

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A matrilin-1 gén transzkripció szabályozásának vizsgálata transzgenikus egerekben

Nagy Andrea

Témavezető: Dr. Kiss Ibolya

Biológia Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar
MTA Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézet

Szeged

2011

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 képződik. Ebben a folyamatban a porcszövet egy átmeneti struktúra, amely végül teljes mértékben átalakul.

Az epifízeális porc és a csontok hosszanti növekedése a felnőtt kor eléréseig a növekedési koronghoz köthető. Az itt lévő chondrocyták morfológiailag és génexpresszió alapján is elkülöníthető zónákba rendeződnek, melyek megfelelnek az embrionális porcfejlődési stádiumoknak. A diafizistól legtávolabb található a forrás chondrocyták zónája. Ezek kicsi, azonos alakú, gyorsan osztódó sejtek. Az oszlopos proliferatív porcsejtek lassabban osztódnak, oszlopokba rendeződnek, melyeken lefelé haladva az osztódás intenzitása csökken. A proliferációt követően a sejtek egy átmeneti prehipertróf zónát alkotnak. 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.

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 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

szövettypus sejtközötti állományában előfordul a család egy, vagy több tagja.

A család elsőként azonosított tagja a matrilin-1. Specifikusan a porcşövetben tölt be adaptor szerepet. Más mátrix molekulákhoz (decorin, biglycan, COMP) kötődve részt vesz az aggrecan, valamint a II. és VI. típusú kollagén rostok közti fonalas hálózat létrehozásában. 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 állapot-specifikus 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 gén transzkripciós szabályozása mennyiben azonos, illetve tér el más porc mátrix fehérjéket kódoló génekétől (pl. *Col2a1*).

Kísérleti stratégia

Kérdéseink megválaszolása érdekében a következő kísérleti stratégiát követtük. A már korábban leírt reguláló elemek különböző kombinációival luciferáz riporter konstrukciókat hoztunk létre, melyek aktivitását transziens expressziós kísérletekben különböző sejt kultúrákban vizsgáltuk. Ezek közül azokat választottuk ki, melyek hatással voltak a matrilin-1 gén szövet- és fejlődési állapot-specifikus expressziójára. Ezekkel a DNS elem kombinációkkal *LacZ* riporter konstrukciókat

készítettünk, melyekkel pronukleusz mikroinjektálással hoztunk létre transzgenikus egereket, 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. A szabályozásban résztvevő Sox faktorok kötődését *in vitro* EMSA kísérletekben vizsgáltuk. Ezt követően a vizsgált szabályozó elemekben pontmutációkat hoztunk létre, melyek *in vivo* hatását szintén megvizsgáltuk transzgenikus egerekben.

Eredmények

1. 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.

2. 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.

3. 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 kísérletekben pedig megállapítottuk, hogy az Ine elem Sox mutációja is drámai hatású, de nem változtatja meg alapvetően a promoter zónális és disztális elemhez kötődő működését. Ugyanakkor a Pe1 elem spacer régiójának és az Ine elem egy nem azonosított faktor 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 matrilin-1 promoter működésében rendkívül fontos szerepet játszanak az evolúciósan konzervált DNS elemek. A Pe1 elem páros Sox9 kötőhelyei és az Ine elem Sox motívumai esszenciálisak a megfelelő kifejeződés irányításában.

4. A Dpe1 és Dpe2 elemeket tartalmazó távoli DNS régió nagymértékben növeli a rövid promoter aktivitását, illetve heterológ promoter aktivitását is a növekedési korong meghatározott zónáiba 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 elemekre is szükség van.

5. 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 matrilin-1 gén transzkripció szabályozásában.

6. A proximális promoteren csoportosuló, konzervált, szövetspecifikus szabályozó elemek kulcsszerepe a gén transzkripció szabályozásában egyedi tulajdonsága a matrilin-1 génnek, mivel egyéb porcmátrix fehérjéket kódoló gének (*Col9a1*, *Col9a2*, *Col11a2*, *Agc1*, *CD-Rap*) esetében a proximális promoter régióban nem írtak le porcspecifikus szabályozó elemeket.

Az eredmények megvitatása

Eredményeink igazolják, hogy a matrilin-1 gén transzkripció szabályozása eltér más porcspecifikus génekétől (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 promoteren lévő, evolúciósan konzervált szabályozó elemek (Pe1, Ine), melyek képesek a chondrogenesis fő regulátorait (Sox9, L-Sox5/Sox6) *in vitro* kötni, játsszák a döntő szerepet a gén szűkített, szövet- és fejlődési állapot-specifikus 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. Újabb adataink alapján a Sox9 aktiváló hatását a matrilin-1 promoterre 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 matrilin-1 gén egyedi tulajdonsága.

Sox és Nfi transzkripció faktorok és valószínűleg más faktorok kötőhelyei találhatóak 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 állapot-specifikus 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. Későbbi

stádiumokban, vagy tovább növelve a L-Sox5/Sox6 expressziót a Sox9-hez képest, a nagy mennyiségben jelenlévő L-Sox5/Sox6 akadályozza a Sox9 transzaktivációt, feltehetően a kötőhelyekért való versengés által. Nagy Nfi felesleg szintén lecsökkent transzkripció aktivitáshoz vezethet, sztérikus gátlás miatt a TATA motívum közelében, vagy gátló Nfi izoformák kötődése miatt.

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

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények

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. IF (2005): 4,224

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. IF (2010): 6,057

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

Karcagi, I., Rauch, T., Hiripi, L., Rentsendorj, O., Nagy, A., Bősze, 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. IF (2004): 4,104

Konferenciakiadványok, előadások és poszterek

Nagy, A., Karcagi, I., Rauch, T., Hiripi, L., Rentsendorj, O., Bősze, Z. and Kiss, I.: Functional analysis of the regulatory regions of the matrilin-1 gene in transgenic mice reveals modular arrangement of tissue-specific control elements. **FEBS J.** 272 (s1), D1-034P, 2005, IF(2004): 3.260

Nagy, A., Sinkó I., Molnár A., Kénesi E., Kiss I.: A matrilin-1 szabályozóelemek működésének vizsgálata transzgenikus egerekben. Absztrakt #P-58, **Biokémia**, XXX.évf., 3. szám, szeptember, 2006

Nagy, A., Sinkó I., Molnár A., Kénesi E., Kiss I.: Functional analysis of the matrilin-1 control elements in transgenic mice. Absztrakt #F3217, **FECTS XXth and ISMB meeting**, Oulu, Finnország, 2006

Nagy, A., Sinkó, I., Kénesi, E., Barta, E. and Kiss, I.: Role of promoter elements in the developmental stage-specific regulation of the matrilin-1 gene. előadás, **Straub Napok**, Szeged, november 16-18. 2005

Kiss I., Kénesi E., Molnár A., Nagy, A., Rentsendorj O., Bálint L.B., Sinkó I. és Nagy L.: A matrilin-1 gén DNS-elemeinek működése in vitro és in vivo, a porcspecifikus génexpresszió követésére alkalmas transzgenikus állatmodellekben. **A Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság és a Magyar Élettani Társaság LXXII. Vándorgyűlése**, Debrecen, június 4-6. 2008

Nagy, A., Karcagi, I., Rauch, T., Hiripi, L., Rentsendorj, O., Bősze, Z. and Kiss, I.: Functional analysis of the regulatory regions of the matrilin-1 gene in transgenic mice reveals modular arrangement of tissue-specific control elements. Poszter, **30th FEBS Congress – 9th IUBMB Conference**, Budapest, július 2-7. 2005

Nagy, A., Sinkó, I., Rentsendorj, O., Karcagi, I., and *Kiss, I.*: Functional analysis of the matrilin-1 control regions directing the zonal expression of the transgene in growth plate cartilage. Poszter, **Gordon Research Conference „Biology and Pathology of Cartilage”**, Il Ciocco, Olaszország, Június 5-9. 2005

Nagy A., Sinkó I., Molnár A., Kénesi E., Kiss I.: Functional analysis of the matrilin-1 control elements in transgenic mice. Absztrakt #F3217, **FECTS XXth and ISMB meeting**, Oulu, Finnország, 2006

Nagy,A., Sinkó,I., Rentsendorj,O., Karcagi,I., Kiss, I. Functional analysis of the Matrilin-1 control regions directing the zonal expression of the transgene in growth plate cartilage.**MBKE 2006. évi vándorgyűlés**, Pécs, augusztus 31-szeptember 2. 2006

A. Nagy, A. Molnár, I. Sinkó, E. Kénesi and I. Kiss: Functional analysis of Matn-1 promoter regulatory elements in transgenic mice. **Straub Napok**, Szeged, November 15-17. 2006

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 Zsoltának 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.

