A Ph.D. értekezés tézisei

CISZ REGULALÓ ELEMEK SZEREPE A MATRILIN-1 GÉN TRANSZKRIPCIÓS ÉS POSZT-TRANSZKRIPCIÓS SZABÁLYOZÁSÁBAN

Irta: Rauch Tibor
Témavezető: Dr. Kiss Ibolya

MTA SZBK BIOKÉMIAI INTÉZET
SZEGED
2002

BEVEZETÉS

A gerincesek csontvázának nagy része az embrionális korban egy átmeneti porcos vázon keresztül fejlődik, ez az ún. chondrogén csontosodási útvonal (1). Az endochondrális csontfejlődés útjára lépett mesenchymalis sejtek porcsejtekké történő differenciálódása többlépcsős, minden részletében szigorúan szabályozott folyamat. A mesenchymalis eredetű sejtek kondezálódnak és chondroblastokká differenciálódnak. A kialakuló porcsejtek korai (1a) és késői proliferatív (1b) stádiumokon keresztül jutnak el a hipertróf állapotba (II. stádium), amikor egy részük apoptotikusan elhal, míg a többi hipertróf sejt osteoblast-szerű sejtekké (III. stádium) differenciálódik. A chondrogenezis során a különböző porcspecifikus gének bekapcsolása nem egyszerre megy végbe, hanem jól definiált, egymás követő sorrendben történik meg (1,2). A porcspecifikus gének szekvenciális aktiválódása több szinten szabályozódik. A szövet- és fejlődésiállapot specifikus aktiválódás mögött álló transzkripciós szabályozásban érdekelt *cisz* DNS elemekről és transzkripciós faktorokról viszonylag keveset tudunk. Eddig csupán két transz-aktiváló faktornak (Sox9, Cbfa1) bizonyították a porc differenciálódásban betöltött szerepét (3). A matrilin-1 gén a szövet- és fejlődésiállapot specifikus kutatások szempontjából ideális teszt objektum, mivel csupán porcsejtekben expresszálódik, és csak a szöveti differenciálódás jól definiált stádiumában (Ib) kapcsol be. A megfelelő helyen és időben történő aktiválódása több szinten szabályozódik. A disszertációmban olyan - a transzkripciós és poszt-transzkripciós (splicing) szabályozás szintjén fontos - *cisz* DNS és RNS motívumoknak és a hozzájuk kötődő fehérje faktoroknak a jellemzését kívánom ismertetni, amik kulcsszerepet játszanak a csirke matrilin-1 gén megnyilvánulásában.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Az általánosan ismert és elfogadott rekombináns DNS technikákat alkalmaztuk az egyes plazmidkonstrukciók elkészítésénél (4). A primer szövetkultúrákat (CEC, CEF, HDM) csirke embriókból készítettük (5). A DNS-ek sejtekbe juttatását kalcium-foszfát koprecipitációs módszerrel végeztük (5). Az *in vitro* DNS-fehérje kölcsönhatások vizsgálatára használt sejtmagi kivonatok tisztítását és az alkalmazott egyes technikákat (EMSA, *in vitro* DNase I footprinting) az előzőleg már közölt módon végeztük (5). A GST fúziós fehérjék bakteriális termeltetését és tisztítását a Pharmacia cég által javasolt módszer alapján végeztük. Az *in vitro* szintetizált ^{35}S-jelölt fehérjéket a Promega cég útmutatását követve állítottuk elő. A fehérje-fehérje kölcsönhatás vizsgálatát (GST pull-down, immunprecipitáció) az irodalomban közölt módon végeztük (6). Az *in vivo* DMS és UV footprinting kísérletek kivitelezésénél Gerd Pfeiffer módszerét követtük (7).

EREDMÉNYEK ÉS AZOK MEGVITATÁSA

TRANSZKRIPCIÓS SZABÁLYOZÁS:

Azzal a céllal, hogy azonosítsunk a porcspecifikus gén megnyilvánulásban fontos régiókat, funkcionális térképezésnek vetettük alá a gén első intronját. Olyan egymással részben átfedő deléciós sorozatot hoztunk létre, amely alkalmas volt arra, hogy tranziens expressziós kísérletekben teszteljük a sorozat egyes tagjainak együttműködését a saját minimál promoterével. A deléciós származékok közül egy kiugróan magas aktivitás értékeket mutatott a többi konstrukcióhoz viszonyítva. A deléciós térképezéssel azonosított új matrilin-1 enhancer, lokalizációjában (introni) és porcszövet specifikus működésében a II. kollagén gén enhancerével mutat rokonságot (8).

Nemrégiben a Sox9-et azonosították, mint a chondrogenezis egyik esszenciális transzkripciós faktorát („master factor”), aminek hiányában már a chondrogén vázfejlődés első fő lépése – a mesenchimalis sejtek kondenzációja – sem történik meg (9). A Sox9 kooperációban az L-Sox5 és Sox6 faktorokkal részt vesz több kollagén (Col2a1, Col9a2, Col11a2) és az aggrecan gén aktiválásában (10,11,12). Azonban az továbbra is nyitott kérdés, hogy a többi porcspecifikus fehérje gén, korrekt, egymást követő expresszióját milyen molekuláris mechanizmusok indítják be. Ennek a kérdésnek a részletes megvizsgálását határoztuk el, amikor csirke matrilin-1 gén porcszövetspecifikus introni enhancerének jellemzésébe kezdtünk. A kísérleteinkben az enhancer egy olyan *cisz* elemére (IE1) koncentráltunk, amely előzetes kötési tesztekben szövetspecifikus különbségeket mutatott az expresszáló és nem–expresszáló sejtekből származó sejtmagi kivonatokkal. A Sox fehérjék más *transz*-aktiváló faktorokkal kapcsolatos kölcsönhatásának jellegzetességei tetten érhetőek voltak az IE1 elemmel kapcsolatos EMSA kísérleteinkben is. Pontosabban, az IE1 elemen több putatív Sox-kötőhely veszi körül az NF-I felismerő motívumot. Annak ellenére, hogy sem az NF-I, sem a Sox kötőhelyek nem feleltek meg tökéletesen az egyes konszenzus felismerő motívumoknak, mindkettő faktor igen jól kötődött az IE1-es elemhez. Az elmutáltatott oligonukleotidokkal végzett

kompetíciós analízis rámutatott arra is, hogy az NF-I mellett a Sox faktorok szintén esszenciális komponensei a formálódó nukleoprotein komplexumnak. *In vivo* footprint adataink megerősítik azokat az *in vitro* eredményeinket, amelyek az IE1 elem fontosságát hangsúlyozták. A Sox és NF-I faktorok *cisz* motívumai jellegzetes védettséget mutatnak az *in vivo* kísérletekben is. A kérdéses IE1 elem közvetlen környezetében további védett szakaszokat detektáltunk, ami az enhancer régió még összetettebb működésére utal. A Sox9 kölcsönhatása az NF-I faktorral olyan fontosnak bizonyult a matrilin-1 gén transzkripciós szabályozásában, hogy az NF-I kötőhelyet érintő egyetlen pontmutáció is dramatikusan csökkentette a fehérje kötődését az introni elemhez, továbbá a tranziens expressziós kísérletekben mindkettő faktor transzaktivációs képességét a minimálisra csökkentette. Az IE1 elemen a szomszédos *cisz* motívumokhoz történő kötődésen túl, a Sox9 és NF-I faktorok között direkt fehérje-fehérje kölcsönhatás is kialakul. Az ilyen típusú, faktorok közötti interakciót a GST pull-down kísérleteink bizonyították.

Az NF-I fehérjéket a gerincesekben négy gén kódolja, valamennyi génre jellemző, hogy igen erős alternatív splicing tevékenység jellemzi. Tehát, ennek megfelelően igen sok NF-I változat létezik egy adott sejttípusban, ami pedig jelentősen megnehezíti a Sox9-cel kompatibilis változat azonosítását. Immunprecipitációs adataink azt mutatják, hogy a Sox9 faktorral kölcsönhatás szempontjából kompatibilis NF-I változat csak a chondrogen eredetű sejtekben található. A matrilin-1-et nem expresszáló sejtekből származó sejtmagi extraktumban nem tudtuk kimutatni ilyen jellegű NF-I izoformát. Tranziens expressziós/kotranszfekciós kísérleteinkben a csirke NFI-C1 génnek megfelelő izoformát használtuk. Különböző korú HDM kultúrából származó sejtmagi kivonatokkal végzett EMSA kísérleteink bizonyos támpontot adnak arra vonatkozóan, hogy milyen az NF-I fehérjék reprezentációja a porcosodás különböző fázisaiban. A 0 napos HDM kultúrából (elkötelezett mesenchyma sejtek) nyert sejtmagi extraktumban szinte teljesen hiányzik az NF-I faktor. A chondrogenezis előre haladtával, a négy napos HDM kultúrából származó extraktummal teljesen más, sokkal összetettebb kötési mintázatot kapunk. Ebben

a stádiumban már Sox9 és NF-I specifikus komplexek formálódnak, de ezek mobilitásukban eltérőek a chondrocytákban (CEC) detektálhatóktól. A tisztán látás érdekében, a jövőben fontos feladat lesz az NF-I változatok expressziós mintázatának pontos felderítése a vázfejlődés során, illetve a Sox9-cel kompatibilis izoforma azonosítása.

Jelen adataink birtokában nem zárható ki annak a lehetősége, hogy különböző NF-I családhoz tartozó, eltérő splicing variáns eredetű fehérjék között kompetició van a matrilin-1 enhanceren fellelhető NF-I kötőhelyért.

POSZT-TRANSZKRIPCIÓS SZABÁLYOZÁS:

Az AT-AC intronokat szinte már minden élőlényben azonosították a növényektől kezdve, a *Drosophilán* keresztül egészen a gerincesekig. Az első publikált példáját ezeknek az intronoknak a csirke matrilin-1 gén szolgáltatta (13). Ezek az intronok AT és AC dinukleotidokat hordoznaknak az exon-intron határon, amely teljesen eltér a klasszikus GT-AG határ szekvenciáktól. Az AT-AC intronok eltávolítását a pre-mRNS-ből az ún. U12-típusú spliceosoma végzi, amely komponenseiben ugyan eltérő, de működésében azonos elveket követ az U2-típusú spliceosomával. Az AT-AC intronok pre-mRNS-ből történő eltávolításának hatásfoka messze elmarad attól a szinttől, amit a hagyományos (GT-AG) intronoknál el lehet érni. *Egyféle magyarázat* lehet erre a jelenségre, ha azt feltételezzük, hogy az adott intron kivágása egy lehetséges szabályozási pontja a poszt-tanszkripciós szabályozásnak. Ezért olyan rendszer fejlesztésébe kezdtünk, amely alkalmas *in vivo* körülmények között vizsgálni a matrilin-1 gén AT-AC intronjának kivágódását. Ebből a célból olyan eukaryota minigént hoztunk létre, amely a bakteriális kloramfenikol acetiltranszferáz (CAT) gént hordozta. Az AT-AC intront úgy építettük a CAT gén kódoló régiójába, hogy akkor és csak akkor kapjunk mérhető CAT aktivitást a sejtek lizátumában, amennyiben az intron kivágódás abszolút pontossággal megtörtént. A GT-AG és AT-AC intronok sorrendje, topológiája követte az eredeti matrilin-1 génben fellelhető elrendeződést. Egy *másik lehetséges magyarázat* a fent említett problémára az, hogy *in vitro* kísérletekben a hatékony intron eltávolításnak nem minden lényeges eleme van jelen. Amikor deléciós analízisnek vetettük alá az intront, egy olyan szakaszt sikerült térképeznünk, amelynek hiányában jelentősen alacsonyabb CAT aktivitásokat tudtunk detektálni a tranziens expressziós kísérletekben. A kérdéses introni szakasz tehát pozitív hatással volt az AT-AC intron eltávolítására (splicing enhancer), és a filogenezis során elemeiben konzerválódott a matrilin-1 gének 5' splicing helyének közelében. Az introni splicing enhancerhez kötődő fehérje faktorok azonosítása a jövő feladatainak egyike lesz.

KONKLÚZIÓK:

A csirke matrilin-1 gén első intronjában egy porcspecifikus működést mutató enhancert azonosítottuk. *In vivo* és *in vitro* footprint technika felhasználásával több védett régiót detektáltunk az enhancer régióban. Kompetíciós EMSA és “super shift” adatok bizonyítják, hogy az NF-I és Sox9 transzkripciós faktorok kötődnek ehhez az enhancer elemhez. COS-7 sejtekben végzett kotranszfekciós kísérletek szerint a két faktor kooperatívan együttműködik és közösen több százszorosra képesek emelni a riporter génaktivitását. A Sox9 és NF-I faktorok nem csupán egymás szomszédságában kötődnek az enhancer motívumhoz, hanem a GST pull-down adatok bizonysága szerint, direkt fehérje-fehérje kölcsönhatást is kialakítanak egymással. A gerincesekben az NF-I transzkripciós faktornak több izoformája létezik egyszerre, ezért a Sox9-cel kölcsönható változat azonosítása fontos eleme lesz az enhancer hatás pontos megértésének. Annyit tudunk az immunprecipitációs kísérleteinkből, hogy a matrilin-1-et nem expresszáló sejtekben a Sox9-cel kompatibilis izoforma hiányzik. Az adott változat azonosítása a jövő fontos feladatinak egyike.

A matrilin-1 gén korrekt megnyilvánulásában fontos az RNS splicing szintjén történő reguláció is. Az általunk fejlesztett eukaryota minigénnel olyan introni splicing enhancert azonosítottunk, ami az AT-AC intron eltávolításának hatékonyságát jelentősen megemeli. Ez a splicing enhancer a különböző matrilin-1 gének AT-AC intronjaiban konzerválódott.

Disszertációmban olyan adatokat mutattunk be, amelyek a csirke matrilin-1 gén transzkripciós és poszt-transzkripciós enhancerének azonosításáról, működéséről és felépítéséről szolgálnak információval. A bemutatott enhancerek, szövet- és fejlődésiállapot- specifikus génszabályozásban betöltött szerepét tovább kívánjuk vizsgálni, az azonosított *cisz*-és *transz*-hatású elemek szerkezetének és funkciójuknak vizsgálatával.

IRODALOM:

1. Cancedda R, Descalzi Cancedda F, Castagnola P. (1995) Int Rev Cytol. 159:265-358.
2. Szűts V, Mollers U, Bittner K, Schurmann G, Muratoglu S, Deák F, Kiss I, Bruckner P. (1998) Matrix Biol. 7:435-48.
3. Shum L, Nuckolls G. (2002) Arthritis Res. 4:94-106.
4. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual,* 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
5. Szabó P, Moitra J, Rencendorj A, Rákhely G, Rauch T, Kiss I. (1995) J Biol Chem. 270:10212-21.
6. Rauch T, Rentsendorj O, Karcagi I and Kiss I. (2002) J Biol Chem. Közlésre beküldve.
7. Pfeifer GP, Tommasi S. (2000) Methods Mol Biol.130:13-27.
8. **Horton W, Miyashita T, Kohno K, Hassell JR, Yamada Y. (1987) Proc Natl Acad Sci U S A. 84:8864-8.**
9. Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrugghe B. (1999) Nat Genet. 22:85-9.
10. Lefebvre V, Li P, de Crombrugghe B. (1998) EMBO J. 17:5718-33.
11. Zhou G, Lefebvre V, Zhang Z, Eberspaecher H, de Crombrugghe B. (1998) J Biol Chem. 273:14989-97.
12. Bridgewater LC, Lefebvre V, de Crombrugghe B. (1998) J Biol Chem. 273:14998-5006.
13. Kiss I, Deák F, Lukacsovich T. (1988) Nucleic Acids Res. 16:1211.

PUBLIKÁCIÓK:

1. Szabó P, Moitra J, Rencendorj A, Rákhely G, Rauch T, 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. 270:10212-21.
2. Zadori Z, Stefancsik R, Rauch T, Kisary J. (1995)Analysis of the complete nucleotide sequences of goose and muscovy duck parvoviruses indicates common ancestral origin with adeno-associated virus 2. Virology. **212**:562-73.
3. Rauch T, Rentsendorj O, Karcagi I and Kiss I. (2002) The chondrogenic master transcription factor Sox9 pairs off with NF-I in the regulation of the matrilin-1 gene. J Biol Chem. Közlésre beküldve.

CONTRIBUTION TO INTERNATIONAL CONFERENCES

1. Rauch T, Karcagi I,. Kiss I. (2000) "Functional analysis of the unusual intron of the matrilin-1 gene" Abstract book of XVII th Meeting of FECTS,Patras, Greece
2. I. Karcagi I, Rauch T, Bősze Z, Kiss I. (2000) "Functional analysis of the major control regions of the matrilin-1 gene in transgenic mice" Abstract book of the XVII th Meeting of FECTS,Patras, Greece
3. Rauch T, Karcagi I, Kiss I. (1998) "The role of cis elements in the transcriptional and posttranscriptional regulation of the matrilin-1 gene" Abstract book of the XVI th Meeting of FECTS, Uppsala, Sweden
4. Karcagi I, Hiripi L, Rauch T, Bősze Z, Kiss I. (1997) "Analysis of a hybrid GT-AG/AT-AC intron of the chicken CMP gene in transgenic mice" Abstract book of the VIII th IMP Spring Conference, Wienna, Austria
5. Szabó P, Rauch T, Rentcendorj A, Moitra J, Kiss I. (1992) "Characterization of regulatory elements involved in the tissue- and developmental stage-specific expression of the cartilage matrix protein gene" Abstract book of the IV th International Conference on the Molecular Biology of Matrix, Philadelphia, PA, USA
6. Rauch T, J. Moitra J, P. Szabó P, A. Rentcendorj A, I. Kiss I. (1992) Identification of an intronic enhancer controlling the expression of the cartilage matrix protein gene" Abstract book of the XIII th Meeting of FECTS, Davos, Switzerland

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS:

Témavezetőmnek, Dr. Kiss Ibolyának nagyon sok hálával tartozom azért, hogy pályámon elindított és mindig számíthattam a támogatására a tudományos problémákat meghaladó kérdésekben is.

Köszönettel tartozom jelenlegi és egykori munkatársaimnak: Deák Ferencnek, Illésné Kovács Katalinnak, Karcagi Ildikónak, Kravjár Ildikónak, Mátés Lajosnak, Joideep Moitra-nak, Selen Muratoglu-nak, Szabó Piroskának, Szelei Józsefnek, Altanchimeg Rentsendorj-nak, Otgonchimeg Rentsendorj-nak, Simon Ferencnének és Szűts Viktóriának a munkámban nyújtott segítségükért és a hasznos tanácsaikért.

Hálás vagyok Tóth Sándornénak a disszertáció ábráinak elkészítéséért.