni elemek szerepe tehát kisebb a matrilin-1 gén szabályozásában.

DISZKUSSZIÓ

A *matrilin-1* gén egyedi tulajdonsága, hogy szemben más porcfehérjéket kódoló génekkel, melyek már a korai proliferatív porcsejtekben kifejeződnek, csak a késői proliferatív stádiumú chondrocytákban kapcsol be. *In vivo* a növekedési korong proliferatív és prehipertróf zónáira korlátozódik az expressziója, így e zónák markergénjének tekinthető. Mivel ezek a zónák igen fontos szerepet töltenek be a porc –és csontfejlődés során, nagy jelentősége van azon szabályozó mechanizmusok felderítésének, melyek a génexpressziót ezekbe a régiókba irányítják. A porcfehérje gének szabályozó mechanizmusaiban bekövetkező olyan hibák, amik a zonális expressziót akadályozzák, súlyos fejlődési rendellenességeket okoznak [83,84]. E mechanizmusok pontos felderítése hozzájárulhatna ahhoz, hogy a porcszövetet érintő betegségek és fejlődési rendellenességek korai stádiumban, még a tünetek megjelenése előtt, genetikai markerek segítségével azonosíthatóak legyenek, illetve elősegítené a megelőzés és a kezelés megfelelő stratégiáinak kidolgozását.

Munkánk során arra kerestük a választ, hogy a csirke *matrilin-1* gén korábban azonosított, konzervált szabályozó elemei milyen mértékben járulnak hozzá a gén expressziójának szabályozásához, és hogy a chondrogenézist szabályozó fő transzkripciós faktorok hogyan játszanak szerepet ebben a folyamatban. Kísérleteinkkel *in vivo* rendszerben bizonyítottuk, hogy a *matrilin-1* gén rövid promoterén lévő szabályozó elemek kulcsszerepet játszanak a génre jellemző kifejeződési mintázat kialakításában. Igazoltuk, hogy a Pe1 és Ine elemek képesek kötni a chondrogenézis fő transzkripciós faktorait, a Sox trió tagjait. További *in vivo* és *in vitro* kísérletek eredményeivel pedig alátámasztottuk, hogy a rövid promoter ezen elemei a proximális promoter szabályozó elemeivel kommunikálva működnek.

A szabályozás egyik jellemzője, hogy a *matrilin-1* szabályozó régió több, amniota fajokban különböző mértékű homológiát mutató szekvencia elemet tartalmaz, melyeknek szerepe lehet a gén szövet –és fejlődési állapot-specifikus szabályozásában [80]. Ezek a konzervált elemek a gén rövid promoterén (-334/+67), illetve a távoli promoter régiókban helyezkednek el. Hasonló evolúciós konzerváltság figyelhető meg például a Sox2 enhancerek esetében [112], melyek a *matrilin-1* szabályozó elemekhez hasonlóan elszórtan helyezkednek el hosszabb génszakaszon. A konzervált blokkok gerinces fajokként mutatnak eltéréseket, melyek a génexpresszió tér- és időbeli különbségeit tükrözik [113]. Tehát a *matrilin-1* esetében is igaz lehet, hogy a szabályozó elemek

evolúciós konzerváltsága az elemek funkcionális jelentőségét tükrözi. Ezt a következtetést eredményeink megerősítik.

A dolgozatban leírt transzgenikus egér kísérletek egyértelműen azt bizonyítják, hogy a matrilin-1 gén térben és időben szűkített kifejeződésének szabályozásában kulcsszerepet tölt be a gén rövid promotere [107]. Utóbbinak az aktivitása önmagában tranziens expressziós és transzgenikus egér (NAD1) kísérletekben igen alacsony, viszont képes a rendkívül erős, általános porcspecifikus, heterológ Col2a1 enhancer elem [109] több kópiájának jelenléte ellenére is a matrilin-1 génre jellemző, zonális és proximo-disztális irányultságú expressziós mintázat kialakítására [114]. Ez a mechanizmus eltér a Col2a1 gén szabályozásától, mivel annak promotere önmagában inaktív, enhancerére pedig jellemző a magas szintű aktivitás minden porcsejtben, fejlődési stádiumtól függetlenül, beleértve a perichondrium, az előporc és a proliferatív zóna sejtjeit, de nem jellemző rá az a térben és időben való szűkítettség, ami a matrilin-1 gén szabályozásának sajátossága.

Szövetspecifikus szabályozó elemeket más eukarióta gének promoterében is azonosítottak, például máj- és osteoblast-specifikus gének esetében [115,116], de nem porcspecifikus génekben, melyeknek fő szabályozó elemei intronokban, vagy távoli 5' végen helyezkednek el.

Az endogén matrilin-1 génre jellemző expressziós szint kialakításában részt vesznek távoli promoter elemek is [107], hasonlóan az emlős anti-Müllerian hormon génhez, melynek TATA-boxától 100 bp távolságra azonosítottak egy konzervált DNS elemet, amit a SOX9 és partner transzkripciós faktora, az SF-1 ismer fel [117]. Ehhez hasonló mechanizmus feltételezhető a matrilin-1 gén esetében is, mivel a távoli promoter régió hosszának növelésével a porcsejtekben mért aktivitás jelentősen megnövekedett, illetve transzgenikus egerekben is a *LacZ* expresszió növekedését tapasztaltuk a távoli elemek jelenlétében (PB-NAD1, PS-NAD1) [114].

A matrilin-1 génre jellemző újszerű és igen hatékony, a proliferatív stádiumhoz kapcsolódó szabályozó mechanizmust más gén esetében nem írtak le. Erre a szabályozásra jellemző, hogy a rövid promoter evolúciósan konzervált szabályozó elemei játsszák a főszerepet, melyek a porcfejlődést irányító legfontosabb transzkripciós faktorok, a Sox trió kötőhelyeit tartalmazzák [80,110].

A porcdifferenciálódást irányító fő transzkripciós faktor a Sox9, mely minden chondroprogenitor sejtben kifejeződik, hiányában a porcos elemek nem fejlődnek ki [81,82,85]. A porcszövet extracelluláris mátrixát felépítő fehérjéket kódoló gének közül a

Col9a1, *Col9a2*, *Col11a2*, *CD-Rap* és az *Agc1* expresszióját is irányítja a Sox9 [91,95,97-101].

Eredményeink összhangban korábbi irodalmi adatokkal [80,107] és a csoportban párhuzamosan végzett EMSA, *in vivo* footprint és tranziens expressziós kísérletek eredményeivel együtt igazolják, hogy bár a matrilin-1 gén transzkripció szabályozásában részt vesznek Sox faktorok, a szabályozás mégis eltér más porcfehérje génekétől.

A rövid promoteren lévő Pe1 elem Sox motívumairól *in vitro* EMSA és *in vivo* footprint kísérletekben bebizonyosodott, hogy valóban képesek a Sox trió tagjainak kötésére, melyek közül a Sox9-et preferálják, így valószínűleg a matrilin-1 gén expressziójának szabályozásában hasonló mechanizmusok is szerepet játszhatnak, mint az említett gének esetében.

A Pe1 elem esetében a Sox-kötő motívum mutációja (Pe1M1) kevesebb, mint tizedére csökkentette a hosszú promoter, és felére a Col2a1 enhancer és a rövid promoter által irányított konstrukció aktivitását tranziens expressziós kísérletekben. A két Sox motívumot elválasztó spacer régiót érintő mutáció (Pe1M4) pedig ~40%-os aktivitáscsökkenést okozott. Ez a csökkenés minden esetben csak a chondrocyta kultúrában volt megfigyelhető, míg a porcfejlődés korai stádiumát reprezentáló HDM és a *matrilin-1*-et nem expresszáló CEF kultúrákban nem. Tehát a Pe1 elemhez kötődő Sox faktorok döntő szerepet játszanak a gén szövetspecifikus expressziójához. Mivel a Pe1M4 mutációt hordozó transzgenikus egerek (Δ Pe1M4-TR70) hisztokémiai analízise során azt tapasztaltuk, hogy az expresszió minden fejlődő vázelemben magas szintű és az intakt hosszú promotert tartalmazó transzgénhez (TR70) hasonlóan zonális [107], viszont a végtagváz elemeiben elvesztette proximo-disztális irányultságát, valószínű, hogy a Pe1 elemhez kötődő másik faktor lehet felelős a végtagváz proximális struktúráiban az expresszió gátlásáért. Ez lehet egy morfogén, vagy egy transzkripció faktor, ami a Sox faktorokkal kölcsönhatva vesz részt a szabályozásban.

Mivel az eukarióta gének szabályozására általánosan jellemző, hogy különböző aktiváló és gátló faktorok együttműködésére van szükség a megfelelő térbeli és időbeli kifejeződéshez, a matrilin-1 gén esetében is hasonló mechanizmust feltételezünk. Valószínű, hogy a rövid promoter és a távoli promoter régiók szabályozó elemeihez kötődő Sox faktorok egymással és más fehérjékkel együttműködve szabályozzák a gén expresszióját. Ez azért is valószínű, mert a fehérjék HMGB domént tartalmazó csoportjába tartozó Sox trió tagjai is úgy fejtik ki szabályozó szerepüket, hogy a DNS-hez kötődve meghajlítják azt, lehetőséget biztosítva ezzel partnerfaktoraiknak a kötődéshez [79]. A

Sox9-nek számos partner faktora ismert, ilyen például az LcMaf, a PGC1 α , illetve a Scleraxis, melyekkel együtt a Col2a1 gén szabályozásában vesz részt [118-120].

A különböző faktorok együttműködését alátámasztó másik tény, hogy a *matrilin-1* rövid promoterén található SI és SII elemek funkcionális Nf κ B kötőhelyeket is tartalmaznak, melyek szintén tagjai a promoteren összeszerelődő PIC-nek [105,114]. A csoportban végzett újabb kísérletek ezek szerepét igazolják a Sox9 aktiváló hatásának közvetítésében. A komplexnek része lehet még az aggregán promoter-kötő fehérje (APBP), mely chondrocytákban *in vitro* kötődik a Pe1 elemhez. Hasonlóan az aggregán promoterhez, ahol az APBP felismerőhelye több példányban, elszórtan helyezkedik el a szekvencián [121], a *matrilin-1* szekvenciában is számos APBP kötőhely található a Pe1 elemén kívül is. Mivel az APBP kötődése az aggregán promoterhez gátolja a gén transzkripcióját [121], feltételezhető, hogy a *matrilin-1* szabályozásában is hasonló módon vehet részt.

Ismert az is, hogy a *Col2a1* és *Col11a2* gének porcspecifikus enhancerében is található invertált Sox motívumok, de a Pe1-hez hasonló konzervált blokk jelenléte, illetve a konszenzus Sox motívummal ilyen mértékben való megegyezés egyik génre sem jellemző [122,123].

Úgy gondoljuk, hogy a Pe1 elem nem enhancerként működve irányítja a magas szintű porcspecifikus expressziót, hiszen az intakt Pe1 elemet tartalmazó rövid promoter által irányított konstrukció meglehetősen alacsony aktivitást mutatott, illetve a Pe1 elem több példányának jelenlétében sem nőtt a minimál promoter aktivitása [80]. Sokkal inkább a távoli promoter és introni elemek hatását közvetíti azáltal, hogy velük és a hozzájuk kötődő transzkripciós faktorokkal multiprotein komplexet képez.

A rövid promoter másik, kevésbé konzervált motívuma az Ine elem. Korábbi kísérletekkel összhangban igazoltuk, hogy az Ine elem is képes Sox faktorokat kötni *in vitro* [111], viszont a Sox trió tagjai közül az L-Sox5 és Sox6 kötődik nagyobb affinitással. A Sox kötőhelyekben bekövetkezett mutációk ebben az esetben is jelentős mértékben csökkentették a gén aktivitását mind transziens expressziós, mind transzgenikus egér kísérletekben. A legdrámaibb hatást az Ine elem 5' Sox kötőhelyének mutációja okozta (Δ IneM1-TR70), mely ugyan nagymértékben lecsökkentette a transzgén aktivitását, de a zónafüggést és a proximo-disztális irányítottságot nem befolyásolta. Tehát a Pe1 elem mellett az Ine-hez kötődő Sox faktorok jelenléte is feltétele a megfelelő mértékű és mintázatu génexpresszióknak. A Sox motívumok és más faktorok kötőhelyeinek a TATA-box közvetlen környezetében való csoportosulása nem jellemző más porcfehérje gének szabályozó régióira.

A Pe1 és Ine elemek Sox motívumainak szerepére vonatkozó eredményeinket megerősítik a csoportban időközben elvégzett kotranszfekciós kísérletek. Ezek szerint a Sox9 kötődése a Pe1 elemhez kulcsfontosságú a távoli elemek aktiváló hatásának közvetítésében. A Sox9 által közvetített aktiválást szinergista és dóziszfüggő módon befolyásolja az L-Sox5/Sox6, valamint Nfi faktorok is.

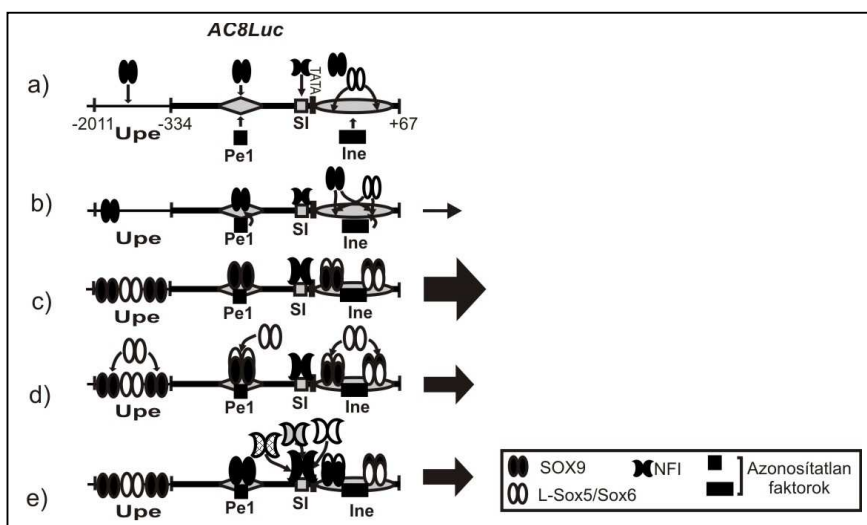
A proximális promoteren lévő konzervált, szövetspecifikus szabályozó elemek jelenléte egyedi tulajdonsága a matrilin-1 génnek, mivel egyéb porc mátrix fehérjéket kódoló gének (*Col9a1*, *Col9a2*, *Col11a2*, *CD-Rap*, *Agc1*) esetében a proximális promoter régióban nem írtak le porcspecifikus szabályozó elemeket [122-124].

Adataink alapján nyilvánvaló, hogy a Sox trió más porc mátrix génekétől (*Col2a1*, *Agc1*, *Crtl1*) eltérő módon szabályozza a matrilin-1 gén expresszióját. Míg ezek aktiválásának elégséges feltétele a Sox9 kötődése [91,96,125], addig a *matrilin-1* esetében szükség van a trió másik két tagjára is. Ahogy például a *COMP* promoter esetében, úgy a matrilin-1 gén aktiválásában is a Sox5 és Sox6 együttműködik a Sox9-cel. Csoportunkban a Sox trió tagjaival végzett kotranszfekciós kísérletek is alátámasztják, hogy a porcfejlődés korai szakaszában, amikor az L-Sox5/Sox6 a Sox9-hez képest alacsonyabb moláris arányban van jelen, szabályozza a *matrilin-1* promoter aktivitását azáltal, hogy elősegíti a Sox9 transzaktivációját. A chondrogenézis későbbi stádiumaiban viszont, amikor az L-Sox5/Sox6 nagy moláris feleslegben van a Sox9-hez képest, a transzaktiváció gátlásával csökkenti a promoter aktivitását. Hasonló együttműködés figyelhető meg a Sox9 és a *matrilin-1* promoter konzervált Nfi kötőhelyeit elfoglaló különböző Nfi izoformák között. Az Nfi fehérjék szintén mennyiségüktől függően növelik, vagy csökkentik a Sox9 transzaktivációját.

A jelen dolgozatban tárgyalt eredmények és a csoportunkban előzőleg, illetve párhuzamosan végzett *in vivo* és *in vitro* kísérletek eredményei alapján egy modellt állítottunk fel a matrilin-1 gén egyedi, szövet- és fejlődési állapot-specifikus kifejeződését szabályozó mechanizmusára (30. ábra). Hipotézisünk szerint a gén rövid és proximális promoterén modulárisan elhelyezkedő szabályozó elemek vesznek részt az expresszió irányításában. A porcfejlődés kezdeti szakaszában a Sox és Nfi fehérjéknek valószínűleg abban van szerepe, hogy a kromatin struktúra felnyitásával a TATA-box és környéke hozzáférhető legyen. Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, hogy *in vivo* footprint kísérletekben a nem expresszáló CEF sejtekben a rövid promoterhez nem kötődtek fehérjék, de a porcsejteké differenciálódó HDM kultúrában a rövid promoter fokozatosan kezdett védetté válni. Mivel az Nfi fehérjék képesek a hisztonokhoz kapcsolódni

[126,127], valószínű, hogy a nukleoszóma struktúra fellazításával járulnak hozzá a matrilin-1 gén aktiválódásához.

A chondrogenézis korai szakaszában a Sox9 a Pe1 elemhez kötődik. Ennek a kötődésnek a hatékonyságát az L-Sox5/Sox6 növeli, melyek ekkor a Sox9-hez képest kisebb mennyiségben vannak jelen. Valószínű, hogy a Sox faktorok kötődése a TATA-box közelében meghajlítja a DNS-t, ezáltal lehetőséget biztosít a PIC összeszerelődésére. A DNS konformációváltozása elősegítheti a Pe1 és Ine elemekhez eddig azonosítatlan faktorok (Sox partner faktorok) kötődését is. Az Ine elemen lévő Sox kötőhelyeket elfoglaló L-Sox5/Sox6 stabilizálja a Sox9-et a Pe1 elemen. Ez az elem központi szerepet játszik a PIC és az enhanceoszóma összeszerelődésében, illetve a távoli szabályozó elemek hatásának közvetítésében, de az SI-hez (és feltehetően az SII elemhez is) kötődő Nfi faktorok is jelentős mértékben hozzájárulnak e multiprotein komplexek kialakulásához. A promoter aktivitása a késői proliferatív porcsejtekben a legmagasabb, amikor a kulcsszerepeket játszó Pe1 és Ine elemeken a résztvevő Sox faktorok kötődése optimális. Ebben a stádiumban a nagy mennyiségben jelenlévő L-Sox5/Sox6 akadályozza a Sox9 transzaktivációt, feltehetően úgy, hogy a Sox faktorok a Pe1 és más elemeken lévő Sox kötőhelyekért versengenek, valamint az Ine elem Sox kötőhelyeinek teljes lefedettsége fizikailag gátolhatja a PIC működését. A későbbi stádiumokban lecsökkent transzkripciós aktivitáshoz az is hozzájárulhat, hogy a gátló Nfi izoformák foglalják el kötőhelyeiket a szabályozó elemeken, megakadályozva ezzel a TBP TATA-boxhoz való kötődését [80,114].



29. ábra Sox és Nfi faktorok szabályozzák a matrilin-1 promoter aktivitását. A chondrogenézis korai szakaszában (a) a Sox9 kötődik a Pe1 és Ine elemekhez. A korai (b) és késői (c) proliferatív chondroblastokban nő a kötőhelyek telítettsége. A porcfejlődés késői stádiumában az L-Sox5/Sox6 (d) és gátló Nfi izoformák (e) foglalják el a kötőhelyeket.

A felvázolt modellt igazolják a gén távoli DNS elemeinek funkcionális vizsgálatára irányuló kísérleteink is.

Tranziens expressziós és transzgenikus egér kísérletekben behatároltuk a távoli DNS elemeket, melyeknek szerepük van a *matrilin-1* gén transzkripció szabályozásában. A távoli promoter régió még két, az emlős és csirke gének között kisebb mértékű homológiát mutató elemet tartalmaz (Dpe1 és Dpe2) [80]. A Dpe1 elem tartalmaz egy motívumot, mely az L-Sox5, Sox6 transzkripció faktorok kötőhelyével nagymértékben megegyezik [110]. A Dpe2 elem pedig a GACACAGAGAA rendkívül konzervált motívumot tartalmazza, mely egyetlen ismert transzkripció faktor kötőhelyével sem mutat homológiát. Ezek az elemek is meghatározóak a *matrilin-1* jellemző kifejeződési mintázatának kialakításában. Tranziens expressziós és transzgenikus egér kísérleteink alátámasztották, hogy a Dpe1 elem igen erős aktiváló hatású, mivel nyolc kópiája és a rövid promoter által irányított transzgén (8xDpe1-NAD1) erőteljes porcspecifikus és proximo-disztális aktivitást mutatott. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy bár a Sox trió kötőhelyei egymástól távol helyezkednek el a *matrilin-1* gén szabályozó régióban, a köztük lévő interakció feltétele a megfelelő szintű és mintázatú génexpresszió. Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, hogy a Sox9 egyedül nem képes a *matrilin-1* gén aktiválására, csak a Sox5 és Sox6 jelenlétében [92]. Csoportunkban párhuzamosan végzett QRT-PCR kísérletek adatai is ezt a feltevést erősítik, mivel *in vitro* chondrogenézis során a Sox6 mRNS szint a *matrilin-1* gén aktiválódásakor emelkedett meg, utalva a Sox6 szabályozásban betöltött szerepére.

A Dpe1 elemmel ellentétben a Dpe2 elem erőteljes gátló hatású, mivel tranziens expressziós kísérletekben még a több kópiában jelenlévő Dpe1 hatását is csökkenteni tudta. Érdekes módon a Dpe2 elem deléciója (Δ Dpe2-TR70) transzgenikus egerekben megszüntette a végtagvázban a génkifejeződés proximo-disztális irányultságát, azt valószínűsítve, hogy ehhez az elemhez olyan transzkripció faktor, vagy morfogén kötődik, mely ezekben a struktúrákban represszálo hatású.

A *matrilin-1* génre egyedileg jellemző szabályozó mechanizmus felderítésével hozzájárulhatunk más porc mátrix gének szabályozásának pontosabb megértéséhez is, illetve olyan zónaspecifikus vektorok kialakításához, melyek hasznos eszközei lehetnek a vázrendszeri megbetegedések gyógyításának. Eredményeinkkel közelebb kerültünk a szabályozó mechanizmus pontos leírásához, de ez még korántsem jelenti a folyamat minden részletének ismeretét. A további vizsgálatok célja a Sox faktorokkal együttműködő fehérjék azonosítása és kötőhelyeik meghatározása.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Munkámat az MTA Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézet Kötőszövet csoportjában végeztem. Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Kiss Ibolyának, hogy lehetőséget nyújtott a csoportjában végzett munkához, azt figyelemmel kísérte és irányította.

Köszönöm továbbá a csoport többi tagjának a munkám során nyújtott segítségüket és barátságukat.

Karcagi Ildikónak és Dr. Kénesi Erzsébetnek a módszertani tanácsokat és a „terelgetést”. Dr. Sinkó Ildikónak és Dr. Molnár Annának a mikroinjektálást és az egerek tesztelésében nyújtott segítségüket. Simonné Anikónak, Kravjár Ildikónak, Horváth Zsoltnénak és Kávai Klaudiának a nélkülözhetetlen technikai segítséget. Dr. Deák Ferencnek a hasznos tanácsokat. Dr. Korpos Évának a hisztológiai munkával kapcsolatos tanácsait. Dr. Otgonchimeg Rentsendorjnak és Szénási Tibornak az EMSA kísérletekben nyújtott segítségüket. Dr. Hunyadi-Gulyás Évának, az SZBK Proteomikai Laboratórium munkatársának a fehérjék azonosítását. Tóthné Marikának az ábrák elkészítésében nyújtott óriási segítségét.

Nem utolsó sorban a családomnak tartozom köszönettel a folyamatos és sokszor erőn felüli támogatásukért.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Gosline J, Lillie M, Carrington E, Guerette P, Ortlepp C, Savage K. (2002) Elastic proteins: biological roles and mechanical properties. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **28;357(1418)**, 121-32. Review
2. Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Tzanakakis, G. N. and Karamanos, N. K. (2010) Proteoglycans in health and disease: novel roles of proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting. *FEBS J* **277**, 3904-3923. Minireview
3. Comper, W. D. (1996) *Extracellular Matrix*. Crc Press
4. Eyre, D. (2002) Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res* **4**, 30-35.
5. Deák, F., Wagener, R., Kiss, I. and Paulsson, M. (1999) The matrilins: a novel family of oligomeric extracellular matrix proteins. *Matrix Biol.* **18**, 55-64.
6. Wagener, R., Ehlen, H. W. A., Ko, Y. P., Kobbe, B., Mann, H. H., Sengle, G., Paulsson, M. (2005) The matrilins- adaptor proteins in the extracellular matrix. *FEBS Lett* **579**, 3323-3329. Minireview
7. Klatt, A. R., Becker, A. K. A., Neacsu, C. D., Paulsson, M., Wagener, R. (2011) The matrilins: Modulators of extracellular matrix assembly. *Int J Biochem Cell Biol* **43**, 320-330.
8. Segat, D., Nitsche, P. D., Klatt, A. R., Piecha, D., Korpos, E., Deák, F., Wagener, R., Paulsson, M. and Smyth. N. (2000) Expression of matrilin-1, -2 and -3 in developing mouse limbs and heart. *Matrix Biol.* **19**, 649-655.
9. Paulsson, M. and Heinegard, D. (1979) Matrix proteins bound to associatively prepared proteoglycans from bovine cartilage. *Biochem. J.* **183**, 539–545.
10. Klatt, A. R., Paulsson, M., Wagener, R. (2002) Expression of matrilins during maturation of mouse skeletal tissues. *Matrix Biol* **21**, 289-296.
11. Tsonis, P. A. and Goetinck, P. F. (1988) Expression of cartilage-matrix genes and localization of their translation products in the embryonic chick eye. *Exp Eye Res.* **46**, 753-64.
12. Chen, Q., Johnson, D. M., Haudenschild, D. R., Tondravi, M. M., and Goetinck, P. F. (1995) Cartilage matrix protein forms a type II collagen-independent filamentous network: analysis in primary cell cultures with a retrovirus expression system. *Mol. Biol. Cell* **6**, 1743-1753.

13. Muratoglu, S., Bachrati, C., Malpeli, M., Szabó, P., Neri, M., Dozin, B., Deák, F., Cancedda, R. and Kiss, I. (1995) Expression of the cartilage matrix protein gene at different chondrocyte developmental stages. *Eur J Cell Biol.* **68**, 411-8.
14. Szűts, V., Möllers, U., Bittner, K., Schürmann, G., Muratoglu, S., Deák, F., Kiss, I. and Bruckner, P. (1998) Terminal differentiation of chondrocytes is arrested at distinct stages identified by their expression repertoire of marker genes. *Matrix Biol.* **17**, 435-448.
15. Argraves, W. S., Deak, F., Sparks, K. J., Kiss, I. and Goetinck, P. F. (1987) Structural features of cartilage matrix protein deduced from cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **84**, 464-468.
16. Hauser, N. and Paulsson, M. (1994) Native cartilage matrix protein (CMP): a compact trimer of subunits assembled via a coiled-coil alpha-helix. *J Biol Chem.* **269**, 25747-53.
17. Wu, J. J. and Eyre, D. R. (1998) Matrilin-3 forms disul.de-linked 490 oligomers with matrilin-1 in bovine epiphyseal cartilage. *J. Biol. Chem.* **273**, 17433-17438.
18. Frank, S., Schulthess, T., Landwehr, R., Lustig, A., Mini, T., Jenó, P., Engel, J. and Kammerer, R.A. (2002) Characterization of the matrilin coiled-coil domains reveals seven novel isoforms. *J. Biol. Chem.* **277**, 19071–19079.
19. Hauser, N., Paulsson, M., Heinegard, D. and Mörgelin, M. (1996) Interaction of cartilage matrix protein with aggrecan: Increased covalent cross-linking with tissue maturation. *J. Biol. Chem.* **271**, 32247-32252.
20. Winterbottom, N., Tondravi, M. M., Harrington, T. L., Klier, F. G., Vertel, B. M., and Goetinck, P. F. (1992) Cartilage matrix protein is a component of the collagen fibril of cartilage. *Dev. Dyn.* **193**, 266-276.
21. Makihiro, S., Yan, W., Ohno, S., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Okimura, A., Yoshida, E., Noshiro, M., Hamada, T. and Kato, Y. (1999) Enhancement of cell adhesion and spreading by a cartilage-specific noncollagenous protein, cartilage matrix protein (CMP/Matrilin-1), via integrin $\alpha 1 \beta 1$. *J Biol Chem.* **274**, 11417-23.
22. Huang, X., Birk, D. E. and Goetinck, P. F. (1999) Mice lacking matrilin-1 (cartilage matrix protein) have alterations in type II collagen fibrillogenesis and fibril organization. *Dev. Dyn.* **216**, 434-441.
23. Aszódi, A., Bateman, J. F., Hirsch, E., Baranyi, M., Hunziker, E. B., Hauser, N., Bosze, Z. and Fässler, R. (1999) Normal skeletal development of mice lacking

- matrilin-1: redundant function of matrilins in cartilage. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 7841–7845.
24. Chen, Q., Zhang, Y., Johnson, D. M., Goetinck, P. F. (1999) Assembly of a novel cartilage matrix protein filamentous network: molecular basis of differential requirement of von Willebrand factor A domains. *Mol Biol Cell* **10**, 2149-2162.
 25. Aszódi, A., Hauser, N., Studer, D., Paulsson, M., Hiripi, L., and Bosze, Z. (1996) Cloning, sequencing and expression analysis of mouse cartilage matrix protein cDNA. *Eur. J. Biochem.* **236**, 970-977.
 26. Hall, B. K., Miyake, T. (1992) The membranous skeleton: the role of cell condensations in vertebrate skeletogenesis. *Anat Embryol* **186**(2), 107-124. Review
 27. Olsen, B. R., Reginato, A. M. and Wang, W. (2000) Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **16**, 191-220. Review
 28. Goldring, M. B., Tsuchimochi, K., Ijiri, K. (2006) The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* **97**, 33-44.
 29. Zelzer, E., McLean, W., Ng, Y., Fukail, N., Reginatol, A. M., Lovejoy, S., D'Amore, P. A., Olsen, B. R. (2002) Skeletal defects in VEGF^{120/120} mice reveal multiple roles of VEGF in skeletogenesis. *Development* **129**, 1893-1904.
 30. Ballock, R. T., O'Keefe, R. J. (2003) The biology of the growth plate. *J Bone Joint Surg Am* **85**, 715-726. Review
 31. Farnum C. E. and Wilsman, N. J. (1998) Effects of distraction and compression on growth plate function, in *Skeletal Morphogenesis and Growth*. J.A. Buckwalter, et al., eds. American Academy of Orthopaedic Surgeons, Rosemont, IL. 517-532.
 32. Sergerie K, Lacoursière MO, Lévesque M, Villemure I. (2009) Mechanical properties of the porcine growth plate and its three zones from unconfined compression tests. *J Biomech.* **11;42**(4), 510-516.
 33. Breur, G. J., VanEnkevort, B. A., Farnum, C. E. and Wilsman, N. J. (1991) Linear relationship between the volume of hypertrophic chondrocytes and the rate of longitudinal bone growth in growth plates. *J Orthop Res.* **9**, 348-59.
 34. Chung, U. I., Schipani, E., McMahon, A. P., Kronenberg, H. M. (2001) Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development. *J Clin Invest* **107**, 295-304.
 35. Kronenberg, H.M. (2006) PTHrP and skeletal development. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1068**, 1-13.

36. Lee, H., Lanske, B., Karaplis, A. C., Deeds, J. D., Kohno, H., Nissenson, R. A. et al. (1996) Parathyroid hormone-related peptide delays terminal differentiation of chondrocytes during endochondral bone development. *Endocrinology* **137**(11), 5109-5118.
37. Kobayashi, T., Chung, U. I., Schipani, E., Starbuck, M., Karsenty, G., Katagiri, T., Goad, D. L., Lanske, B., Kronenberg, H. M. (2002) PTHrP and Indian hedgehog control differentiation of growth plate chondrocytes at multiple steps. *Development (Camb)* **129**, 2977-2986.
38. Karaplis, A. C., He, B., Nguyen, M. T., Young, I. D., Semeraro, D., Ozawa, H. et al. (1998) Inactivating mutation in the human parathyroid hormone receptor type 1 gene in Blomstrand chondrodysplasia. *Endocrinology* **139**(12), 5255-5258.
39. Schipani, E., Kruse, K., Juppner, H. (1995) A constitutively active mutant PTH-PTHrP receptor in Jansen-type metaphyseal chondrodysplasia. *Science* **268**(5207), 98-100.
40. Ornitz, D. M. and Marie, P. J. (2002) FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev.* **16**, 1446–1465.
41. Ornitz, D. M. (2005) FGF signaling in the developing endochondral skeleton. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**(2), 205-213.
42. Mackie, E. J., Ahmed, Y. A., Tatarczuch, L., Chen, K.-S., Mirams, M. (2008) Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 46-62.
43. Zou H, Choe KM, Lu Y, Massagué J, Niswander L. (1997) BMP signaling and vertebrate limb development. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **62**, 269-72. Review
44. Yoon, B. S., Lyons, K. M. (2004) Multiple functions of BMP in chondrogenesis. *J Cell Biochem* **93**, 93-103.
45. Minina, E., Kreschel, C., Naski, M. C., Ornitz, D. M., Vortkamp, A. (2002) Interaction of FGF, Ihh/PTH1h, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Dev Cell* **3**, 439-449.
46. Minina, E., Wenzel, H. M., Kreschel, C., Karp, S., Gaffield, W., McMahon, A. P. et al. (2001) BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* **128**(22), 4523-4534.

47. Akiyama, H., Lyons, J. P., Mori-Akiyama, Y., et al. (2004) Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev* **18**, 1072–1087.
48. Hill, T. P., Spater, D., Taketo, M. M., Birchmeier, W., Hartmann, C. (2005) Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell* **8**, 727-738.
49. Yang, Y., Topol, L., Lee, H., Wu, J. (2003) Wnt5a and Wnt5b exhibit distinct activities in coordinating chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* **130**(5), 1003-1015.
50. Mak, K. K., Chen, M. H., Day, T. F., Chuang, P. T., Yang, Y. (2006) Wnt/beta-catenin signaling interacts differentially with Ihh signaling in controlling endochondral bone and synovial joint formation. *Development* **133**(18), 3695-3707.
51. Duboc, V. and Logan, M.P.O. (2009) Building limb morphology through integration of signalling modules. *Curr Op Genet Dev* **19**, 497-503.
52. Tabin, C.J., Wolpert, L. (2007) Rethinking the proximodistal axis of the vertebrate limb in the molecular era. *Genes Dev* **21**, 1433-1442.
53. Tarchini, B., Duboule, D., Kmita, M. (2006) Regulatory constraints in the evolution of the tetrapod limb anterior-posterior polarity. *Nature* **443**, 985-988.
54. Zakany, J., Duboule, D. (2007) The role of Hox genes during vertebrate limb development. *Curr Op Genet Dev* **17**, 359-366.
55. McGlinn, E., Tabin, C.J. (2006) Mechanistic insight into how Shh patterns the vertebrate limb. *Curr Op Genet Dev* **16**, 426-432.
56. Mariani, F.V., Ahn, C.P., Martin, G.R. (2008) Genetic evidence that FGFs have an instructive role in limb proximal-distal patterning. *Nature* **453**, 401-405.
57. Riddle, R.D., Ensini, M., Nelson, C., Tsuchida, T., Jessell, T.M., Tabin, C.J. (1995) Induction of the LIM homeobox gene *Lmx1* by WNT7a establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb. *Cell* **83**, 631-640.
58. Yang, Y., Niswander, L. (1995) Interaction between the signaling molecules WNT7a and SHH during vertebrate limb development: dorsal signals regulate anteroposterior patterning. *Cell* **80**, 939-947.
59. Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., Richmond, T. J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2,8 Å resolution. *Nature* **389**, 251-260.

60. Happel, N. and Doenecke, D. (2009). Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function. *Gene* **431**, 1-12.
61. Zhang, L., Eugeni, E.E., Parthun, M.R. & Freitas, M.A. (2003) Identification of novel histone post-translational modifications by peptide mass fingerprinting. *Chromosoma* **112**, 77–86.
62. Ehrenhofer-Murray, A.E. (2004) Chromatin dynamics at DNA replication, transcription and repair. *Eur. J. Biochem.* **271**, 2335–2349.
63. Shilatifard, A., Conaway, R.C. & Conaway, J.W. (2003) The RNAPolymerase II elongation complex. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 693–715.
64. Struhl, K., Kadosh, D., Keaveney, M. et al. (1998) Activation and repression mechanisms in yeast. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **63**, 413-421.
65. Riethoven, J. J. M. (2010) Regulatory regions in DNA: Promoters, enhancers, silencers, and insulators. I. Ladunga (ed), *Computational Biology of Transcription Factor Binding, Methods in Molecular Biology* 674, doi 10.1007/978-1-60761-854-6_3 Chapter 3.
66. Sandelin, A., Carninci, P., Lenhard, B. et al. (2007) Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. *Nature Genet* **8**, 424-436.
67. Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S. et al. (2005) The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* **309**, 1559-1563.
68. Levine, M., and Tjian, R. (2003) Transcription regulation and animal diversity. *Nature* **424**, 147-151.
69. Butler, J. E. F. and Kadonaga, J. T. (2001) Enhancer-promoter specificity mediated by DPE or TATA core promoter motifs. *Genes Dev* **15**: 2515-2519.
70. Lettice, L. A., Heaney, S. J. H., Purdie, L. A., Li, L., de Beer, P., Oostra, B. A., Goode, D., Elgar, G., Hill, R. E. and de Graaff, E. (2003) A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. *Hum Mol Genet* **15**, 1725-35.
71. Lettice, L. A., Hill, A., E., Devenney, P. S. et al (2008) Point mutations in a distant sonic hedgehog cis-regulator generate a variable regulatory output responsible for preaxial polydactyly. *Hum Mol Genet* **17**, 978-985.
72. Ogbourne, S. and Antalis, T. M. (1998) Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochemistry* **331**, 1-14.
73. Gazner, M. and Felsenfeld, G. (2006) Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat Genet* **7**, 703-713.

74. Stros, M. (2009) HMG proteins: Interactions with DNA and chromatin. *Biochim Biophys Acta* **1799**, 101-113. Review
75. Agresti, A., Bianchi, M. E. (2003) HMG proteins and gene expression. *Cur Op Gen Dev* **13**, 170-178.
76. Gordon, J. W., Scangos, G. A., Plotkin, D. J., Barbosa, J. A., Ruddle, F. H. (1980) Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(12), 7380-7384.
77. Whitelaw, C. B., Archibald, A. L., Harris, S., McClenaghan, M., Simons, J. P., Clark, A. J. (1991) Targeting expression to the mammary gland: intronic sequences can enhance the efficiency of gene expression in transgenic mice. *Transgenic Res* **1**(1), 3-13.
78. Wegner, M. (1999) From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res.* **27**, 1409-20. Review
79. Kiefer, J. C. (2007) Back to basics: Sox genes. *Dev Dyn* **236**, 2356-2366.
80. Rentsendorj, O., Nagy, A., Sinkó, I., Daraba, A., Barta, E., Kiss, I. (2005) Highly conserved proximal promoter element harbouring paired Sox9-binding sites contributes to the tissue- and developmental stage-specific activity of the matrilin-1 gene. *Biochem J* **389**, 705-716.
81. Bi, W., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R., de Crombrughe, B. (1999) Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* **22**, 85-89.
82. Akiyama, H. (2008) Control of chondrogenesis by the transcription factor Sox9. *Mod Rheumatol* **18**, 213-219. Review
83. Foster, J. W., Dominguez-Steglich, M. A., Guioli, S., et al. (1994) Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* **372**, 525-530.
84. Bi, W., Huang, W., Whitworth, D. J., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R. and de Crombrughe, B. (2001) Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 6698-6703.
85. Akiyama, H., Chaboissier, M. C., Martin, J. F., et al. (2002) The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* **16**, 2813-2828.

86. Murakami, S., Kan. M., McKeehan, W. L. and de Crombrughe, B. (2000) Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 1113-1118.
87. Huang, W., Chung, U. I., Kronenberg, H. M. and de Crombrughe, B. (2001) The chondrogenic transcription factor Sox9 is a target of signalling by the parathyroid hormone-related peptide in the growth plate of endochondral bones. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 160-165.
88. Murakami S, Lefebvre V, de Crombrughe B. (2000) Potent inhibition of the master chondrogenic factor Sox9 gene by interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem.* **275(5)**, 3687-92.
89. Yu, Z., Xu, N., Wang, W., Pan, S., Li, K., Liu, J. (2009) Interleukin-1 inhibits Sox9 and collagen type II expression via nuclear factor- κ B in the cultured human intervertebral disc cells. *Chinese Medical Journal* **122(20)**, 2483-2488.
90. Tsuda, M., Takahashi, S., Takahashi, Y. and Asahara, H. (2003) Transcriptional co-activators CREB-binding protein and p300 regulate chondrocyte-specific gene expression via association with Sox9. *J Biol Chem* **278**, 27224-29.
91. Lefebvre, V., Li, P. and de Crombrughe, B. (1998) A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J.* **17**, 5718-33.
92. Smits, P., Li, P., Mandel, J., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., de Crombrughe, B. and Lefebvre, V. (2001) The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev Cell.* **1**, 277-290.
93. Takamatsu N, Kanda H, Tsuchiya I, Yamada S, Ito M, Kabeno S, Shiba T, Yamashita S. (1995) A gene that is related to SRY and is expressed in the testes encodes a leucine zipper-containing protein. *Mol Cell Biol.* **15**, 3759-66.
94. Komatsu N, Hiraoka Y, Shiozawa M, Ogawa M, Aiso S. (1996) Cloning and expression of *Xenopus laevis* xSox12 cDNA. *Biochim Biophys Acta.* **1;1305**, 117-9.
95. Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, de Crombrughe B. (1997) SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro α 1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol* **17**, 2336-46.
96. Lefebvre, V., Li, P. and de Crombrughe, B. (1998) A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J.* **17**, 5718-33.

97. Genzer, M. A., Bridgewater, L. C. (2007) A Col9a1 enhancer element activated by two interdependent SOX9 dimers. *Nucleic Acid Res* **35**, 1178-86.
98. Bridgewater, L. C., Lefebvre, V. and de Crombrughe, B. (1998) Chondrocyte-specific enhancer elements in the Col11a2 gene resemble the Col2a1 tissue-specific enhancer. *J Biol Chem* **273**, 14998-15006.
99. Jenkins, E., Moss, J. B., Pace, J. M., Bridgewater, L. C. (2005) The new collagen gene COL27A1 contains SOX9-responsive enhancer elements. *Matrix Biol* **24**, 177-184.
100. Sekiya, I., Tsuji, K., Koopman, P., Watanabe, H., Yamada, Y., Shinomiya, K., Nifuji, A. and Noda, M. (2000) SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6. *J Biol Chem* **275**, 10738-10744.
101. Xie, W. F., Zhang, X., Sakano, S., Lefebvre, V. and Sandell, L. J. (1999) Trans-activation of the mouse cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein gene by Sox9. *J Bone Miner. Res* **14**, 757-763.
102. Bernard P, Tang P, Liu S, Dewing P, Harley VR, Vilain E. (2003) Dimerization of SOX9 is required for chondrogenesis, but not for sex determination. *Hum Mol Genet* **15**, 1755-1765.
103. Kiss, I., Deák, F., Holloway, R. G., Delius, H., Mebust, K. A., Frimberger, E., Argraves, W., S., Tsonis, P. A., Winterbottom, N. and Goetnick, nP. F. (1989) Structure of the gene for cartilage matrix protein, a modular protein of the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* **264**, 8126-8134.
104. Kiss, I., Bösze, Z., Szabó, P., Rencendorj, A., Barta, E. and Deák, F. (1990) Identification of positive and negative regulatory regions controlling expression of the cartilage matrix protein gene. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 2432-36.
105. Szabó, P., Moitra, J., Rencendorj, A., Rákhely, G., Rauch, T. and Kiss, I. (1995) Identification of a nuclear factor-I family protein-binding site in the silencer region of the cartilage matrix protein gene. *J. Biol. Chem.* **270**, 10212–10221.
106. Aszódi A, Módis L, Páldi A, Rencendorj A, Kiss I, Bösze Z. (1994) The zonal expression of chicken cartilage matrix protein gene in the developing skeleton of transgenic mice. *Matrix Biol.* **14**, 181-90.
107. Karcagi, I., Rauch, T., Hiripi, L., Rentsendorj, O., Nagy, A., Bösze, Zs. and Kiss, I. (2004) Functional analysis of the regulatory regions of the matrilin-1 gene in

- transgenic mice reveals modular arrangement of tissue-specific control elements. *Matrix Biol.* **22**, 605-618.
108. Rauch, T. (2002) Cisz reguláló elemek szerepe a matrilin-1 gén transzkripció és poszt-transzkripció szabályozásában. Ph.D. disszertáció, Szegedi Tudományegyetem
 109. Zhou, G., V. Lefebvre, Z. Zhang, H. Eberspaecher, and B. de Crombrughe (1998) Three high mobility group-like sequences within a 48-base pair enhancer of the *Col2a1* gene are required for cartilage-specific expression *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **273**, 14989-14997.
 110. Mertin, S., McDowall, S. G., Harley, V. R. (1999) The DNA-binding specificity of SOX9 and other SOX proteins. *Nucleic Acids Res* **27(5)**, 1359-64.
 111. Rentsendorj, O. (2006) Transcriptional regulation of the matrilin-1 gene. Ph.D disszertáció, Szegedi Tudományegyetem
 112. Uchikawa, M., Ishida, Y., Takemoto, T., Kamachi, Y., Kondoh, H. (2003) Functional analysis of chicken Sox2 enhancers highlights an array of diverse regulatory elements that are conserved in mammals. *Dev Cell* **4**, 509-519.
 113. Kamachi, Y., Uchikawa, M., Collignon, J., Lovell-Badge, R., Kondoh, H. (1998) Involvement of Sox1,2 and 3 in the early and subsequent molecular events of lens induction. *Development* **125**, 2521-2532.
 114. Nagy, A., Kénesi, E., Rentsendorj, O., Molnár, A., Szénási, T., Sinkó, I., Zvara, A., Thottathil Oommen, S., Barta, E., Puskás, L. G., Lefebvre, V., Kiss, I. (2011) Evolutionarily Conserved, Growth Plate Zone-Specific Regulation of the Matrilin-1 Promoter: L-Sox5/Sox6 and Nfi Factors Bound near TATA Finely Tune Activation by Sox9. *Mol Cell Biol* **31(4)**, 686-699.
 115. Furlong, E. E., Rein, T., Martin, F. (1996) YY1 and NF1 both activate the human p53 promoter by alternatively binding to a composite element, and YY1 and E1A cooperate to amplify p53 promoter activity. *Mol Cell Biol* **16**, 5933-5945.
 116. Ducy, P., Karsenty, G. (1995) Two distinct osteoblast-specific cis-acting elements control expression of a mouse osteocalcin gene. *Mol Cell Biol* **15**, 1858-1869.
 117. De Santa Barbara, P., Bonneaud, N., Boizet, B., Desclozeaux, M., Moniot, B., Sudbeck, P., Scherer, G., Poulat, F., Berta, P. (1998) Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone gene. *Mol Cell Biol* **11**, 6653-6655.

118. Furumatsu, T., Shukunami, C., Amemiya-Kudo, M., Shimano, H., Ozaki, T. (2010) Scleraxis and E47 cooperatively regulate the Sox9-dependent transcription. *Int J Biochem Cell Biol* **42**, 148-56.
119. Kawakami, Y., Tsuda, M., Takahashi, S., Taniguchi, N., Esteban, C.R., Zemmyo, M., Furumatsu, T., Lotz, M., Belmonte, J.C., Asahara, H. (2005) Transcriptional coactivator PGC-1 α regulates chondrogenesis via association with Sox9. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **15**, 2414-2419.
120. Huang, W., Lu, N., Eberspaecher, H. and de Crombrughe, B. (2002) A new long form of c-Maf cooperates with Sox9 to activate the type II collagen gene. *J. Biol. Chem.* **277**, 50668–50675.
121. Pirok, E. W., Domowicz, M. S., Henry, J., Wang, Y., Santore, M., Mueller, M. M., Schwartz, N.B. (2005) APBP-1, a DNA/RNA-binding protein, interacts with the chick aggrecan regulatory region. *J Biol Chem* **280**(42), 35606-16.
122. Zhou, G., Garofalo, S., Mukhopadhyay, K., Lefebvre, V., Smith, C. N., Eberspaecher, H., de Crombrughe, B. (1995) A 182 bp fragment of the mouse pro α 1(II) collagen gene is sufficient to direct chondrocyte expression in transgenic mice. *J Cell Sci* **108**, 3677-3684.
123. Tsumaki, N., Kimura, T., Matsui, Y., Nakata, K. and Ochi, T. (1996) Separable cis-regulatory elements that contribute to tissue- and site-specific α 2(XI) collagen gene expression in the embryonic mouse cartilage. *J. Cell Biol.* **134**, 1573–1582.
124. Xie, W. F., Zhang, X. and Sandell, L. J. (2000) The 2.2-kb promoter of cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein controls gene expression in cartilage and embryonic mammary buds of transgenic mice. *Matrix Biol.* **19**, 501–509.
125. Han, Y., Lefebvre, V. (2008) L-Sox5 and Sox6 drive expression of the aggrecan gene in cartilage by securing binding of Sox9 to a far-upstream enhancer. *Mol Cell Biol* **28**, 4999-5013.
126. Alevizopoulos, A. et al. (1995) A proline-rich TGF- β -responsive transcriptional activator interacts with histone H3. *Genes Dev* **9**, 3051-3066.
127. Gronostajski, R. M. (2000) Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development. *Gene* **249**, 31-45.
128. Oommen, S. T. (2006) Contribution of control elements to the cartilage-specific activity of the matrilin-1 promoter. *Proceedings of the ITC closing seminar, MTA Szegedi Biológiai Központ*

129. De Crombrugghe, B., Lefebvre, V., Nakashima, K. (2001) Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Curr Op Cell Biol* **13**, 721-727.
130. Gamma Sosa, M. A., De Gasperi, R., Elder, G. A. (2010) Animal transgenesis: an overview. *Brain Struct Funct* **214**, 91-109.

A TÉZISEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Bevezetés

A porcszövet a gerinces vázrendszer kialakulásában és működésében fontos szerepet betöltő szövettípus. Sejtes komponensei a chondrocyták, melyek a porcszövetre jellemző makromolekulákat termelik. Ezek a sejten kívüli térben egy jól szervezett, kiterjedt extracelluláris mátrixot (ECM) hoznak létre, amely meghatározza a szövet fizikai és kémiai tulajdonságait.

A gerincesek vázrendszerének nagy része endochondrális csontosodás útján alakul ki. Ebben a folyamatban a porcszövet egy átmeneti struktúra, amely végül teljes mértékben átalakul. Az endochondrális csontosodást szabályozó legfontosabb transzkripciós faktor a Sox9, amely már a mesenchyma sejtek kondenzációjához is nélkülözhetetlen. A Sox9 az L-Sox5/Sox6-tal és más partner faktoraival együtt irányítja a folyamatot.

A porcdifferenciálódás első lépése a mesenchyma sejtek kondenzációja. A kondenzáció központjában levő sejtek előbb prechondrocyttá, majd chondroblastokká fejlődnek, amik intenzíven osztódnak és elkezdik termelni a porcszövetre jellemző mátrix fehérjéket (II., IX., XI. típusú kollagén, aggregán). A periférián levő néhány sejtréteg fibroblaszt-szerű perichondriális sejté alakul. A chondroblastok gyorsan osztódnak, korai és késői proliferatív stádiumokon keresztülhaladva hipertróf porcsejteké differenciálódnak. Később kapillárisok lépnek a fejlődő csontba, amik az apoptózissal elhalt hipertróf sejteket eltávolító chondroclastokat és újabb differenciálatlan mesenchyma sejteket hoznak. A következő lépésben a mátrix mineralizálódik. Az epifízeális porcok felszíni rétege nem fejlődik csonttá, hanem ízületi porcként funkcionál életünk végéig.

Az epifízeális porc és a csontok hosszanti növekedése a felnőtt kor eléréséig a növekedési koronghoz köthető. Az itt lévő chondrocyták morfológiailag és génexpresszió alapján is elkülöníthető zónákba rendeződnek, melyek megfelelnek az embrionális porcfejlődési stádiumoknak. A diafizistől legtávolabb található a forrás chondrocyták zónája. Ezek a sejtek kicsik, azonos alakúak és gyorsan osztódnak. A következő zónát az oszlopos proliferatív porcsejtek alkotják, ezek lassabban osztódnak, oszlopokba rendeződnek, melyeken lefelé haladva az osztódás intenzitása csökken. A proliferációt követően a sejtek egy átmeneti prehipertróf zónába rendeződnek. Az epifízis-diafízis határhoz legközelebb eső, nagyobb méretű, szabálytalan alakú chondrocyták alkotják a

hipertróf zónát, melynek sejtjei X. típusú kollagén mátrixot termelve előmintázatot szolgáltatnak a belépő osteoblasztoknak a csontos mátrix kialakításához. Az endochondrális csontosodás minden lépésében az adott stádiumra jellemző markergének kifejeződése figyelhető meg.

A matrilin család tagjai olyan nem-kollagénszerű fehérjék, melyek a porcszövet sejtközi állományának felépítésében úgy vesznek részt, hogy kollagéntől függő és attól független finom hálózatokat alkotnak. Az ECM szerveződésében betöltött fontos szerepükre utal, hogy minden szövettípus sejtközi állományában előfordul a család egy, vagy több tagja.

A család közül elsőként azonosított tagja a matrilin-1. Más porcfehérjéktől eltérően, melyek már a korai proliferatív porcsejtekben termelődnek, a matrilin-1 csak a késői proliferatív stádiumú chondrocytákban termelődik. A gén expressziója *in vivo* a növekedési korong proliferatív és prehipertróf zónáira korlátozódik, így e zónák markergénjének tekinthető. A csirke matrilin-1 gén hosszú promotere transzgenikus egerekben a fejlődő hosszú csontok növekedési korongjának proliferatív és prehipertróf zónáiba irányítja az expressziót. A kifejeződési mintázatra jellemző még a proximo-disztális irányítottság.

Célkitűzések

Munkánk során arra kerestük a választ, hogy a gén korábban már azonosított szabályozó elemei közül melyik és milyen mértékben járul hozzá a szövet- és fejlődési állapotspecifikus kifejeződéshez, valamint hogy azonos, vagy különböző DNS szakaszok felelősek-e ezért a szabályozásért. A DNS elemek behatárolása mellett arra is kíváncsiak voltunk, hogy a *matrilin-1* transzkripciós szabályozása mennyiben azonos, illetve tér el más porc mátrix fehérjét kódoló génektől (pl. *Col2a1*).

Kísérleti stratégia

Kérdéseink megválaszolása érdekében a következő kísérleti stratégiát követtük. A már korábban leírt reguláló elemek különböző kombinációival riporter konstrukciókat hoztunk létre, melyek aktivitását tranziens expressziós kísérletekben különböző sejt kultúrákban vizsgáltuk. A riporter konstrukciók közül azokat választottuk ki, melyek hatással voltak a matrilin-1 gén szövet- és fejlődési állapotspecifikus expressziójára. Ezekkel a DNS elem kombinációkkal *LacZ* riporter konstrukciókat készítettünk, melyekkel transzgenikus egereket hoztunk létre, hogy hatásukat *in vivo* vizsgálhassuk. Az

injektálásból származó alapító, illetve a transzgenikus vonalaktól származó embriókban hisztológiai módszerekkel vizsgáltuk a génkifejeződés tér –és időbeli tulajdonságait. E kísérletek alapján behatároltuk a mintázatért felelős DNS elemeket. Ezt követően a vizsgált szabályozó elemekben pontmutációkat hoztunk létre, melyek *in vivo* hatását szintén megvizsgáltuk transzgenikus egerekben. A szabályozásban résztvevő Sox faktorok kötődését *in vitro* EMSA kísérletekben vizsgáltuk.

Eredmények

Kimutattuk, hogy a matrilin-1 rövid promoter önmagában alacsony aktivitású proliferatív és prehipertróf porcsejtekben. Aktivitását távoli homológ és heterológ porcspecifikus enhancer elemek nagymértékben növelik. Alacsony aktivitása ellenére a rövid promoter kulcsfontosságú a gén szűkített tér –és időbeli kifejeződésének szabályozásában, sőt még erős, általános porcspecifikus enhancer elem aktivitását is képes szűkíteni.

EMSA kísérletekben igazoltuk, hogy az Ine elem páros Sox motívumai tisztított, GST-fúziós Sox fehérjékkel képesek nukleoprotein komplexet létrehozni. Az 5' végi Sox kötőhely inkább Sox9-cel, míg a 3' végi motívum inkább L-Sox5/Sox6-tal alkot komplexet.

A konzervált elemek pontmutációinak hatását a hosszú promoter aktivitására tranziens expressziós kísérletekben vizsgálva igazoltuk, hogy a Pe1 elem páros Sox motívumainak mutációja drámai módon csökkenti a génexpressziót. Transzgenikus egér kísérletek során pedig megállapítottuk, hogy a Pe1 elem spacer régiójának és az Ine elem egy Sox kötőhelyének mutációja feloldja a rövid promoter által irányított gátlást a végtagváz proximális elemeiben, de a fejlődési állapot-specifikus expressziót nem változtatja meg.

Eredményeink bizonyítják, hogy a rövid promoter működésében rendkívül fontos szerepet játszanak annak evolúciósan konzervált DNS elemei. A Pe1 elem páros Sox9 kötőhelyei és az Ine elem Sox motívumai esszenciálisak a megfelelő kifejeződés irányításában.

A Dpe1 és Dpe2 elemeket tartalmazó távoli DNS régió nagymértékben növeli a rövid promoter aktivitását, illetve heterológ promoter aktivitását is a növekedési korong meghatározott zónába irányítja. Igazoltuk az ebben a régióban elhelyezkedő Dpe1 elem fontos szerepét a rövid promoter aktiválásában, illetve transzgenikus egér adatokkal is

alátámasztottuk, hogy az elem nyolc kópiája a rövid promoter elé építve zonális kifejeződést irányít nagyon erős proximo-disztális irányítottsággal.

A Dpe2 elem deléciója a hosszú promoterből megszünteti a gátló hatást a proximális vázelemekben, de a zónaspecificitás megmarad.

Ezek alapján elmondható, hogy a távoli elemek is zónaspecifikus aktivitással bírnak, de a proximo-disztális különbségek kialakításához a rövid promoter elemeire is szükség van.

Vizsgáltuk továbbá Sox és Nfi kötőhelyeket tartalmazó introni elemek szerepét is a gén transzkripció szabályozásában. Ezek nem, vagy csak kismértékben növelték a rövid promoter aktivitását elsősorban a fejben, ahol mindez erős ektopikus kifejeződéssel társult. Ezen elemek szerepe tehát kisebb a matrillin-1 gén transzkripció szabályozásában.

A proximális promoterén lévő konzervált, szövetspecifikus szabályozó elemek jelenléte egyedi tulajdonsága a matrillin-1 génnek, mivel egyéb porc mátrix fehérjéket kódoló gének (*Col9a1*, *Col9a2*, *Col11a2*, *Agc1*, *CD-Rap*) esetében a proximális promoter régióban nem írtak le porcspecifikus szabályozó elemeket.

Az eredmények megvitatása

Eredményeink, összhangban a csoportban párhuzamosan végzett kísérletek eredményeivel igazolják, hogy a matrillin-1 gén transzkripció szabályozása eltér más porcspecifikus génektől (pl. *Col2a1*, *Agc*). A szabályozásban a rövid promoter kulcsfontosságú. Ezt bizonyítja, hogy önmagában képes az erős, általános porcspecifikus *Col2a1* enhancer aktivitását is leszűkíteni. A rövid promoterén lévő, evolúciósan konzervált szabályozó elemek (Pe1, Ine), melyek képesek a chondrogenézis fő regulátorait (Sox9, L-Sox5/Sox6) *in vitro* kötni, játsszák a főszerepet a gén szűkített, szövet- és fejlődési állapotspecifikus szabályozásában. A reguláló elemek ehhez hasonló, a TATA-box körüli csoportosulását eddig más porcfehérje gén esetében nem írták le.

A Pe1 és az Ine elemek Sox motívumaihoz a Sox9 kötődése szükséges, de nem elégséges feltétele a megfelelő szintű génexpresszióknak, eltérően például a *Col2a1*, *Agc*, *Crt11* génektől. A Sox9 hatását az L-Sox5/Sox6 szinergista és dózisfüggő módon növeli.

A Pe1 elem páros Sox motívumai rendkívül nagy homológiát mutatnak a konszenzus Sox motívummal, ami szintén a matrillin-1 gén egyedi tulajdonsága.

Sox és Nfi transzkripció faktorok és valószínűleg más faktorok kötőhelyei találhatók még a távoli promoter régióban, melyek hatását a rövid promoter elemei közvetítik.

A dolgozatban tárgyalt eredmények, illetve a csoportban előzőleg és párhuzamosan végzett kísérletek alapján felállítottunk egy modellt a matrilin-1 gén szövet –és fejlődési állapotspecifikus szabályozására vonatkozóan. Eszerint a porcfejlődés kezdeti szakaszában a Sox9 a Pe1 elemhez kötődik. A kötődés hatékonyságát az L-Sox5/Sox6 növeli, melyek ekkor még a Sox9-hez képest kisebb mennyiségben vannak jelen. A Sox faktorok valószínűleg a DNS konformációváltozását idézik elő, ami lehetőséget biztosít partner faktoraiknak a kötődésre. A promoter aktivitása a késői proliferatív porcsejtekben a legmagasabb, amikor a Pe1 és Ine elemeken a Sox faktorok kötődése optimális. Ekkor a nagy mennyiségben jelenlévő L-Sox5/Sox6 akadályozza a Sox9 transzaktivációt, feltehetően a kötőhelyekért való versengés által. A későbbi stádiumokban lecsökkent transzkripció aktivitáshoz az is hozzájárulhat, hogy a gátló Nfi izoformák foglalják el kötőhelyeiket a szabályozó elemeken.

A matrilin-1 gén egyedi szabályozó mechanizmusának felderítésével hozzájárulhatunk olyan zónaspecifikus vektorok kialakításához, melyek hasznos eszközei lehetnek a vázrendszeri betegségek gyógyításának.

SUMMARY OF THE THESIS

Introduction

Most of the vertebrate skeleton forms through endochondral ossification. This process requires a cartilaginous template of the future bones. The first step of endochondral bone formation is the condensation of mesenchymal cells. In the center of the condensations cells differentiate into prechondrocytes and later chondroblasts which start to deposit an extracellular matrix characteristic of cartilaginous tissues, comprising mainly of type II, IX., XI. collagen, aggrecan, chondromodulin-1. A few cell layers at the periphery develop into fibroblast-like perichondrial cells. Chondroblasts sequentially differentiate into proliferating, prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes. Later capillaries invade carrying osteoclasts which degrade the hypertrophic cartilage matrix. Osteoblasts then produce bone-specific matrix. The layer of epiphyseal chondroblasts does not develop into bone but functions as articular cartilage.

Developing chondrocytes establish growth plates in which the cells are arranged in layers according to their developmental stages. The zone further from the bone diaphysis is the source zone. These cells are small, dividing rapidly. In the columnar proliferating zone cells dividing slower, arrange into columns. Bone growth is determined by the number of cells proliferating in the columnar zone and progress through hypertrophy. After the prehypertrophic stage cells form the hypertrophic zone. These are larger and irregularly shaped cells. Each step of endochondral bone formation has its characteristic set of marker genes expressed.

The master transcription factor governing chondrocyte differentiation is Sox9. Together with L-Sox5 and Sox6 they form the Sox trio. Both of them are required and sufficient to induce chondrogenesis.

Members of the matrilin protein family are non-collagenous, oligomeric extracellular adaptor proteins. They form both collagen-dependent and -independent networks in the cartilage extracellular matrix. They are present in several other tissue types highlighting their importance in matrix assembly.

The first identified member of the matrilin family is matrilin-1. Its coding gene (*Matn1*) has the unique feature among other cartilage matrix genes that it is expressed in later stages of chondrogenesis. *In vivo* its expression is restricted to early proliferative and prehypertrophic chondrocytes of the growth plate, therefore it can be considered as a marker gene of this stage. The long promoter of the chicken matrilin-1 gene directs the

expression to the columnar proliferative and prehypertrophic zones of the growth plate in transgenic mice.

Aims of the study

In our studies we wanted to identify the contribution of previously characterized regulatory elements to the tissue –and developmental stage-specific regulation of the gene. We also wanted to investigate the similarities and differences between the regulatory mechanism of *Matn1* and other cartilage protein genes.

Experimental strategy

To gain insight into the transcriptional regulation of the gene, we used the following experimental strategy. We generated reporter constructs with different combinations of the regulatory elements and studied their activity in transient expression assays in different cell cultures. Among the reporter constructs we picked those which affected the tissue –and developmental stage-specific expression of the gene. With these combinations of DNA elements we generated transgenic mice to study their *in vivo* effect. Histological methods were used to study the spatial and temporal expression pattern of the gene in founder embryos and embryos from transgenic lines. Based on these experiments we defined the regulatory regions responsible for this unique expression pattern.

Within the examined regulatory elements point mutations were generated and their effects were also tested in transgenic mice.

With *in vitro* EMSA experiments we studied the binding characteristics of purified Sox factors to the regulatory elements.

Results

We showed that the matrilin-1 short promoter alone exhibits low activity in the proliferative and prehypertrophic zones of the growth plate. Its activity was significantly increased by homologous and heterologous cartilage-specific enhancer elements. Despite of its low activity the short promoter plays pivotal role in the restricted tissue –and developmental stage-specific regulation of the gene. Moreover it can even inhibit the *Col2a1* general cartilage-specific enhancer in proximal structures and at early differentiation stages.

In EMSA experiments we showed that the paired Sox motifs of the Ine element are capable of binding purified, GST-fused Sox proteins. The 5' motif prefers to form nucleoprotein complex with Sox9, while the 3' motif rather binds L-Sox5/Sox6.

In transient expression assays we showed that mutations in the paired Sox motifs of the Pe1 element dramatically decrease the activation of the long promoter.

Based on the effect of point mutations of the conserved elements in transgenic mice, we concluded that mutation in the spacer region of the Pe1 element and one of the Ine Sox motifs eliminates the inhibitory effect of the short promoter in the proximal skeletal structures, but does not alter the developmental stage-specific expression.

The evolutionarily conserved DNA elements of the short promoter have crucial role in its activity. The paired Sox9 binding sites of the Pe1 element and the Sox motifs of the Ine element are essential for driving proper expression pattern.

The proximal promoter region which contains the conserved Dpe1 and Dpe2 elements largely increased the activity of the short promoter. It also directed the activity of a heterologous promoter to certain zones of the growth plate.

We proved the important role of Dpe1 element in the activation of the short promoter in transient expression experiments. Eight copies of this element together with the short promoter direct zonal expression with extremely high level in distal structures in transgenic mice.

Deletion of the Dpe2 element from the long promoter erased the inhibitory effect in proximal structures, but did not affect the zonal expression pattern.

From these results we concluded that the proximal elements also have zone-specific activity, but short promoter elements are also needed for generating proximo-distal differences.

We also studied the role of intronic elements containing Sox and Nfi binding sites. These regions had no or mild effect on the activity of the short promoter, driving strong expression mainly in the head accompanied by high level ectopic expression. Thus these elements play minor role in the transcriptional regulation of the matrilin-1 gene.

Discussion

Our results, in concordance with parallel findings in our group, confirm that the transcriptional regulatory mechanisms of the matrilin-1 gene differs from other cartilage-specific genes (*Col2a1*, *Agc*). The evolutionarily conserved regulatory elements of the short promoter (Pe1, Ine), which can bind the master transcription factors of

chondrogenesis (Sox9, L-Sox5/Sox6) *in vitro*, play the key role in the restricted expression pattern of the gene. The modular arrangement of regulatory elements around TATA is a unique feature of the matrilin-1 gene.

Binding of Sox9 to the Sox motifs of Pe1 and Ine is required but not sufficient for the proper expression level, differing from the *Col2a1*, *Agc* and *Crtl* genes. L-Sox5 and Sox6 modulates the effect of Sox9 in a dose-dependent and synergistic manner.

The distal promoter region harbours binding sites for Sox, Nfi and other yet unidentified factors. Their effect is likely mediated by the short promoter elements. Presence of tissue-specific regulatory elements in the proximal promoter region is also a characteristic of the matrilin-1 gene.

Based on the results discussed in this thesis together with previous and parallel works in our group we proposed a model for the unique regulatory mechanism of the matrilin-1 gene. According to this, at the early stage of chondrogenesis Sox9 binds to the Pe1 element. L-Sox5/Sox6, which is expressed at lower molar excess relative to Sox9, secures this binding.

Binding of Sox factors near TATA may bend the DNA and facilitate the binding of components of the PIC (preinitiation complex). The promoter activity is highest in late proliferative chondroblasts when the occupancy of Sox motifs on Pe1 and Ine are optimal. At this time the large molar excess of L-Sox5/Sox6 to Sox9 decreases its transactivation, possibly by competing for binding Pe1 and other elements. The decreased transcriptional activity may possibly due to repressor Nfi isoforms binding to the regulatory elements.

Describing of the unique regulatory mechanism of the matrilin-1 gene can facilitate the construction of growth plate zone-specific vectors and the development of biotechnological therapies for skeletal diseases.

A DOLGOZAT ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

1. Rentsendorj, O., Nagy, A., Sinkó, I., Daraba, A., Barta, E., Kiss, I. (2005) Highly conserved proximal promoter element harbouring paired Sox9-binding sites contributes to the tissue- and developmental stage-specific activity of the matrilin-1 gene. *Biochem J* **389**, 705-716.
2. Nagy, A., Kénesi, E., Rentsendorj, O., Molnár, A., Szénási, T., Sinkó, I., Zvara, A., Thottathil Oommen, S., Barta, E., Puskás, L. G., Lefebvre, V., Kiss, I. (2011) Evolutionarily Conserved, Growth Plate Zone-Specific Regulation of the Matrilin-1 Promoter: L-Sox5/Sox6 and Nfi Factors Bound near TATA Finely Tune Activation by Sox9. *Mol Cell Biol* **31(4)**, 686-699.
3. Magyar és nemzetközi szabadalmi bejelentés
Címe: „Porcspecifikus vektorok és porcspecifikus génműködés követésére alkalmas transzgenikus állatmodellek kidolgozása”
Bejelentés alapszáma: P0700457
Bejelentés időpontja: 2007. július 3.
Dr. Kiss Ibolya, Dr. Molnár Annamária, Nagy Andrea, Dr. Kénesi Erzsébet

A DOLGOZAT TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ EGYÉB KÖZLEMÉNY

1. Karcagi, I., Rauch, T., Hiripi, L., Rentsendorj, O., Nagy, A., Bösze, Zs. and Kiss, I. (2004) Functional analysis of the regulatory regions of the matrilin-1 gene in transgenic mice reveals modular arrangement of tissue-specific control elements. *Matrix Biol.* **22**, 605-618.

