

**CISZ REGULÁLÓ ELEMÉK SZEREPE A MATRILIN-1 GÉN
TRANSZKRIPCIÓS ÉS POSZT-TRANSZKRIPCIÓS
SZABÁLYOZÁSÁBAN**

Ph.D. értekezés

Készítette: Rauch Tibor

Témavezető: Dr. Kiss Ibolya

**MTA Szegedi Biológiai Központ
Biokémiai Intézet
2002**

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A porcszövet, mint a génexpresszió és differenciálódás modellrendszere

2.1.1 A porcszövet felépítése és makromolekulái

2.1.1.1 Kollagének és proteoglikánok.

2.1.1.2 Nem-kollagénszerű fehérjék

2.1.1.3 A matrilin család

2.2 A chondrogenesis

2.3 A transzkripciós szabályozás

2.3.1 Promoterek és enhancerek

2.3.2 A transzkripciós faktorok

2.3.2.1 SOX faktorok

2.3.2.2 Ösztrogén receptor család

2.3.2.3 CTF/NF-I család

2.4 Poszt-transzkripciós szabályozás

2.4.1

2.4.2 Exon definíciós modell

3. CÉLKITŰZÉSEK

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Anyagok

4.1.1 Vegyszerek és enzimmészítmények

4.1.2 Radioaktív készítmények

4.1.3 Baktérium törzsek

4.1.4 Plazmidvektorok

4.1.5 Tápoldatok eukaryota sejtekhez

4.1.6 Szérumok

4.2 Módszerek

4.2.1 Molekuláris klónozások

4.2.2 Polimeráz láncreakció (PCR)

4.2.3 DNS-ek radioaktív jelölése

4.2.4 Plazmid konstrukciók

4.2.4.1 Az introni deléciós sorozat előállítása

4.2.4.2 TB36 előállítása

4.2.4.3 TO50 (NF-I mutáns) előállítása

4.2.4.4 Mesterséges eukaryota minigének előállítása

4.2.5 Sejtkultúrák

4.2.6 Tranziens expressziós és kotranszfekciós kísérletek

4.2.7 Kloramfenikol-acetiltranszferáz enzim aktivitásának mérése (CAT assay)

4.2.8 Sejtmagi kivonatok tisztítása

4.2.9 EMSA és Supershift kísérletek

4.2.10 In vitro DNaseI Footprinting

4.2.11 In vivo Footprinting

4.2.12 GST fúziós fehérjék termeltetése és tisztítása

4.2.13 GST pull-down kísérletek

4.2.14 Immunprecipitáció

4.2.15 Luciferáz enzim aktivitásának mérése

5. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS AZOK MEGVITATÁSA

5.1 Transzkripciós szabályozás

5.1.1 Kísérleti előzmények

5.1.2 A matrilin-1 gén első intronjának funkcionális analízise

5.1.3 Több transzkripciós faktor kötődik a matrilin-1 gén introni enhanceréhez

5.1.4 Az NF-I kölcsönhat a matrilin-1 gén introni enhancerével

5.1.5 A Sox9 faktor szintén kölcsönhat a matrilin-1 gén introni enhancerével

5.1.6 A bakteriális úton termeltetett faktorok kötődnek az introni elemhez

5.1.7 A Sox9 és NF-I közösen aktiválja a matrilin-1 gén promoterét

5.1.8 A Sox9 és NF-I transzkripciós faktorok között direkt kölcsönhatás létezik

5.1.9 Eltérő transzkripciós faktorok kötődnek az IE1 elemhez a chondrogenesis különböző stádiumait képviselő sejtkultúrákban

5.1.10 In vivo körülmények között az IE1 cisz motívum fehérjéket köt

5.2 Poszt-transzkripciós szabályozás

5.2.1 Az AT-AC intront hordozó mesterséges eukaryota minigén előállítása

5.2.2 Az AT-AC intront hordozó eukaryota minigén tranziens expressziós analízise

5.2.3 Az introni splicing enhancer térképezése

6. ÖSSZEFOGLALÁS

7. SUMMARY OF THE THESIS

8. HIVATKOZÁSOK

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

1. RÖVIDÍTÉSEK

Agc	- Aggrecan
BMP	- Bone morphogenetic protein
CAT	- Chloramphenicol-acetyl-transferase
CEC	- Chicken embryonic chondrocyte
CEF	- Chicken embryonic fibroblast
DMS	- Dimethyl-sulphate
DPE	- Downstream promoter element
ds	- dupla szálú
ECM	- Extracellular matrix
EGF	- Epidermal growth factor
EMSA	- Electrophoretic Mobility Shift Assay
ERE	- Estrogene recognition element
GST	- Glutathione S-transferase
HDM	- High density mesenchyme
HMG	- High-mobility group
Hsp90	- Heat shock protein 90
IE1	- Intronic element 1
IE1m2, IE1m3 és IE1m4	- Intronic element 1 mutant 2, 3 és 4
Ihh	- Indian hedgehog
IL-1	- Interleukin-1
Inr	- Initiator element
LIE1	- Long intronic element 1
L-Sox5	- Long-Sox5
Matn-1	- Matrilin-1
NF-I	- Nuclear Factor I (NFI-A, -B, -C and -X)
PTHrP	- Parathyroid hormone receptor related peptide
RCS	- Rat chondrosarcoma
SI and SII	- Silencer element I and II
SDS	- Na-dodecil-sulphate
SDS-PAGE	- SDS polyacrilamide gel electrophoresis
SF1	- Steroidogenic factor
Shh	- Sonic hedgehog
SOX	- Sry-related HMG box
snRNA	- Small nuclear RNA
SR	- Serine-arginine-rich protein
SRY	- Sex-determining region on Y chromosome
TGF- β	- Transforming growth factor- β

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A PORCSZÖVET, MINT A GÉNEXPRESSZIÓ ÉS DIFFERENCIÁLÓDÁS MODELLRENDSZERE

A gerincesek legtöbb vázeleme egy átmeneti porcos vázon át egy igen összetett, többlépcsős differenciálódási folyamat eredményeként alakul ki. E folyamat során az elkötelezett, aggregálódó mesenchyma sejtekből differenciálódó porcsejtek több fejlődési stádiumon haladnak át, melyekre specifikus marker gének expressziója jellemző (1, 2). A terminális differenciálódási út végén a hipertróf porcsejtek apoptotikusan elhalnak vagy tovább differenciálódnak osteoblast-szerű sejtekké (1). Hasonló differenciálódási stádiumokon haladnak át a porcsejtek a hosszú csöves csontok növekedési korongjaiban.

2.1.1 A porcszövet felépítése és makromolekulái

A porcszövet igen sajátos szövetféleség, hiszen annak ellenére látja el létfontosságú funkcióit, hogy benne vérerek, nyirokerek és idegek lennének. A sejtközzötti állomány magas víztartalma közvetíti a szükséges tápanyagokat, a működésüket és érési folyamatokat befolyásoló hormonokat és növekedési faktorokat. A többi kötőszövethez hasonló vonás az is, hogy az egyéni élet folyamán képes magasabbrendű kötőszövetféleséggé átalakulni, továbbá, hogy a sejtközzötti állomány túlsúlya jellemzi. Valójában különleges tulajdonságait – nagy nyomással szembeni ellenállását és rugalmasságát – nem a sejtek, hanem a sejtek által kiválasztott makromolekulák határozzák meg, melyek egy speciális szerveződésű és igen kiterjedt extracelluláris mátrixot (ECM) alkotnak.

A porc ECM sematikus szerkezetét az 1. ábra mutatja. A felépítésben résztvevő fehérje komponenseket három csoportra oszthatjuk: *kollagénekre, proteoglikánokra és nem-kollagényszerű fehérjékre*. Az alkotórészek két makromolekuláris hálózatot hoznak létre. A II. típusú kollagénrostok kiterjedt hálózataiban fogva tartott proteoglikán-hialuronsav aggregátumok alkotják az ECM fő tömegét. Az erős kollagénrostok nagy szakítószilárdságot, a proteoglikán-hialuronsav aggregátumok pedig rugalmasságot, összenyomással szembeni ellenállást kölcsönöznek a porcszövetnek. A nem-kollagényszerű fehérjék e két hálózat összerendeződésére, stabilizálására, sejt-mátrix kapcsolatok és a mátrix újraépítésére specializálódtak. A porc sejtközzötti állománya a fehérjéken kívül 70% vizet és jelentős mennyiségű szénhidrátot is tartalmaz. Valójában az extracelluláris víz struktúrában tartása az a fontos tényező, amely a porc rugalmasságát megszabja.

2.1.11. Kollagének és proteoglikánok.

A kollagének (3) minden kötőszövetben előfordulnak. Közös jellemzőjük, hogy legalább egy részletük (XYGly)_n szerkezetű hármass helikális domén, szupramolekuláris aggregátumok, rostokat vagy hálózatot formálnak, és szerkezetfenntartó szerepük van a sejtközi állományban.

A proteoglikánok (4) olyan molekulák, amelyekben egy központi polipeptid gerinchez legalább egy glükóz-amino-glükán oldallánc kapcsolódik. A porcszövet tulajdonságainak kialakításában a proteoglikán-hialuronsav aggregátumoknak van döntő jelentősége, aminek fontos komponense az *aggrecan* nevű proteoglikán. Az *aggrecan* N-terminális doménje kapcsolódik a hialuronsavhoz, míg a C-terminálisán lektin-kötő modul található (5). Az *aggrecan*-ban a fehérje gerinchez olyan oldalláncok kapcsolódnak, amik magas szulfát- és karboxil tartalmuk miatt erősen negatív töltésűek és nagy mennyiségű vizet kötnek (5). Összenyomáskor ez a víz szorul ki a töltéshordozó csoportok közül és kerülnek a csoportok olyan közel egymáshoz, hogy elektrosztatikus taszítóerők gátolják meg a további közeledést. Ez a molekuláris háttere a porcszövet rugalmasságának. Az *aggrecan*-on kívül a porcszövetben kimutatható még több kis molekulatömegű proteoglikán is (5).

2.1.1.2 Nem-kollagénszerű fehérjék

A nem-kollagénszerű fehérjék részben a porcszövetre specifikus, részben más szövetekben is előforduló polipeptidek. Többnyire glükoproteinek, és a mátrix szerveződésében, a mátrix és a porcsejtek kölcsönhatásában töltik be funkciójukat azáltal, hogy más makromolekulákkal erős vagy gyenge kötődésre képesek. Sokszor szerkezetüknél fogva más komponensek közötti összekötő kapocsként (nektin) működnek.

2.1.1.3 A matrilin család (6)

A nemrég felfedezett fehérje család tagjai különféle szövetek sejtközi állományában alkotnak kollagéntől függő és attól független finom hálózatos struktúrákat. Funkciójukat tekintve fontos szerepet töltenek be az ECM makromolekuláris hálózatainak összerendezésében. A matrilinek két csoportba oszthatók a génexpressziós vizsgálatok alapján. A közeli rokonságban lévő matrilin-1 és -3 gén kifejeződése csak a vázelemekre szorítkozik, míg a közeli rokon matrilin-2 és -4 szélesebb szöveti előfordulást mutat. Bár a matrilin gének expressziós mintázata átfed a fejlődő vázelemekben, immunhisztokémiai és *in situ* hibridizációs adatok alapján a fehérje

család tagjai jellegzetes egyedi kifejeződést mutatnak. A matrilin-1 gén a növekedési korongokban, a késői proliferatív stádiumban kapcsol be, így ennek a stádiumnak a jellegzetes marker génjeként értékelhető (7). A matrilin-2 és -4 sokféle szövet alkotóeleme, laza- és tömöttrostos kötőszövetben, inakban, bőrben, sőt idegszövetben is előfordul. Fontosságukat mutatja, hogy minden szövet sejtközütti állományában megtalálható a matrilin család egy vagy több tagja. A matrilin-3 génben azonosított domináns mutáció pedig korai osteoartritist eredményezett (8).

A **matrilin-1** (Matn-1), avagy korábbi nevén *porc mátrix fehérje* (CMP) az ECM szerveződésében játszik szerepet, mivel mind aggreganhoz, mind pedig II. típusú kollagénhez is tud kötődni (9). Elektronmikroszkópos képen 3, hajlékony karral összekötött globuláris egységből áll. A Matn-1 előfordulása porcszövetre specifikus, bár egy közlemény alapján a szem bizonyos rétegeiben és embrionális korban a szívben is felbukkan (10). Első alkalommal szarvasmarha légsőporcból írták le a fehérjét (11). A csirke matrilin-1 primer aminosavsorrendjére a cDNS klónozása után derült fény (12). Az 54 kDa-os prekursor polipeptid 493 aminosav hosszúságú, amelynek az N-terminálisán 23 aminosavból álló szekréciós szignál peptid található. Az érett fehérje két, ~180 aminosav hosszúságú ismétlődő egységből áll, amelyeket egy epidermális növekedési faktor-szerű elem (EGF) köt össze. Az ismétlődő modul homológiát mutat a von Willenbrand faktor kollagénkötő doménjével, az integrinek α láncának I doménjével, valamint a B és C2 komplement faktorokkal (13). A matrilin-1 gén egy példányban fordul elő a genomban, csirkében ~18 kb hosszúságú, nyolc exonból és hét intronból áll. Ma már ismert a humán és az egér gén szerkezete is (14). A csirke gén genomi szerveződésének felderítése tette lehetővé a szokásostól (GT-AG) eltérő exon-intron határok felfedezését és így az első AT-AC intron azonosítását (15). A nukleotidszekvenciák összevetéséből derült ki, hogy önálló exon kódolja az EGF-szerű modult, míg két-két exon kódolja a fehérje ismétlődő doménjeit. Ez a gén/fehérje szerkezet konzerválódott az evolúció során, és az ún. „exon shuffling” mechanizmus tehető felelőssé a kialakulásáért (6).

A csirke matrilin-1 gén két transzkripciós iniciációs hellyel rendelkezik, amelyek a TATA boxtól 31 és 39 bp távolságra helyezkednek el (13). A promotor régióban több, a transzkripciós szabályozásban fontos szakaszt már feltérképeztünk (16, 17), azonban ezekről az elemekről a disszertáció későbbi fejezeteiben részletesen kívánok szólni.

2.2 A CHONDROGENESIS

A gerincesek csontvázának nagy része az embrionális korban egy átmeneti porcos vázon keresztül fejlődik, ez az ún. chondrogén csontosodási útvonal (1). A mesenchymalis eredetű sejtek kondenzálódnak 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 differenciálódási folyamatokat jellegzetes morfológiai és génexpressziós változások kísérik. A kondenzálódó mesenchyma sejtekben a mesenchymalis markergének (I. kollagén, fibronectin génje) kikapcsolnak és kis időbeli eltéréssel bekapcsolnak az Ia stádiumra jellemző porcfehérje gének (II. kollagén, aggrecan, kapcsoló fehérje génje). A matrilin-1 gén csak a késői proliferatív (Ib) stádiumban aktiválódik. A hipertróf stádiumban a porcfehérje gének kikapcsolnak és a II. stádiumra jellemző X. kollagén, alkalikus foszfatáz, stb. termelése és Ca-foszfat lerakódás indul meg. A mineralizálódott porcba erek lépnek be és chondroclastok érkeznek, melyek az előző porcos állomány nyomait számolják fel. A vérárammal érkező további mesenchymalis sejtek osteoblastokká differenciálódnak és megkezdődik a csontállomány létrehozása. Az embrionális életet követően a porcszövet csak néhány helyen marad meg a szervezetben (ízületi felszínek, gégefő, fül). A pubertás kor végéig a hosszú csöves csontok végein lévő növekedési korongok is megőrzik porcos állományukat, lehetővé téve ezzel a hosszanti növekedést. A porcsejtek a növekedési korongokban megismétlik az embrionális fejlődés lépéseit és az egyes differenciálódási stádiumoknak megfelelően zónákba rendeződnek.

A vázfejlődés rendkívül szigorú térbeli és időbeli szabályozás alatt áll. Az utóbbi években jelentősen gyarapodtak ismereteink azokról a jelző molekulákról, hormonokról, melyek szerepet játszanak a végtagfejlődés kezdeti lépéseinek szabályozásában. Morfogének és egyéb szekretált faktorok, mint az Ihh (Indian hedgehog), a Shh (Sonic hedgehog), a BMP (Bone morphogenetic protein), a TGF- β és a PTHrP (parathyroid hormonnal rokon peptid) receptorok közvetítésével szabályozzák a vázfejlődést (18,19). A receptorokról beérkező jelet másodlagos hírvivők közvetítik a sejtmagba, ahol transzkripciós faktorok útján történik a gének szelektív be- illetve kikapcsolása. Közismert a retinasav, számos hormon (ösztrogén, tiroxin) és növekedési faktor (pl. IL-1) szerepe is, de ezen molekulák hatásmechanizmusáról keveset tudunk. A végtagfejlődésben számos transzkripciós faktor szerepét írták le (20,21,22), de a chondrogén vázfejlődés mögött álló transzkripciós szabályozásról viszonylag keveset tudunk. Eddig csupán két transz-aktiváló faktornak (Sox9, Cbfa1) bizonyították a porc differenciálódásban betöltött szerepét (22).

A Sox9 a HMG-boxot tartalmazó faktorok családjába tartozik és expressziója már a chondro-progenitor sejtekben megkezdődik. A Sox9 gén mutációja emberben súlyos vázfejlődési rendellenességgel és nemiség megváltozással járó, halálos fejlődési rendellenességet okoz (23). A Sox9 $-/-$ embrionális őssejtek segítségével kialakított kiméra egerekben már a chondrogén vázfejlődés első fő lépése – a mesenchimalis sejtek kondenzációja – sem történik meg és a porcfehérje gének sem kapcsolnak be (23). Olyan egerekben, ahol a Sox9 ektopikusan is megnyilvánul, a II. kollagén (*Col2a1*) gén terméke is detektálható (24). A Sox9 transzkripció faktor, csupán szerkezeti szerepet betöltő, aktivációs doménnel nem rendelkező L-Sox5 és Sox6 HMG fehérjékkel együttműködve kötődik a II. kollagén enhanceréhez (25), mely 4 kópiában beépítve transzgenikus egerekbe a riporter gén porcspecifikus kifejeződését eredményezi (26). Az L-Sox5, Sox6 kettős kiütése transzgenikus egerekben szintén a porcdifferenciálódás zavarát okozza, továbbá megakadályozza a matrilin-1 gén bekapcsolását és a többi porcfehérje génjét (27).

A Cbfa1 transzkripció faktor a chondrocyták és az osteoblastok progenitor sejtjeiben kapcsol be először, majd időlegesen felfüggeszti működését és később a korai hypertróf és hypertróf porcsejtekben újra aktiválódik. Cbfa1 $-/-$ egerekben a chondrogenesis és az osteogenesis folyamata egyaránt sérülést szenved. Transzgenikus egér modellben vizsgálva, a Cbfa1 ektopikus kifejeződése a porcsejtek korai hypertrofizálódásához vezet (28).

2.3 A TRANSZKRIPCÍÓS SZABÁLYOZÁS

Számos gén megnyilvánulásában jut kulcsszerephez a transzkripció szintjén történő szabályozás. A megfelelő *cis* DNS elemek és az azokhoz kapcsolódó transzkripció faktorok optimális kombinációja és kölcsönhatása biztosítja, hogy az adott génről átíródó pre-mRNS a megfelelő időben és mennyiségben álljon a sejt rendelkezésére. A *cis* hatású szabályozó régiók közé soroljuk a promotereket, és enhancereket és silencereket. Ezekben az elemekben közös, hogy szekvencia-specifikus DNS-kötő fehérjék felismerő helyeit hordozzák.

2.3.1 Promoterek és enhancerek

A promoterek olyan szakaszai a géneknek, amelyek az átírás kezdőpontjától 5' irányban helyezkednek el és amelyekhez az RNS polimeráz II komplex specifikus módon kötődik. Funkciójukat tekintve meghatározzák az adott gén átírásának helyét, irányát és gyakoriságát. Új irodalmi adatok alapján megkülönböztetünk proximális és ún. „core”

promotert (29). A core promoter nem több, mint ~100 bázispáros szakasz, amely magában foglalja az átírás kezdőpontját és *cisz* elemei révén szerepet játszik annak definiálásában. A core promoter *cisz* elemei közé tartozik a TATA motívum, az initiator (Inr) és az ún. downstream promoter elem (DPE) (30). Ezek az elemek kötőhelyet biztosítanak a formálódó transzkripciós iniciációs komplex alapfehérjének (31). A proximális promoter a transzkripciós egység előtt ~100-400 bp-ral helyezkedik el. Szintén rövid DNS elemekből épül fel, amelyek szekvencia-specifikus kötőhelyet biztosítanak egyfelől általános, másfelől szövetspecifikus aktivátoroknak és represszoroknak. A proximális promoter elemek a hozzájuk kötődő transzkripciós faktorok révén a távoli enhancerek és silencerek hatását is közvetítik, azaz a transzkripció idejét és gyakoriságát hivatottak meghatározni.

Az enhancerek és silencerek a szövet és fejlődési állapot-specifikus génexpresszió kulcselemei, hatásukat távolságtól és orientációtól függetlenül képesek kifejezni. Az enhancerek elhelyezkedésük alapján állhatnak a gén előtt (32) és után (33), de nem ritka az olyan eset sem, amikor introni régióban lokalizáltak (34). Az enhancer promotertől való távolsága többnyire néhány kilobázis (kb), de meghaladhatja akár a több száz kb-t is (35). Az enhancerek rendszerint több transzkripciós faktor kötőhelyének együtteséből épülnek fel, ezek a *cisz* elemek (enhancer-ok) sorrendjükben és egymástól való távolságukban szigorúan meghatározottak. Az enhancerokon szerveződő makromolekuláris komplexumban, összetett DNS-fehérje és fehérje-fehérje típusú kölcsönhatások biztosítják a funkcionális enhancer kialakulását.

Az enhancer hatás magyarázatára két modell létezik (36). Az ún. „mérték” modellt olyan tranziens expressziós kísérletek alapozták meg, amelyekben összehasonlították egy virális enhancert hordozó és egy csupán promoter régióval rendelkező minigén konstrukciónak sejt kultúrában mért aktivitását. Az enhancerrel rendelkező konstrukció esetében magasabb riporter génműködést detektáltak. E jelenség mögött azt az okot feltételezték, hogy egy adott sejtben, egy adott riporter génről nagyobb *mértékben* keletkezik RNS, azaz nagyobb gyakorisággal íródik át. A „valószínűség” modell alkotói olyan adatokat vettek figyelembe, amelyek az előzővel lényegében azonos kísérleti rendszerből származtak, azonban – a technika fejlődésének köszönhetően – már az egyes sejtekben külön-külön mért aktivitásokat tükrözték. Ezek a mérések viszont azt mutatták, hogy az egyes sejtekben detektált aktivitások nem tértek el egymástól a promoteres és az enhancerrel kiegészített minigének esetén. A jelentős különbség a riporter génaktivitást mutató sejtek számában volt. Tehát, az enhancer ebben a kísérleti rendszerben nem az átírás mértékét, illetve annak gyakoriságát emelte meg, hanem annak a *valószínűségét*, hogy egy sejtben az adott

minigénről transzkripció történjen. A két modell látszólag kölcsönösen kizárja egymást, de megfelelő kísérleti rendszer alkalmazása esetén ez az ellentmondás feloldható (37). Génkiütéses transzgenikus egér kísérletekben azt találták, hogy az enhancer anti-represszor működése („valószínűség” modell) autonóm és független tulajdonsága az enhancernek, míg az adott gén transzkripció gyakoriságának szabályozása („mérték” modell) nem független az enhancer natív, eredeti genomi környezetétől.

2.3.2 A transzkripció faktorok

A transzkripció faktorok közül sok általánosan előfordul a különböző sejtekben, míg másokra az jellemző, hogy a sejteknek csak egy szűk csoportjában vannak jelen. Utóbbiaknak a szövet-specifikus szabályozás kialakításában van fontos szerepe. Igen gyakori a faktorok közötti együttműködés, a dimerizáció. A különböző faktorok kölcsönhatása, heterodimer képzése jelentősen megnöveli a variációs lehetőségeket, ami a gének még finomabb hangolását teszi lehetővé. A transzkripció faktorok további igen fontos jellegzetessége, hogy moduláris felépítésűek, azaz önálló funkcionális egységekből épülnek fel. Többségük egyaránt rendelkezik DNS-felismerő, aktivációs és dimerizációs doménnel. A *transz*-aktiváló faktorok végső célpontjai az egyes szignál transzdukciós utaknak, ilyen módon lehetséges, hogy az adott sejtben mindig az aktuális környezeti, illetve differenciációs állapotnak megfelelő legyen a gének expressziós mintázata. A jelenleg ismert transzkripció faktorok száma több százas nagyságrendű, ezért a továbbiakban azokkal a faktor családokkal kívánok foglalkozni, amelyek érintettek a matrilin-1 gén regulációjában.

2.3.2.1 *SOX* faktorok

A SOX fehérjék a HMG (high-mobility group) domént hordozó transzkripció faktorok közé tartoznak. A család, a nevét a SRY fehérje (Sex-determining region on Y chromosome) után kapta (SOX: Sry-related HMG box). Azok a transzkripció faktorok tartoznak a SOX fehérjék családjához, amelyek >50% hasonlóságot mutatnak HMG doménjükben a SRY faktorra. A családon belül a HMG doménnel való hasonlóság alapján több alcsaládot is kialakítottak, amely csoportokon belül a homológia gyakran kiterjed a HMG doménon kívüli régiókra is (38). A SOX fehérjék a HMG doménjük révén gyenge szekvencia-specifitású kapcsolatot létesítenek a DNS kis árkával, aminek következtében erősebben képesek meghajlítani azt, mint a nagy árokhoz kapcsolódó „klasszikus”

transzkripciós faktorok. A kis árokkal történő kölcsönhatás - más részről - 2-3 nagyságrenddel gyengébb ($K_d = 10^{-8}$ - 10^{-9} M), mint más transzkripciós faktorok esetében ($K_d = 10^{-10}$ - 10^{-11} M). A SOX fehérjék erősen konzerválódott HMG doménjük miatt hasonló DNS motívumokat ismernek fel: A/TA/TCAAA/TG (38). A Sox fehérjék közül csak néhánynak (pl. Sox9) van transzaktiváló doménje. A többi Sox fehérje úgy hat, hogy a DNS meghajlítása révén más transzkripciós faktorok kötődését segíti elő. Irodalmi adatok bizonyítják, hogy a különböző sejtdifferenciálódási folyamatokban szerepet játszó SOX-ok egymás között nem felcserélhetőek, azonban a közeli rokon fehérjék (azonos alcsaládba tartozó tagok) között még nem világos, hogy adott esetben melyik jut szerephez (40). A SOX-ok gyenge DNS-kötő képességéből és a hasonló felismerő motívumból eredő specifikációs probléma megoldására egy lehetséges megoldás az, hogy más transzkripciós faktorokkal együtt, kölcsönhatásban lépnek működésbe (41,42,43).

2.3.2.2 Ösztrogén receptor család (44)

A különböző jelző molekulák mellett a szteroid/thyroid hormonok fontos szerepet játszanak az endochondriális csontképződésben. A belső elválasztású mirigyekben termelődő hormonok a véráram révén jutnak el a sejtekhez, majd kötődésükkel aktiválják a citoplazmában inaktív apoprotein formában jelen levő receptorokat. Hormon hiányában az ösztrogén receptorok monomer formában a citoplazmában fordulnak elő. A hormonnal való találkozásig a hsp90 és p23 fehérjék tartják a receptort inaktív állapotban. A ligand kötődését követően a receptor konformáció változáson megy át, és felszabadulva a citoplazmatikus komplexumból a sejtmagba jut, ahol közvetve vagy közvetlenül létesít kapcsolatot a megfelelő cisz DNS motívummal (ERE). Az ösztrogén receptor homo- és heterodimer formában egyaránt kötődhet az ERE-hez. A heterodimer képzés esetén igen változatos a potenciálisan kölcsönható partnerek listája. A DNS-hez kötött ösztrogén receptor dimer koaktivátor fehérjék segítségével fejti ki hatását a kromatin állományra, illetve a formálódó preiniciációs komplexre.

2.3.2.1 CTF/NF-I család

Az NF-I (Nuclear Factor I) vagy CTF (CAAT box transcription factor) DNS-kötő fehérje család tagjairól ismert, hogy szerepet játszanak DNS vírusok replikációjában (45), valamint virális és eukaryota sejtek génexpressziójának transzkripciós szinten történő

szabályozásában (17,46). Gerincesekben négy független gén (NFI-A, NFI-B, NFI-C és NFI-X) kódolja az egyes családtagokat. A négy NFI/CTF gén expressziós mintázata az egyedfejlődés folyamán sok helyen átfed egymással (47). Az NFI/CTF fehérjék gén regulációban betöltött szerepét még összetettebbé teszi az a tény, hogy igen erős alternatív splicing jelenség jellemzi valamennyi gént. Az egyes NFI/CTF fehérje változatok az N-terminálisukon elhelyezkedő DNS-kötő/dimerizációs doménjük segítségével, dimer formájában képesek a felismerő helyhez (TTGGCN₃GCCAA) specifikusan kötődni. A faktorok C-terminális részére *in vitro* és *in vivo* kísérletekben transzaktivációs domént térképeztek (48,49). A transzaktivátor domén képes kölcsönhatni az iniciációs komplex alap fehérjéivel (50,51), a represszáló nukleoszómák egyes tagjaival (48,52) és más koaktivátor/transzkripció faktorokkal (53, 54).

2.4 POSZT-TRANZKRIPCIÓS SZABÁLYOZÁS

Eukaryota szervezetekben a génexpresszió befolyásolásának egy másik lehetséges módja a poszt-transzkripció szintjén történő szabályozás. A pre-mRNS-ek funkcióképes, végleges formájáváérésük során jelentős mértékben módosulnak (55). Ezen módosulások egyike, amikor a primer transzkriptumból az intronok kivágódnak, illetve az exonok vágott végeinek összekapcsolásával ismét egyesülnek (ún. splicing). A splicing folyamatának felderítése, komponenseinek azonosítása az elmúlt évtizedben jelentősen felgyorsult.

2.4.1 A pre-mRNS érés *cisz* elemei és *transz*-faktorai

A splicing jelenség felfedezését követő évben már az intronok egy közös szekvencia tulajdonságát is leírták (56): a vágási helyek (exon-intron határok) meghatározásában szigorúan konzervált *cisz* szekvenciák jutnak szerephez. Az eukaryota intronok szekvenciája 5' GT-vel kezdődik és 3' AG-vel végződik (57). Ezt a Chambon-féle "GT-AG" szabályt a fehérjekódoló gének intronjai körében általános érvényű dogmának ismerték el a tudományos közvélemény, s az igen ritkán előforduló eltéréseket (például T helyett C) a szabályt erősítő kivételnek tekintették (58). Sőt az exon-intron határok hasonlósága a szomszédos nukleotidokra is kiterjed, így az esetek több, mint 99 %-ában az intron 5'-végén az AGgta/gagt, míg 3'-végén a (t/c)₆ncagG motívum található (nagy betűvel jelölve az exonra és kis betűvel az intronra eső nukleotidokat). A 3' vágási hely abszolút konzervált AG dinukleotidja előtt 18-38 nt távolságban, az ún. elágazási helyen, található egy másik, az előbbinél kisebb mértékben

konzervált konszenzus szekvencia (tncat/gac emlősökben). A pre-mRNS-ek hasítása egy nagy RNS-fehérje komplexben (spliceosoma) történik, melynek komponensei a kis nukleáris ribonukleoproteinek (snRNP-k) és egyéb *transz* hatású fehérje faktorok (59). A pre-mRNS-en fokozatosan, több lépésben alakul ki a spliceosoma, aminek során a kis nukleáris RNS-ek (snRNS) bázispárosodás révén felismerik a konzervált szekvencia motívumokat. Az első lépésben az intron 5' végéhez kapcsolódik az U1 snRNP, majd az elágazási hely közelében bekötődik egy fehérje faktor (59), mely az U2 snRNP belépését segíti elő a komplexbe. A későbbiek során még további snRNP-k (U5-U4/U6) és faktorok lépnek a komplexbe, és szigorú koreográfia szerint két transzészterifikációs lépésben megtörténik az intron lasszó kihasadása és a két exon összekapcsolódása. A spliceosomában kialakuló RNS-RNS és RNS-fehérje kölcsönhatások nagyfokú konzerváltságot mutatnak. Ezen tények alapján az a kép alakult ki, hogy valamennyi pre-mRNS érésében egy olyan komplex vesz részt, melynek elemei azonosak és azok a primer transzkriptum konszenzus szekvenciáinak alapján szerveződnek.

Újabb adatok azonban meglepő módon azt mutatják, hogy eukaryotákban létezik egy, a fentiektől eltérő splicing rendszer is. Az első publikációt, amely a "GT-AG" szabálytól merőben eltérő intron kivágódási szekvenciákról tudósít, csoportunk munkatársai közölték 1989-ben (15), és az eltérés olyan mértékű volt, hogy erősen megkérdőjelezte az univerzálisnak tartott splicing mechanizmus szerepét. A különös intron a csirke matrilin-1-et kódoló génben fordul elő hagyományos intronok társaságában. Azóta számos génről vált ismertté, hogy tartalmaznak ilyen ritkán előforduló új típusú intronokat (60). A szekvencia adatok birtokában az új típusú, ún. "AT-AC" intronok esetén is lehetővé vált konszenzus szekvencia megállapítása az intron mindkét végén (5' ataccctt....c/tccac 3'), valamint a 3' vég előtt 10-13 nukleotid távolságra feltételezett elágazási helyen (tccttaac) (61). A hagyományos és új típusú introni konszenzus szekvenciák között az eltérés olyan mértékű, hogy az általánosan ismert splicing mechanizmus nélkülözhetetlen elemei (U1 és U2 snRNS) nem játszhatnak szerepet az ilyen típusú intronok eltávolításában. Számítógépes analízisek révén két olyan minor snRNS került előtérbe, melyek bázispárosodást alakíthatnak ki az "AT-AC" intronok konszenzus szekvenciáival, így kiválthatják, illetve helyettesíthetik a splicing reakcióban az U1 és U2 snRNS-t (62). Ezek az U11 és U12 minor snRNS-ek, amelyek azonosítása és szerkezeti analízise (61) az elmúlt 5-7 év snRNS kutatásának eredménye. A komputeres predikció alapján elvégzett *in vitro* és *in vivo* kísérletek (62,63) alátámasztották a feltevés helyességét, és bizonyítják, hogy az AT-AC intronon szerveződő spliceosoma további specifikus snRNS komponenseket tartalmaz (64).

2.4.1 Exon definíciós modell

Az nyilvánvaló, hogy az intronok végein konzerválódott rövid szekvencia motívumok szükségesek, de - minden bizonnyal - nem elégséges feltételei az intronok pontos eltávolításának. Ezek a *cis* elemek nem önmagukban hatnak, hanem többségük együttműködik, így növelve meg a rendszer specifikusságát. Az exon definíciós modell (65) szerint az exonok két oldalán található *cis* elemek, illetve az azokhoz kapcsolódó fehérje faktorok feladata a pre-mRNS templáton kijelölni a spliceosoma kialakulásának helyét. A rövidebb intronok felismerése történhet az intron definíciós modell segítségével is. A splicing mechanizmus pontosságát gyakran a fenti elemeken kívül további szekvenciák módosítják. Ezek a splicing enhancerek introni és/vagy exoni régióban egyaránt elhelyezkedhetnek, és a szövet- és fejlődésiállapot-specifikus RNS-érés igen fontos összetevői (66).

A transzkripció és az RNS-érés szintjén történő génregulációnak egyaránt fontos szereplői azok a *cis* elemek és *transz*-aktiváló faktorok, amelyek a szövet- és fejlődésiállapot-specifikus gén kifejeződés mögött állnak. A két különböző regulációs szinten, lényegében azonos elvek szerint szerveződnek nukleoprotein komplexek, amelyek - optimális esetben - a mindenkori igényeknek megfelelően alakítják át a gének expressziós mintázatát.

A disszertációmban a csirke matrilin-1 gén korrekt megnyilvánulásában fontos szerepet játszó nukleoprotein komplexek összetételét és funkcionális analízisét kívánom ismertetni.

3. CÉLKITŰZÉSEK

A chondrogenesis minden lépése rendkívül szigorú térbeli és időbeli szabályozás alatt áll, az egyes fejlődési stádiumokat jellegzetes génexpressziós mintázatok jellemzik. A porcspecifikus génexpresszió tanulmányozása elősegíti azoknak a molekuláris mechanizmusoknak a feltárását, amelyek felelősek a porcfehérje gének be- illetve kikapcsolásáért. A gének bekapcsolásában kulcsszerepet játszanak azok a nukleoprotein komplexek (enhanceosomák), amelyek a DNS, illetve az RNS *cis* motívumai alapján szerveződnek. Kísérleteinkben a csirke matrilin-1 gén transzkripció és poszt-transzkripció szabályozásában fontos nukleoprotein komplexek analízisét tűztük ki célul. Céljaink konkrét megfogalmazásánál célszerű a két szabályozási szinttel külön foglalkozni.

A *transzkripció szintet* érintő kutatásainkban választ kerestünk arra a kérdésre, hogy hol helyezkednek el azok a régiók, amelyek felelősek lehetnek a gén szövetspecifikus kifejeződéséért. Célunk volt olyan konkrét *cis* DNS elemeknek és az azokhoz kapcsolódó transzkripció faktoroknak az azonosítása, amelyek a porcspecifikus kifejeződéséért felelős régiókhoz kötődnek. Továbbá jellemezni kívántuk ezeknek az elemeknek és faktoroknak az egymáshoz való viszonyát.

A *poszt-transzkripció* szabályozás egyik lehetséges pontja az, amikor a pre-mRNS-en az eltávolításra kerülő szekvenciák (intronok) kijelölése megtörténik. Az erre vonatkozó ismereteink meglehetősen hiányosak és az összegyűlt információnak döntő hányada *in vitro* rendszerben végzett kísérletekből származik. A téma kutatására használt *in vivo* rendszerek meglehetősen bonyolultak, több lépcsős összetett módszerekkel dolgoznak. Célunk egy olyan *in vivo* modell rendszer létrehozása volt, melynek segítségével egyszerűen és gyorsan szövetkultúrában tanulmányozhatjuk az intronok kivágódását és vizsgálhatjuk az egyes *cis* RNS elemek szerepét a splicing folyamatában.

Célkitűzéseinket az alábbi kísérletek elvégzésével kívántuk megvalósítani:

1. Olyan speciális plazmidkonstrukciók előállítását terveztük, amelyek a matrilin-1 gén promoterét és reguláló hatásának feltételezett szakaszait tartalmazzák megfelelő riporter gén (CAT) előtt. A konstrukcióknak különböző eredetű sejtekbe juttatásával és a riporter génaktivitás mérésével kívántuk meghatározni a kérdéses szabályozó régióknak a saját promoter működésére gyakorolt aktiváló vagy gátló hatását.

2. Reméltük, hogy az azonosított reguláló hatású DNS szakaszhoz sikerül kimutatnunk sejtmagi fehérje kivonatból származó faktorok kötődését, amelyeknek szerepe lehet a matrilin-1 gén szabályozásában.
3. DNS-fehérje és fehérje-fehérje kölcsönhatás vizsgálatára alkalmas módszerekkel kívántuk a reguláló régiókon formálódó nukleoprotein komplexek összetételét jellemezni.
4. Az *in vitro* módszerekkel nyert adataink valódiságát – a lehetőségekhez képest - *in vivo* körülmények között kívántuk megerősíteni.
5. Az AT-AC intron kivágódásának tanulmányozására olyan *in vivo* modell rendszert (minigént) kívántunk kifejleszteni, amelyben könnyen mérhető aktivitású prokaryota génbe (CAT) egy eukaryota intront (AT-AC) építünk, ezúton kialakítva egy mesterséges eukaryota minigént. Terveink szerint erről a minigénről, akkor és csak akkor keletkezik működő CAT fehérje, amennyiben a kivágódás tökéletesen lezajlik.
6. A mesterséges eukaryota minigén felhasználásával olyan RNS szakaszok funkcionális analízisét céloztuk meg, amik hatással vannak az AT-AC intron eltávolításának hatékonyságára.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 ANYAGOK

4.1.1 Vegyszerek és enzimkészítmények:

Az általánosan használt laboratóriumi vegyszerek kereskedelmi forgalomban beszerezhető SIGMA, FLUKA, MERCK és SERVA készítmények voltak.

Analitikai és preparatív DNS hasításhoz a Fermentas cég restrikciós endonukleázait használtuk. Az egyéb DNS modifikációs enzimeket szintén a Fermentas cégtől szereztük be.

4.1.2 Radioaktív készítmények:

A radioaktív jelölésekhez használt α - ^{32}P dCTP és γ - ^{32}P ATP az Izinta által forgalmazott preparátum volt. A CAT assay-hez használt ^{14}C -jelölt kloramfenikolt az Amersham-től rendeltük.

4.1.3 Baktérium törzsek:

- **DH5 α F**- recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F ϕ proAB lacIqZDM15] Rutin klónozáshoz használtuk.
- **BL21-CodonPlus(DE3)-RIL**: E. coli B F $^{-}$ ompT hsdS(rB $^{-}$ mB $^{-}$) dcm $^{+}$ Tetr gal λ (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Camr]

4.1.4 Plazmidvektorok:

- pBluescript II SK(+): (Stratagene) , rutin klónozáshoz használtuk.
- pCAT3[®]Control Vector: (Promega) , tranziens expressziókban használtuk.

4.1.5 Tápoldatok eukaryota sejtekhez:

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), Nutrient Mixture F-12 HAM tápfolyadékokat a SIGMA cégtől vásároltuk. A SIGMA és GIBCO cégek által forgalmazott újszülött borjú szérumokat használtunk a tápoldatokban.

4.2 MÓDSZEREK

4.2.1 Molekuláris klónozások:

A DNS hasításokat és egyéb általános DNS modifikációs lépéseket a „Molecular Cloning” című szakkönyvben (66) megadottak szerint végeztük.

4.2.2 Polimeráz láncreakció (PCR):

A reakciókhoz Taq, vagy Pfu polimerázt használtunk, általában 2.5 U enzim/50 µl reakció térfogat hígításban. „Hot start”-ot csak a Pfu polimeráz esetében alkalmaztunk.

A ciklus a következő lépésekből állt:

- 30-60 sec denaturáció 94°C-on
- 30-60 sec „annealing” 53-56°C-on
- 30-60 sec szintézis 72°C-on.

A szintézis idejét úgy állapítottuk meg, hogy 1000 bázispáronként 1 percet számoltunk. 30-35 ciklust futtatunk egy reakcióban.

- Taq polimeráz puffer: 10 mM Tris pH 9, 5 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Triton-X.
- Pfu polimeráz puffer: 20 mM Tris pH 8.8, 10 mM KCl, 10 mM NH₄(SO)₄, 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton-X.

Reakciónként 200 µM dNTP mixet és 0.5 pmol/µl koncentrációjú primereket használtunk.

4.2.3 DNS-ek radioaktív jelölése:

Az EMSA (Electromobility Shift Assay) kísérletekben használt oligonukleotidok jelöléséhez T4 polinukleotid kinázt használtunk, míg az *in vitro* footprint kísérletekhez felhasznált DNS fragmentumokat az *E. coli* DNS polimeráz Klenow fragmentumával végjelöltük. A jelöléseket a „Molecular Cloning” című szakkönyvben (66) megadottak szerint végeztük. A radioaktívan jelölt DNS-t a be nem épült nukleotidoktól Sephadex G50 gélkromatográfiával választottuk el.

4.2.4.1 Az introni deléción sorozat előállítás:

A sorozat egyes tagjait olyan genomiális szubklónból készítettük, amelyik a csirke matrilin-1 gén promoter régiójával, első exonjával és első intronjával fedett át. A különböző

fragmentumokat a restrikciós hasításokat követően végkezeltük úgy, hogy kompatibilis végeket kapjunk a klónozó vektor hasított végeivel. Valamennyi konstrukciónkat olyan vektorba építettük (pCMP.CAT.N(-15)), amiben a matrilin-1 gén minimál promotere hajtotta a CAT riporter gént. A fragmentumokat a promotertől 5' irányba építettük.

pCMP.CAT.N(-15).Ha: az introni HaeII (+230)-(+994) fragmentumot hordozza.

pCMP.CAT.N(-15).B(+),(-): az introni Bgl I (+405)-(+1221) fragmentumot hordozza.

pCMP.CAT.N(-15).PB1(+): az introni PstI-BglI (+578)-(+1221) fragmentumot hordozza.

pCMP.CAT.N(-15).PPv(+): az introni PstI-PvuII (+578)-(+826) fragmentumot hordozza.

pCMP.CAT.N(-15).PB2(+): az introni PstI-BglI (+966)-(+1211) fragmentumot hordozza.

pCMP.CAT.N(-15).BPv(+)(-): az introni BglI-PvuII (+405)-(+826) fragmentumot hordozza.

pCMP.CAT.N(-15).PvB(+): az introni PvuII-BglI (+826)-(+1221) fragmentumot hordozza.

4.2.4.2 TB36 előállítás:

PCR segítségével amplifikáltuk az első intron +874 és +976 szakaszát, a felszaporított régiót pBluescriptSKII(+) vektor *EcoRV* helyére klónoztuk, majd ezt a 102 bp-os introni enhancer szakaszt 4 tandem kópiában a minimálpromoteres CAT konstrukció *HindIII* helyére illesztettük.

4.2.4.3 TO50 (NF-I mutáns) előállítás:

Az előző konstrukcióhoz (TB36) hasonlóan készült, azzal az eltéréssel, hogy a PCR reakcióban olyan oligonukleotidot (IE1m1) használtunk, ami pontmutációt hordozott az NF-I kötőhelyében. Valamennyi klónunkat, amelyek PCR felhasználásával készültek nukleotidszekvencia analízisnek vetettük alá.

4.2.4.4 Mesterséges eukaryota minigének előállítás:

Valamennyi általunk készített konstrukciónak a kereskedelmi forgalomban kapható pCAT[®]3 Control Vector (Promega) képezte az alapját. Ez a plazmidvektor hordozza az SV40 vírus transzkripció szabályozásában és pre-mRNS érésében fontos régióit (promoter, enhancer ill. polyadenilációs szignál). A magas szintű riporter génexpresszió érdekében "gyárilag" egy mesterséges GT-AG intront is beépítettek a CAT gén elé. Az AT-AC intron beépítésére a CAT gén egyedi *PvuII* restrikciós hasítóhelyét használtuk fel. A különböző hosszúságú deléciós

fragmentumokat PCR technikával készítettük az AT-AC intronról, a következő két oligonukleotid segítségével: 5'-ATATCCCTTTTGGAAGGCTCTTTGTTCA-3' és 5'-GTGAGTGAGAGTTAAGGAGAAAAATG-3'. A PCR reakcióhoz *Pfu* polimerázt használtunk, ami nem épít be extra A-t a fragmentum 3'-végére. A rekombináns plazmidokban az illesztés pontosságát szekvencia analízissel ellenőriztük.

4.2.5 Sejtkultúrák:

- *Csirke primer fibroblast (CEF)* kultúrát 8-10 napos embrióból készítettünk (17). Tripszines emésztéssel felszabadított fibroblastokat gyűjtöttük, majd kilemeztük őket. Másnap ismét tripszineztek a kultúrát és 5×10^6 sejtet lemeztünk 6 cm-es átmérőjű Petri csészére. A sejteket 5% szérummal kiegészített DMEM tápoldatban tartottuk.

- *Csirke primer chondrocyta (CEC)* kultúrát 14.5 napos embrióból készítettünk (17). Az embriókból a porcok sternumot kioperáltuk, majd kollagenázos emésztéssel sejtekre disszociáltuk. Másnap 7.5×10^6 - 1×10^7 sejtet lemeztünk 6 cm-es átmérőjű Petri csészére. A sejteket 10% szérummal kiegészített DMEM tápoldatban tenyésztettük.

- *Nagy denzitású mesenchyma (HDM)* kultúra: 4.5 napos csirke embriók végtagkezdeményéből tripszines emésztéssel chondroprogenitor sejteket preparáltunk és 5×10^6 sejtet lemeztünk 35 mm átmérőjű Petri csészére. A sejteket 10% szérummal kiegészített F-12 HAM: DMEM tápoldatok 6:4 arányú keverékében tenyésztettük.

- *COS-7* sejteket 10% szérummal kiegészített DMEM tápoldatban tenyésztettük.

4.2.6 Tranzien expressziós és kotranszfekciós kísérletek:

5×10^5 COS-7 sejtet 80%-os konfluenciánál DEAE-Dextran módszerrel (66) transzfektáltunk, alkalmanként 1 μ g teszt plazmidot, 100 ng NF-I és 500 ng SOX9 expressziós plazmidot használtunk. A pGL3 Control Vector-t (Promega) használtuk minden esetben belső kontrollként a transzfekció hatásfokának ellenőrzésére.

Valamennyi transzfekciós kísérletet 3-5 alkalommal, legalább két független preparálásból származó plazmiddal megismételtük.

A CEC, CEF és HDM kultúrák transzfekciója Ca-foszfát-DNS precipitációs módszerrel történt (66).

4.2.7 Kloramfenikol-acetiltranszferáz enzim aktivitásának mérése (CAT assay):

48 órával (96 órával a HDM esetén) a transzfekció után a sejteket 250 mM pH 7.5 Tris-ben vettük fel, PBS-sel történt mosás után. Háromszori olvasztás (37°C) és fagyasztás (-80°C) után a sejtlizátumot hőinaktiváltuk, a deacetiláz enzimek leállítására végeztük. Centrifugálás (10000 rpm, 4°C, 10 perc) után a felülúszóhoz reakciónként 20 µl acetil-CoA-t (3.5mg/ml), és 25 nCi [¹⁴C] kloramfenikolt adtunk. 3 óra reakció után a terméket etil-acetáttal extraháltuk és vékonyréteg kromatográfiával elválasztottuk. A CAT aktivitását Phosphorimager 445SI (Molecular Dynamics) segítségével hívtuk elő és kvantitáltuk.

4.2.8 Sejtmagi kivonatok tisztítása:

A DNS-fehérje kölcsönhatás vizsgálatára alkalmas extraktumokat bizonyos esetekben szukróz párnán keresztül tisztított CEF és RCS sejtmagokból nyertük (17). Röviden: a sejtmagokból 530 mM, illetve 350 mM NaCl tartalmú oldattal kioldottuk a transzkripció faktorokat, majd ammónium-szulfátos kicsapást alkalmaztunk és dializáltuk a megfelelő pufferrel szemben a preparátumunkat. A sejtmagi kivonatok folyékony N₂-ben hirtelen lefagyasztottuk és -80 °C-on tároltuk felhasználásig.

Amennyiben DNaseI footprint kísérlethez tisztítottuk az extraktumot, akkor heparin-agaróz oszlopra is felkötöttük, majd lineáris 0.1-1.0 M KCl gradienssel eluáltuk. A frakciókat az eluciót követően bekoncentráltuk (17), folyékony N₂-ben lefagyasztottuk és -80 °C-on tároltuk felhasználásig.

Az EMSA kísérleteink nem igényeltek az előzőhöz hasonló, nagy tisztaságú sejtmagi kivonatot, ilyen esetekben egy másik módszert használtunk. A következő módszerrel tisztítottunk fehérjét CEF, CEF, RCS és HDM sejtekből. A sejteket mostuk jéghideg PBS-sel, majd 500 µl 20 mM HEPES-t pH 7.9, 350 mM NaCl-t, 0.5 mM EDTA-t, 0.5 mM EGTA-t, 2 mM DTT-t, 1% Nonidet P-40-t, 0.2 mM PMSF-t tartalmazó oldatot adtunk a sejtekhez és jégen 30'-et inkubáltunk. A kromatintól a sejtmagi kivonatot 5 perces 20,800xg -vel történő fugálással tisztítottuk meg. A felülúszóhoz glicerint adtunk (végkonc. 10%) és kisadagokban, gyorsan folyékony N₂-ben lefagyasztottuk, majd -80 °C-on tároltuk felhasználásig.

4.2.9 EMSA és Supershift kísérletek:

A jelölt ds oligonukleotidokat sejtmagi kivonattal 10 percig jégen inkubáltuk 100 ng poly(dG-dC)poly(dG-dC) és különböző mennyiségű hideg kompetitor jelenlétében, a következő *in vitro* körülmények között: 20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 50 mM KCl, 3.5 mM DTT,

0.2 mM EDTA, 4mM MgCl₂, és 2% ficoll tartalmú oldatban. Egy reakcióhoz 10-20 fmol jelölt próbát adtunk és további 30 percig 30 °C-on inkubáltuk a reakciót. Ezt követően előfuttatott, nem-denaturáló 5-6.6%-os polyakrilamid gélen választottuk el a mintákat, majd Phosporimager 445SI (Molecular Dynamics) műszer segítségével tettük láthatóvá a kialakult nukleoprotein komplexumok mintázatát (17).

A supershift kísérleteinkben a CTF-I C-terminálisa ellen termeltetett, NF-I specifikus antiszérumot használtunk (N. Tanese and R. Tijan ajándéka). A SOX9 ellenes poliklonális ellenanyag B. de Crombrughe és V. Lefebvre ajándéka volt.

4.2.10 *In vitro* DNase I Footprinting:

A csirke matrilin-1 gén introni szakaszával (+826-tól +966-ig) átfedő, végjelölt DNS fragmentumot inkubáltuk heparin-agaróz oszlopon tisztított sejtmagi fehérje kivonattal. Majd az előkísérletben azonosított optimális hígítású DNaseI kezelésnek vetettük alá és 2 percig 25 °C-on inkubáltuk a reakciókat. A nukleáz kezelés leállítását követően fehérjétől mentesítettük a mintákat és 6%-os polyakrilamid gélen futtattuk, szárítottuk, majd Phosporimager 445SI (Molecular Dynamics) segítségével tettük láthatóvá a DNase I védett régiókat (17).

4.2.11 *In vivo* Footprinting (34):

A CEC és CEF sejteket DMS (dimetil-szulfát), ill UV kezelésnek tettük ki, majd genomiális DNS-t tisztítottunk belőle. Az előző kezelés során modifikálódott nukleotidoknál hasítottuk piperidinnel a DNS-t, és a megfelelő 5' oligonukleotid primer hibridizálását követően T7 DNS polimerázzal a töréspontig kiegészítettük a komplementer szálát. Ehhez a tompa végű templáthoz ligáltuk a specifikus ds oligonukleotidot, majd PCR segítségével amplifikáltuk a régiót. Gélen történő elválasztás után blottoltuk nejlon membránra a fragment populációt és a régióval átfedő radioaktív próbával hibridizáltunk. Phosporimager 445SI (Molecular Dynamics) segítségével analizáltuk a kérdéses régiókat.

4.2.12 GST fúziós fehérjék termeltetése és tisztítása:

A GST-NFI és GST-SOX9 fúziós fehérjék bakteriális termeltetésére alkalmas plazmidkonstrukciókat N. Mermod és P. Berta bocsátotta a rendelkezésünkre. A plazmidokat hordozó baktériumokat 37 °C-on növesztettük 0.6 OD₆₀₀-ig, majd 1 mM IPTG-vel indukáltuk a fehérjék intenzív termelését, majd 2-4 óra múlva a sejteket begyűjtöttük. A sejtek feltárása

ultrahangos kezeléssel történt és a felülúszóból Glutationos gyönggyel tisztítottuk a GST fúziós fehérjét (42).

4.2.13 GST pull-down kísérletek (42):

A ^{35}S jelölt SOX9 fehérjét, valamint a bakteriálisan termeltetett és tisztított GST-NFI fehérjéket megfelelő körülmények között egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk. Ezután többször mostuk a gyöngyöt és végül Laemmli mintapuffer adásával eluáltuk a fehérje komplexet, denaturáló gélen (SDS-PAGE) elválasztottuk azt, ezután a gélts megszáritottuk és Phosporimager 445SI (Molecular Dinamics) segítségével tettük láthatóvá az eluált mintáinkban a ^{35}S -jelölt fehérjét.

4.2.14 Immunprecipitáció (34):

^{35}S -jelölt SOX9, L-Sox5, Sox6 és NF-I fehérjéket *in vitro* szintetizáltattuk a Promega cég „TNT Coupled Reticulocyte Lysate System” rendszerének felhasználásával, a gyártó által nyújtott útmutató alapján. A ^{35}S -jelölt fehérjéket nem-tisztított („crude”) CEC, CEF és HDM kultúrákból származó sejtmagi kivonattal inkubáltuk szobahőmérsékleten 30 percig 300 µl TBST pufferben (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 130 µM NaCl, 0.5% Tween 20), ami még 0.2% BSA-t és 50µg/ml ethidium bromidot tartalmazott. Az NF-I specifikus ellenanyag adását követően további 180 percet inkubáltuk jégen a reakciót, végül Protein-G Sepharose gyöngyöt adtunk, majd újabb 60 perces inkubáció következett. Az inkubációt követően többször mostuk a gyöngyöket TBST pufferrel. Végül Laemmli mintapuffer adásával eluáltuk a gyöngy felszínéről a fehérje komplexumot és denaturáló gélen (SDS-PAGE) elválasztottuk azt, ezután a gélts megszáritottuk és Phosporimager 445SI (Molecular Dinamics) segítségével tettük láthatóvá az eluált mintáinkban a ^{35}S -jelölt fehérjét.

4.2.15 Luciferáz enzim aktivitásának mérése:

A sejteket PBS-sel mostuk és lízis pufferben inkubáltuk először szobahőmérsékleten, majd –80 °C-on 20-20 percet. A sejttörmeléket kicentrifugáltuk és a felülúszóból luciferáz aktivitást mértünk. A méréshez szentjánosbogár luciferáz szubsztrátot (Promega) használtunk. A mintákat luminométerrel (Micro GMK) ellenőriztük.

5. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS AZOK MEGVITATÁSA

5.1 TRANZKRIPCIÓS SZABÁLYOZÁS

5.1.1 Kísérleti előzmények

Korábban tranziens expressziós módszer segítségével térképeztük a csirke matrilin-1 gén transzkripciós szabályozásban fontos szakaszait (16,17). A gén minimál promotere nem mutat szövet-specifikus működést, valamennyi vizsgált sejttípusban a hozzákapcsolt CAT riporter gén viszonylag magas, közel azonos szintű kifejeződését biztosítja. A TATA box-tól 5' irányba két pozitív és két negatív fejlődésiállapot-specifikus régiót sikerült behatárolni. Ezek az 5' szabályozó régiók úgy befolyásolják a promoter működését, hogy csak bizonyos chondrogen sejttípusokban engednek meg magas riporter gén aktivitást (17). A TATA box-hoz közeli negatív szakaszon két silencer elemet (SI és SII) azonosítottunk, amelyekhez az NF-I transzkripciós faktor családdhoz tartozó fehérjék kötődését bizonyítottuk (17).

5.1.2 A matrilin-1 gén első intronjának funkcionális analízise

A szövet-specifikus génkifejeződésért felelős régiók azonosításának céljából a matrilin-1 gén első intronját funkcionális analízisnek vetettük alá (2. ábra). Az intronból egy olyan deléciós sorozatot hoztunk létre – a rendelkezésre álló restrikciós hasítóhelyek felhasználásával –, amelynek tagjai egymással átfedtek. A sorozat elemeinek felhasználásával, olyan tranziens expressziós kísérletekben felhasználható plazmid konstrukciókat készítettünk, amelyekben a CAT riporter gén előtt a matrilin-1 gén minimál promotere szerepelt. Az introni fragmentumokat 5' helyzetbe építettük a promotertől, illetve a riporter géntől. Az elkészített plazmid konstrukcióinkat nagy mennyiségben felszaporítottuk, majd olyan sejtekbe juttattuk őket, amelyek fejlődésbiológiailag eltérő eredetűek voltak, illetve a chondrogenesis különböző fázisait reprezentálták. A HDM kultúra a chondrogenesis korai stádiumát (Ia) modellezi, míg a CEC sejtek a késői proliferatív (Ib) stádiumra jellemző jegyeket mutatnak. A transzfekciót követően a sejteket begyűjtöttük, majd a riporter génaktivitását mértük a sejtek lizátumában. CEC és HDM kultúrában sikerült azonosítani egy 634 bp-os fragmentumot, amely kiugróan magas relatív CAT aktivitást mutatott. Primer csirke porcsejtkultúrában (CEC) a mért relatív CAT aktivitás közel másfélszerese (142,3 %) volt az erős virális enhancert (SV40) hordozó kontroll plazmidénak. A chondrogenesis korai fázisának modellezését szolgáló HDM kultúrában, az előző CAT adatoknál valamivel

alacsonyabb értékeket detektáltunk (119,8 %). A két kultúra közötti ~20%-os különbség azzal magyarázható, hogy a HDM esetén kialakuló porcosodási csomópontokban a matrilin-1 gént expresszáló sejtek száma alacsonyabb, mint a CEC kultúrában. A CEC rendszerben már valamennyi sejtben megnyilvánul az endogén matrilin-1 gén, azaz azok a transzkripciós faktorok, amelyek potenciálisan kötődnek a fenti 634 bp-os enhancer régióhoz nagy mennyiségben állnak rendelkezésre. Az olyan sejt kultúrákban, amelyekben a matrilin-1 gén nem nyilvánul meg (CEF, CEM, HeLa), az azonosított enhancer nem képes a minimál promoter működését pozitívan befolyásolni (1. táblázat). Tehát, a deléciós sorozat matrilin-1-et expresszáló és nem expresszáló sejtekbe juttatása útján, egy olyan pozitív reguláló régiót (enhancert) azonosítottunk, amely chondrocyta specifikus hatást közvetít a promoter irányába, mely csak kevésbé függ a sejtek fejlődési állapotától. Az azonosított matrilin-1 enhancer lokalizációjában és porcspecifikus működésében egyaránt hasonlóságot mutat a kollagén II-es gén enhancerével (67).

5.1.3 Több transzkripciós faktor kötődik a matrilin-1 gén intoni enhanceréhez

Előzetes transziens expressziós kísérleteinkben funkcionálisan térképeztünk egy szövetspecifikus működést mutató 632 bp-os enhancert a matrilin-1 gén első intronjában. Azzal a céllal, hogy az enhancer működésében fontos *cis* elemeket és transzkripciós faktorokat azonosítani tudjuk, ún. „multiple band shift” kísérletet végeztünk, amelynek eredményeként egy olyan 271 bp-os *Hinf*I fragmentumot térképeztünk, amely igen erős kölcsönhatást mutatott a porcsejtekből készült fehérje kivonattal (3. ábra). A *cis* elemek egész pontos lokalizálásához DNaseI *in vitro* footprint technikát alkalmaztunk. Ezen kísérleteinkhez olyan részlegesen tisztított sejtmagi fehérje kivonatot használtunk, amely a génünket expresszáló (RCS) és nem expresszáló (CEF) sejt típusból származott. Az első intron +860 és +958 bp közötti szakaszán a két sejt típusban több, egymástól eltérő védettséget mutató szakaszt kaptunk (4. ábra). További analízisünkben az „IE1” jelű footprint-re összpontosítottunk, mivel ez mutatta a legerősebb védettséget az RCS extraktummal. Az IE1-es motívumot a nem expresszáló (CEF) sejtmagi kivonattal is megkaptuk (4. ábra 2. sáv), de a védettség mértéke jelentősen gyengébb volt, mint az RCS esetén. Ez a DNS-fehérje kötés erős rezisztenciát mutatott aspecifikus kompetítorral szemben (dolgozatban nem közölt adat), míg a specifikus dupla szálú IE1 oligonukleotid alkalmazása esetén már 10-szeres moláris feleslegben kititrálható volt (4. ábra, 3, 4, 9 és 10 sáv). Az „IE1” jelű footprint kialakításában szerepet játszó lehetséges faktor(ok) azonosítására először komputer programok felhasználásával tettünk kísérletet. Az alkalmazott szoftverek egy

NF-I és négy Sox-típusú transzkripciós faktor kötőhelyét jósolták a kérdéses régióban (5. ábra). A komputeres predikció állításait több irányból kívántuk ellenőrizni, illetve annak valódiságát bizonyítani.

5.1.4 Az NF-I kölcsönhat a matrilin-1 gén introni enhancerével

Az IE1-es introni enhancer szakaszt oligonukleotid formában megsztetizáltattuk, majd kompetíciós EMSA technika segítségével vizsgáltuk, hogy milyen faktorok kötődnek hozzá (6. ábra). Elsőként, CEF sejtmagi kivonattal inkubáltuk a radioaktívan jelölt IE1 oligonukleotidot, majd a natív gélen történő elválasztást követően több nukleoprotein komplex kialakulását tudtuk detektálni (6/A. ábra 2. sáv). Az oligonukleotidon formálódott DNS-fehérje komplexok specifikusságát bizonyította, hogy amennyiben hideg (nem jelölt) két fonalas IE1 oligonukleotidot adtunk feleslegben az inkubációs elegyhez, akkor valamennyi aggregátum kompetálható volt (6/A ábra 3-7. sáv). A nukleoprotein komplex formálódásában érdekelt transzkripciós faktorok azonosítása úgy történt, hogy olyan hideg ds oligonukleotidokat adtunk növekvő moláris feleslegben a kötési reakcióhoz, amik ismert transzkripciós faktorok konszenzus felismerő szekvenciáit hordozták. Abban az esetben, amikor az NF-I specifikus kompetítort adtunk moláris feleslegben, akkor a CEF eredetű sejtmagi kivonatból formálódó valamennyi komplex kititrálódását értük el (6/A ábra 8-13. sáv). Tehát, abban a sejtféleségben, amelyben a matrilin-1 gén nem nyilvánul meg, NF-I transzkripciós faktorok kötődnek a kérdéses introni *cisz* elemhez. Amennyiben az előbb ismertetett kísérleteket a matrilin-1 gént expresszáló sejttípusból (RCS) származó sejtmagi kivonattal végeztük el, akkor azt kaptuk eredményként, hogy két specifikus komplex formálódott az IE1 elemen (6. ábra B/2-7. sáv). Azaz már ezek az EMSA kísérletek is szövetspecifikus különbségeket mutattak a két sejttípus között (vesd össze: 6. ábra A/2 és B/2 sávját). Az RCS specifikus két komplex fehérje alkotói közül a lassabb mobilitású (II. komplex) a kompetíciós EMSA alapján NF-I specifikusnak bizonyult (6. ábra B/8-13. sáv). A natív gélben gyorsabban mozgó I. komplex azonban rezisztenciát mutatott az NF-I kompetícióval szemben (6. ábra B/8-13 sáv). Tehát, egy, az NF-I-től eltérő típusú DNS-kötő fehérje részvétele kezdett körvonalazódni ebben a komplexben.

5.1.5 A Sox9 faktor szintén kölcsönhat a matrilin-1 gén introni enhancerével

A fenti gyors mobilitású I. komplex alkotásában résztvevő fehérje komponens azonosítása abban az EMSA kísérletben történt meg, amikor – a komputeres predikciónak

megfelelően – kompetítorként Sox9 specifikus oligonukleotidot alkalmaztunk (7. ábra). Az előző EMSA kísérlettel összhangban a két band közül a gyorsabb mobilitású, NF-I kompetícióval szemben rezisztens maradt (7. ábra 2-5. sáv). Pontosabban, csak igen magas moláris feleslegben (1000x) adagolt NF-I specifikus ds oligonukleotid esetén volt gyengíthető a radioaktív band kialakulása (7. ábra 5. sáv). Amennyiben, ds Sox9 oligonukleotidot adtunk megfelelő feleslegben a kötési reakcióhoz, akkor az I. komplex kialakulása specifikusan gátolva volt, míg a II. komplex rezisztens maradt. Tehát, a fenti *in vitro* DNS-fehérje kölcsönhatás detektálására alkalmas technikák megerősítették azt a komputeres predikciót, amely az NF-I és Sox9 transzkripciós faktorok kötődését jósolta a matrillin-1 gén introni enhancerének IE1-es eleméhez.

Adott transzkripciós faktor, adott *cisz* elemhez való kötődését egyaránt vizsgálhatjuk a DNS motívum, illetve a fehérje faktor szemszögéből. A két megközelítési mód végeredménye ideális esetben találkozik egymással, és megerősítést nyer a transzkripciós faktor szerepe a kérdéses nukleoprotein komplex alkotásában. Jelen példánknál maradva, olyan EMSA kísérleteket végezhattünk, amikor a kompetítorként felhasznált hideg ds IE1 oligonukleotid célzottan elmutáltatott NF-I és Sox kötőhelyeket hordoz szekvenciájában (8. ábra). Az előző kísérleteinkben azonosított gyors mobilitású I. komplex kompetálható – természetesen – a vad típusú IE1 (8. ábra 3-4. sáv), az NF-I mutáns IE1m1 (8. ábra 5-6. sáv), a Sox9 specifikus IEm2 (8. ábra 12. sáv) és egyéb Sox9 specifikus (8. ábra 13. sáv) oligonukleotidokkal. Tehát, az I. komplexnek minden esetben potenciális kompetitora volt az a ds oligonukleotid, amely érintetlen Sox9 kötőhelyet tartalmazott. A Sox helyben mutáns oligonukleotidok nem, vagy csak magas koncentrációban gátolták az I. komplex kialakulását (8. ábra A/7-11. sáv). Az NF-I specifikus viselkedést mutató lassú mobilitású II. komplex kialakulása olyan oligonukleotidokkal volt gátolható, amelyekben az NF-I felismerőhely nem hordozott mutációt (8. ábra A/3-4,7-11. sáv). Amennyiben a tervezett pontmutáció úgy fordult elő a kompetáló ds IE1 oligonukleotidban, hogy az a CTF/NF-I felismerőhelyet érintette, akkor az teljesen elveszítette (8. ábra A/5-6. sáv), vagy igen erősen meggyengítette a II. komplexmal szembeni kompetíciós képességét (8. ábra A/9-10. sáv). A mutáns oligonukleotidokkal végzett kompetíciós EMSA kísérleteink tehát megerősítették a Sox9 és az NF-I transzkripciós faktorok kötődését az enhancer IE1-es *cisz* eleméhez, illetve bizonyították részvételüket a két eltérő mobilitású nukleoprotein komplexben.

A fent említett két transzkripciós faktornak a nukleoprotein komplexek formálásában betöltött szerepéről, a specifikus ellenanyagokkal kivitelezett „supershift” kísérleteink nyújtottak további bizonyítékot. Mindkettő ellenanyag specifikusan felismerte az előző

kompetíciós EMSA kísérletekben Sox9 és NF-I típusúknak definiált komplexeket (9. ábra 1-4. sáv). Érdekes módon olyan „supershift” is megjelent, amely egy közös „band”-ből származott (9. ábra 3-4. és 9-10. sáv). Ez a „supershift” jelenség jobban előtűnik, amikor az IE1-es elem egy hosszabb változatát (LIE, 5. ábra) vizsgáltuk EMSA technikával (10. ábra). Az LIE1-en a gyors mobilitású, alsó „band” NF-I és Sox9 specifikus ellenanyaggal jól láthatóan „supershift”-telhető (10. ábra 4-6. sáv). A gyors mobilitású komplex ellenanyagokkal történő elmozdítása igen jól látható, amikor az EMSA kísérletben olyan oligonukleotidot használtunk, amelyben a felső - NF-I specifikus - komplexek kialakulását pontmutáció beiktatásával meggátoljuk (10. ábra 10-12. sáv). Ezek az *in vitro* kísérleteink arra utalnak, hogy létezik olyan közös DNS-fehérje komplex, amelynek kialakításában az NF-I és Sox9 transzkripciós faktorok egyaránt szerepet játszanak.

5.1.6 A bakteriális úton termeltetett faktorok kötődnek az introni elemhez

Az előző *in vitro* kísérleteinkben azonosított két transzkripciós faktor rendelkezésünkre állt klónozott formában, ezért módunk volt GST-fúziós fehérje formában expresszálni őket baktériumokkal. A termeltetett faktorokat a baktérium sejtek ultrahangos feltárását követően, a lizátumból affinitás kromatográfiával tisztítottuk. A tisztított GST-CTF-I és GST-Sox9 transzkripciós faktorok kölcsönhatását vizsgáltuk a radioaktívan jelölt introni elemhez (11. ábra). Mindkét faktor kötődött az LIE1 elemhez, és a chondrogen eredetű sejtekből (RCS, CEC) származó sejtmagi fehérje kivonatokhoz hasonlóan, két jellegzetes nukleoprotein komplexet képzett. Azaz az LIE1 elem kialakult egy CTF/NF-I specifikus kisebb mobilitású és egy Sox9-specifikus nagyobb mobilitású komplex. A tisztított transzkripciós faktorok specifikus kötődését ellenanyagok adásával is megerősítettük (9. ábra 7,9 és 10. sáv).

5.1.7 A Sox9 és NF-I közösen aktiválja a matrilin-1 gén promoterét

Kotranszfekciós kísérleteket végeztünk azzal a céllal, hogy bizonyítsuk a Sox9 és NF-I faktorok szerepét a matrilin-1 gén transzkripciós szabályozásában. A CAT riporter génes konstrukció (TB36), a matrilin-1 gén minimál promotere előtt négy kópiában tartalmazza az első intron 102 bp-os fragmentumát. Amikor ezt a konstrukciót, külön az NF-I –et és külön a SOX9–et expresszáló plazmidokkal COS-7 sejtekbe juttattuk, akkor megemelkedett riporter gén aktivitást detektáltunk (25.3 ± 4.4 és 46.7 ± 9.6) (12. ábra). Abban az esetben, amikor mindkettő transzkripciós faktort expresszáló plazmidot egyszerre juttattuk a sejtekbe, több százszoros

(208 ± 37.1) aktiválást mértünk az alapszinthez viszonyítva. A detektált aktivitásemelkedés arra enged következtetni, hogy a két faktor kooperatívan fejti ki hatását. Olyan riporter gén konstrukció (TO50) esetén, amelyben úgy alakítottunk ki mutációt, hogy az a 102 bp-os fragmentum NF-I felismerő helyét érintette, maximálisan ~ 10 -szeres aktiválást sikerült elérni. Az NF-I -et érintő egyetlen pontmutáció képes volt még a Sox9 típusú aktiválást is jelentősen befolyásolni. A kotranszfekciós kísérleteink megerősítették a két transzkripciós faktor közötti kölcsönhatást, illetve funkcionális bizonyítékot szolgáltatott arra vonatkozóan, hogy kooperatívan fejtik ki működésüket a matrilin-1 gén enhancerében.

5.1.8 A Sox9 és NF-I transzkripciós faktorok között direkt kölcsönhatás létezik

Az irodalomban több példa ismert arra vonatkozóan, hogy adott gén transzkripciós szabályozásában Sox proteinek képesek más transzkripciós faktorokkal szorosan együttműködni, és részt venni annak expressziós szabályozásában (41,42,43). A Sox9 és NF-I transz-aktiváló faktorok kötődését az introni elemhez több úton is bizonyítottuk. A kötőhelyek közelsége miatt felmerült annak az igénye, hogy megvizsgáljuk a direkt kölcsönhatás lehetőségét a két fehérje között. Ennek a lehetséges fehérje-fehérje kölcsönhatásnak a kimutatására ún. „GST pull-down” és immunprecipitációs technikát alkalmaztunk. Mindkettő megközelítésnél a SOX9-et *in vitro* rendszerben (TnT System – Promega) állítottuk elő, és úgy jelöltük, hogy a metionint radioaktív formában adtuk a fehérjeszintézis alkalmával. Amíg a pull-down típusú megközelítés esetén - protein tartalmát tekintve - definiált közegben vizsgáljuk a potenciális kölcsönhatás meglétét, addig az immunprecipitáció alkalmával pontos ismeretekkel nem rendelkezünk a fehérje miliót illetően. A GST pull-down-os megközelítés azt célozta, hogy sejtmentes környezetben igazoljuk a két transzkripciós faktor közvetlen kölcsönhatását. A SOX9 faktort és tisztított GST-NF-I fúziós fehérjét megfelelő körülmények között inkubáltuk, majd többször mostuk az aspecifikus kötődés kizárásának érdekében. A kialakuló fehérje-fehérje komplexet glutation-sepharose gyöngy segítségével nyertük ki az inkubációs elegyből és denaturáló körülmények között gélen elválasztottuk (SDS-PAGE) (13. ábra). A GST fehérje önmagában nem hat kölcsön a radioaktívan jelölt Sox9-cel (13. ábra n. sáv), ezért a megfelelő mérettartományban detektált jel (13. ábra n. sáv) csak úgy magyarázható, hogy az NF-I és Sox9 faktorok között direkt fehérje-fehérje kölcsönhatás létezett az inkubáció során. Tehát, a két transzkripciós faktor azon túl, hogy az IE1-es elemen egymás közvetlen szomszédságában kötődnek a DNS-hez, közvetlen kontaktust is teremtenek egymással. Ez a kölcsönhatás

képezheti a fenti kotranszfekciós kísérletekben azonosított igen erős transzaktiváló hatás molekuláris hátterét.

Az immunprecipitációs technika alkalmazásával a Sox9-cel kölcsönható NF-I variáns előfordulását kívántuk körvonalazni. A ^{35}S jelölt SOX9-et különböző eredetű sejtmagi kivonatokhoz adtuk, az így formálódó protein komplexet az NF-I C-terminálisa ellen termeltetett ellenanyaggal tovább inkubáltuk, majd a SOX9/NF-I/ellenanyag konglomerátumot - az ellenanyagot felismerő - Sepharose-G gyöngy (SIGMA) segítségével ülepítettük ki a reakcióelegyből. Amennyiben a denaturáló gélen (SDS-PAGE) történő elválasztás után jelet kaptunk a megfelelő mérettartományban, akkor ez azt jelezte, hogy az adott sejtféleség tartalmaz olyan NF-I formát, amely képes kölcsönhatni a SOX9-cel (14. ábra). Az immunoprecipitációs módszer felhasználásával CEC és HDM sejt kultúrákból a SOX9-cel kompatibilis NF-I forma jelenlétét tudtuk kimutatni (14. ábra A és B panel). A CEF eredetű sejtmagi kivonatból ilyen típusú NF-I formát nem tudtunk detektálni (14. ábra A/4. sáv). Az inkubációs elegy ethidium-bromidot tartalmazott, ami megerősítette, hogy a két faktor közötti kölcsönhatás DNS-től függetlenül is létezik. Továbbá, kizártuk annak a lehetőségét is, hogy az NF-I specifikus ellenanyag keresztreagáljon a Sox9-cel (14. ábra A/2. sáv). Mindezek figyelembe vételével kijelenthetjük, hogy a Sox9 kölcsönhat egy specifikus NF-I formával, amely NF-I változat a chondrogen őssejtekben (chondroprogenitor) és a porcsejtekben egyaránt előfordul. A kölcsönhatás specifikus volt a Sox9-re, mivel azonos típusú kísérletekben a ^{35}S jelölt L-Sox5 és Sox6 faktorokkal nem kaptunk jelet az SDS-PAGE-t követően (14. ábra C panel).

5.1.9 Eltérő transzkripciós faktorok kötődnek az IE1 elemhez a chondrogenézis különböző stádiumait képviselő sejt kultúrákban

A HDM kultúrák igen hasznos kísérleti objektumai a chondrogenesis kutatásnak, mivel a megfelelő denzitásban kilemezelt, még nem differenciálódott mesenchymalis sejtek egy olyan fejlődési utat futnak be, amely nagyon hasonló az *in vivo* differenciálódási folyamathoz. Amennyiben különböző időpontokban veszünk mintákat a HDM kultúrából, a chondrogenézis egy-egy stádiumáról kaphatunk adekvát információt. Különböző korú HDM kultúrából származó sejtmagi kivonatokkal végzett EMSA kísérleteinkben vizsgáltuk, hogy milyen a Sox9 és az NF-I transzkripciós faktorok előfordulása a kezdeti, és a négy napos, már differenciálódott állapotban (15. ábra). Ugyanakkor a HDM minták mellé kontrollként használtuk az expresszálo (CEC) és nem-expresszálo (CEF) sejtekből származó sejtmagi

extraktumokat. A 0 napos HDM kultúrából (elkötelezett mesenchymális sejtek) nyert sejtmagi extraktumban szinte teljesen hiányzik az NF-I faktor (15. ábra 5. sáv). A chondrogenézis előre haladtával, a négy napos HDM kultúrából származó extraktummal teljesen más, sokkal összetettebb kötési mintázatot kapunk (15. ábra 8. sáv). Itt már Sox9 és NF-I specifikus komplexek formálódnak, de ezek mobilitásukban eltérőek a chondrocytákban (CEC) detektálhatóktól (15. ábra 11. sáv). A négy napos HDM-ben erős NF-I aktivitás érhető tetten, amit a ds oligonukleotiddal elvégzett kompetíciós EMSA kísérletek (15. ábra 10. sáv), illetve az NF-I specifikus ellenanyaggal kivitelezett „supershift”-ek bizonyítanak (7. ábra 12. sáv).

Az EMSA kísérleteink alapján, az expresszálo sejtféleségekben (RCS, CEC) az introni elemen (IE1) egy gyors mobilitású Sox9-típusú, és egy lassabb mobilitású NF-I-típusú nukleoprotein komplex formálódik (7-8. ábra, 15. ábra). A chondrogenézis kiindulási stádiumára (HDM 0. nap) jellemző a Sox9-típusú dominancia, míg az NF-I szinte teljesen hiányzik a rendszerből (15. ábra 5-7. sáv). A terminális differenciálódás előrehaladtával (HDM 4. nap) viszont az NF-I variánsok uralják a gélretardációs mintázatot, a Sox9-típusú nukleoprotein komplex megmaradása mellett (15. ábra 8-10. sáv). A matrilin-1-et nem expresszálo sejteket (CEF), az NF-I-es verziók dominanciája jellemzi, míg a Sox9 típusú komplex szinte teljesen hiányzik a gélretardációs képből.

A gerincesekben számos NF-I izoforma létezik, mivel négy gén kódolja ezeket a faktorokat, illetve erős alternatív splicing tevékenység jellemzi a pre-mRNS-ek érési folyamatát. A Sox9-cel kölcsönható NF-I faktor azonosítása esszenciális a matrilin-1 gén transzkripció szabályozásának tisztázásában.

5.1.10 In vivo körülmények között az IE1 cisz motívum fehérjét köt

Az *in vitro* DNS-fehérje kölcsönhatás vizsgálatára alkalmas módszerekkel (EMSA, *in vitro* DNase I footprinting) nyert adataink megerősítésére törekedtünk akkor, amikor az *in vivo* footprinting technika alkalmazására szántuk el magunkat. Ez a módszer alkalmas arra, hogy természetes körülmények között, magában az élő sejtben vizsgálja a kérdéses DNS szakasz védettségét. Ezzel a technikával kapott adataink arról tanúskodnak, hogy az IE1 elem nem csupán az *in vitro* kísérleti körülmények között, hanem a kromatin környezetben is fontos szerepet játszik, mivel jól látható védettséget mutat CEC-ben (16. ábra 8. sáv). A matrilin-1 fehérjét nem expresszálo sejtben (CEF) a kérdéses szakasz nem mutatott védettséget (16. ábra 10. sáv). Az *in vivo* footprint kísérletünkben az IE1-es elem környezetében további védett szakaszok találhatók, ami aláhuzza ennek a DNS régióknak a transzkripció szabályozásban

betöltött fontosságát. Azaz közvetve utal arra, hogy igen intenzív kooperáció lehetséges a régióhoz kötődő faktorok között.

5.2 POSZT-TRANZKRIPCIÓS SZABÁLYOZÁS

A pre-mRNS-ből az introni szekvenciák eltávolítása több lépcsős, igen összetett folyamat. A spliceosomák megfelelő helyen történő kialakulásában döntő jelentősége van azoknak a konzervatív *cisz* elemeknek, amelyek az exon-intron határokon, valamint az elágazási ponton találhatók. *In vivo* körülmények között az AT-AC intronok pontos eltávolításának szükséges, de – minden bizonnyal – nem elégséges feltételei a bevezetőben említett konszenzus szekvenciák. Egy olyan kísérleti rendszer, amely az *in vivo* viszonyokról tudósít, valamint alkalmas a splicing hatékonyságát befolyásoló szekvencia motívumok térképezésére, nagy segítséget jelent az intron kivágódás összetett folyamatának felderítésében. A disszertációm második felében egy ilyen, *in vivo* modell rendszer kialakítását és felhasználását kívánom bemutatni.

Célunk megvalósításához a következő stratégiát választottuk. Az eukaryota sejtekben könnyen mérhető aktivitású riporter génbe, egy új típusú (AT-AC) intront építettünk, majd az így létrehozott rekombináns plazmidot sejtekbe juttattuk, és a riporter gén aktivitásának meghatározásával arra következtettünk, hogy milyen hatékonysággal történt meg az intron kivágódása (16. ábra).

5.2.1 Az AT-AC intront hordozó mesterséges eukaryota minigén előállítása

A bakteriális kloramfenikol-acetil-transzferáz (CAT) gént elterjedten használják riporter génként transziens expressziós kísérletekben, a transzkripciós szabályozásban fontos *cisz* elemek tanulmányozására (68). Az ilyen konstrukciókkal transzfektált sejteket néhány nap után begyűjtik, majd a sejtek lizátumát használják fel a CAT aktivitás mérésére. A lizátumban a CAT fehérje mennyisége arányos az adott konstrukció által hordozott *cisz* reguláló elem transzkripcióra kifejtett hatásával. Radioaktívan jelölt kloramfenikol és acetil-csoport donor adása esetén az eukaryota sejt által termelt CAT fehérje katalizálja a kloramfenikol acetilálását. Az acetilált és a nem acetilált termékek vékonyréteg kromatográfiásan elválaszthatóak, és az előbbiek relatív mennyisége arányos a termelt CAT fehérje mennyiségével, azaz a tanulmányozott *cisz* elem „erősségével”. A fenti kísérleti rendszer egy olyan változatát hoztuk létre, amelyben a riporter gén kódoló régiójába eukaryota introni szekvenciát építettünk. Így a

CAT aktivitás csak akkor mérhető, ha az intron kivágódott a pre-mRNS-ből. Mivel valamennyi minigén konstrukciónk esetén azonos promotert használtunk, így a mért CAT aktivitásbeli különbségek nem a promoter aktivitás változásából fakadtak, hanem a splicing hatékonyságát tükrözték (17. ábra).

Az AT-AC intront hordozó minigénes konstrukció elkészítéséhez a „pCAT3[®]Control Vector” nevű gyári plazmidot (Promega) használtuk fel, ugyanis ebben az esetben a CAT gén egyedi *PvuII* restrikciós hasítóhelyet hordoz a kódoló régiójában. A *PvuII* enzimmel hasított plazmidba illesztettük a PCR segítségével felszaporított introni szekvenciát, amelyben az 5' primer pontosan az intron első nukleotidjával kezdődik, míg a 3' primer pontosan az adott intron utolsó nukleotidjával indul. A PCR reakcióhoz *Pfu* polimerázt használtunk, amely nem épít be további extra nukleotidot a fragmentum 3'-végére és így a termék kompatibilis a *PvuII*-vel hasított plazmidvektor végekkel. Eredetileg a teljes hosszúságú (~2kb) AT-AC intron szekvenciát kívántuk beépíteni a konstrukcióinkba, azonban ezek a klónok instabilnak bizonyultak. Ezért a kérdéses intron G-nek olyan deléciós származékait állítottuk elő, amelyekben érintetlenül megtartottuk az 5' és 3' splice helyek néhány száz bázispáros közvetlen környezetét.

Ezen kísérletek sarokköve, hogy az intronnal megszakított CAT génről csak akkor keletkezzen funkcióképes CAT fehérje, ha a splicing működik az átírt pre-mRNS templáton. Tehát egy olyan negatív kontroll minigénre is szükségünk volt, amellyel azt bizonyítottuk, hogy a splicing elmaradása esetén a beépített intron előtti "5' exoni" szekvenciáról nem keletkezik részleges CAT aktivitással rendelkező fehérje. Ennek bizonyítására egy olyan kontroll plazmidot kellett készítenünk, amelyben a *PvuII* helyre konszenzus intron határokat egyáltalán nem tartalmazó DNS-t illesztettünk. Gyakorlatilag erre a célra tökéletesen megfeleltek azok az előző „blunt end” klónozásból származó rekombinánsok, amelyek fordított orientációban hordozták az AT-AC intront.

A rekombináns plazmidban az illesztés pontosságát szekvencia analízissel ellenőriztük. Az újonnan kialakított exon-intron határok tökéletesen megfeleltek az irodalomból ismert konszenzus szekvenciáknak (56). Ezért elvileg minden esélyünk megvolt arra, hogy az adott sejt a minigénről átírt transzkriptumot a saját pre-mRNS-eihez hasonlóan dolgozza fel.

5.2.2 Az AT-AC intront hordozó eukaryota minigén tranziens expressziós analízise

A COS-7 sejtvonalat választottuk ki a minigén konstrukcióink tranziens expressziós tesztelésére, mivel ez SV40 T antigénnel transzformált és így magas expressziót garantál az

alkalmazott alapvektor replikációs origója miatt. A rekombináns plazmidokat Ca-foszfát-DNS precipitációs transzfektálási módszerrel juttattuk az SV40 sejtekbe, majd 2 nap után mértük a riporter gén aktivitását. Az a minigén konstrukciónk, amely normál orientációban tartalmazta az AT-AC intront, jól mérhető CAT aktivitást produkált (18. ábra). A detektált aktivitás némileg elmaradt az eredeti, a nem manipulált CAT gén esetén mérttől, de így is bizonyította a modell rendszerünk életképességét. A fordított orientációjú intront tartalmazó negatív kontroll plazmiddal transzfektált sejtekből származó lizátum nem mutatott semmilyen kloramfenikol konverziót, így kizárhattuk annak a lehetőségét, hogy az előző konstrukció esetén kapott aktivitás, az 5' exon által kódolt csonka CAT enzimtől származott. Azaz megerősítést nyert, hogy az eukaryota AT-AC minigénünkről származó pre-mRNS-t a neki megfelelő, adekvát U12-függő splicing rendszer felismeri, és nagy hatékonysággal dolgozza fel.

5.2.3 Az introni splicing enhancer térképezése

Az exon-intron határokon konzerválódott, rövid 5' és 3' splicing helyek nagy valószínűséggel önmagukban nem elegendőek az intronok pontos definíciójához. Gyakran további *cis* RNS szekvenciák (enhancerek) felelősek az intronok pontos kijelöléséért, illetve azok hatékony eltávolításáért. Az előző fejezetekben ismertetett *in vivo* modell rendszer különösen alkalmas eszköz arra, hogy funkcionálisan analizáljunk olyan introni régiókat, amelyek putatív enhancer aktivitással rendelkeznek. Az introni enhancer régió(k) térképezését célzó konkrét kísérleteink megkezdése előtt, alapos szekvencia analízist végeztünk a rendelkezésre álló nukleotidszekvenciák felhasználásával. A különböző komputer programok nem találtak konzerválódott szakaszokat az ismert AT-AC intronok nukleotid sorrendjében. Azonban feltűnt, hogy rövid, 4-5 bp-os purin gazdag *cis* motívumok több példányban fordulnak elő a különböző fajokból származó matrilin-1 gének AT-AC intronjainak 5' régiójában. Ezek a *cis* motívumok az 5' donorhely közelében felszaporodnak, és mintegy szigeteket alkotnak (19. ábra). A csirkénél 7, az egérnél 5, míg a humán gén esetén 6 darab ilyen NGGG elem fordul elő a kérdéses régióban. Annak megválaszolására, hogy funkcionálisan milyen szerepet tölt be ez a purin gazdag sziget a splicing hatékonyságára nézve, olyan deléciós változatát készítettük el az eukaryota minigénünknek, amelyben a *cis* motívumok nagy részét kiejtettük (18. ábra). Az AT-AC intronban rövidített eukaryota minigénes konstrukciót felszaporítottuk, majd COS-7 sejtvonalba juttattuk és két nap elteltével CAT aktivitást mértük. Az autoradiogrammokon jól látható, hogy a *cis* motívumok deléciója a CAT aktivitás

csökkenését vont maga után (20. ábra). Tehát, egy olyan introni elemet sikerült funkcionálisan térképeznünk, amely pozitív hatással van az AT-AC intron kivágódására. Az AT-AC intronokkal kapcsolatban ilyen típusú enhancerek azonosítása csak exoni régiókban történt meg (69,70). Az eddigi kísérleteink alapján a fehérjét, amely kötődik az enhancerhez, még nem tudtuk azonosítani. Az enhancerben előforduló *cis*z motívumok nukleotidsorrendje alapján a hnRNPA1, mint potenciális kötőfaktor neve merült fel. A hnRNPA1 fehérjéről ismert, hogy több splicing enhancer komplex felépítésében is szerepet játszik (71). Emiatt az RNS-kötő faktor azonosítására irányuló tervezett kísérleteinkben a hnRNPA1, mint kitüntetett célpont szerepel. További érdekes – megválaszolásra váró – kérdés, hogy az azonosított enhancer miként fejt ki az AT-AC intron eltávolítására irányuló pozitív hatását. Azaz „csupán” elősegíti az AT-AC spliceosoma formálódását a pre-mRNS templáton, avagy úgy ad teret az előző komplex kialakulásának, hogy gátolja a domináns GT-AG rendszer térnyerését.

6. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Az endochondrális csontfejlődés útjára lépett mesenchymális sejtek porcsejteké történő differenciálódása többlépcsős, minden részletében szigorúan szabályozott folyamat. A chondrogenesis során a különböző porcspecifikus gének aktiválódása nem egyszerre megy végbe, hanem jól definiált, egymás követő sorrendben történik meg (1,7). *In vivo* és *in vitro* kísérleti rendszerek tanúsága szerint elsőként a kollagén $\alpha 1(\text{II})$, majd az aggrecan és link fehérje gén, majd legvégül a matrilin-1 gén kapcsol be (2,7). A matrilin-1 gént úgy tekinthetjük, mint a chondrogenesis késői proliferatív stádiumának (Ib stádium) marker génjét. 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 (2. ábra). Az egyik deléciós származék kiugróan magas aktivitás értékeket mutatott a többi konstrukcióhoz viszonyítva (1. táblázat). Az azonosított matrilin-1 enhancer lokalizációjában (intron) és porcszövet specifikus működésében a kollagén II gén enhancerével mutat rokonságot (67).

Nemrégiben a Sox9-et azonosították, mint a chondrogenesis egyik esszenciális transzkripciós faktort („master factor”), aminek hiányában már a chondrogén vázfejlődés első fő lépése – a mesenchimális sejtek kondenzációja – sem történik meg (23). A Sox9 kooperációban az L-Sox5 és Sox6 faktorokkal részt vesz több kollagén (Col2a1, Col9a2, Col11a2) és az aggrecan gén aktiválásában (25,72,73). 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 *cis*z elemére (IE1) koncentráltunk, amely előzetes kötési tesztekben szövetspecifikus különbségeket mutatott az expresszálo és nem-expresszálo sejtekből származó sejtmagi kivonatokkal (4. ábra). 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 (5. ábra). 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 (11. ábra). Az NF-I motívum (TGGCN₅TCCA) három helyen tér el a kanonikus szekvenciától

(TTGGCN₃GCCAA) (34). Az elmutáltatott oligonukleotidokkal végzett analízis rámutatott arra is, hogy a Sox faktorok szintén esszenciális komponensei a formálódó nukleoprotein komplexumnak (7. ábra). *In vivo* footprint adataink (16. ábra) 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 összetett működésére utal.

A bemutatott adataink összhangban vannak azzal a hipotézissel, amely szerint a Sox9 kulcsszerepet tölt be a chondrogenesis során a porcspecifikus gének szabályozásában. A kísérleteinkből származó új információk megerősítik a Sox9 esszenciális voltát és kooperációs képességét más transzkripciós faktorokkal. A Sox9 kölcsönhatása az NF-I faktorra 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 (10. ábra), továbbá a tranziens expressziós kísérletekben mindkettő faktor transzaktivációs képességét a minimálisra csökkentette (12. ábra). Elsőként nyújtunk bizonyítékot arra vonatkozóan, hogy a két transzkripciós faktor egymás közvetlen közelében kötődik, és ez a szomszédság magas szintű riporter gén megnyilvánuláshoz vezet (12. ábra). 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 (13. ábra). A Col2a1 enhancer esetében ismert, hogy a Sox9 faktor az L-Sox5 és Sox6 faktorokkal karöltve, kooperatívan fejti ki transzaktiváló hatását. Azonban, ebben a példában nincs direkt kölcsönhatás a két másik partner fehérjével. Az AMH gén transzkripciós szabályozásában a Sox9 az SF1 faktorra együttműködik, és direkt fehérje-fehérje kölcsönhatást létesít partnerével (42). Ezen információkból felépíthetünk egy olyan modellt, amely magyarázza a chondrogenesis során az egyes porc gének szekvenciális aktiválódását. A hipotézis szerint a Sox9 valamennyi gén bekapcsolásában esszenciális, azonban a különböző gének esetén más és más transzkripciós faktorra működik együtt. Az előző modell megerősítésének szempontjából, további fontos információt várhatunk azoktól a kutatásoktól, amelyek olyan génekkel kapcsolatosak, amelyekről már kiderült, hogy Sox9-függő módon szabályozódnak (75,76).

Az NF-I fehérjét 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

faktorról 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 (15. ábra). A 0 napos HDM kultúrából (elkötelezett mesenchyma sejtek) nyert sejtmagi extraktumban szinte teljesen hiányzik az NF-I faktor (15. ábra 5. sáv). A chondrogenézis előre haladtával, a négy napos HDM kultúrából származó extraktummal teljesen más, sokkal összetettebb kötési mintázatot kapunk (15. ábra 8. sáv). Itt már Sox9 és NF-I specifikus komplexek formálódnak, de ezek mobilitásukban eltérőek a chondrocytáknak (CEC) detektálhatóktól. Jelen adataink birtokában nem zárható ki annak a lehetősége, hogy különböző NF-I családhoz tartozó, eltérő splicing variáns eredetű fehérjék között kompetíció van a matrilin-1 enhanceren fellelhető NF-I kötőhelyért.

A tisztán látás érdekében, a jövőben fontos feladat lesz az NF-I változatok expressziós mintázatának pontos felderítése a vázfejlődés, illetve a Sox9-cel kompatibilis izoforma azonosítása.

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 (15). Ezek az intronok AT és AC dinukleotidokat hordoznak 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-transzkripciós szabályozásnak. Ezért olyan rendszer fejlesztésébe kezdünk, amely alkalmas *in vivo* körülmények között vizsgálni a matrilin-1 gén AT-AC intronjának kivágódását (17. ábra). 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 (17. ábra). 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) (19. ábra), és a filogenezis során elemeiben konzerválódott a matrilin-1 génnek 5' splicing helyének közelében (20. ábra). Az introni splicing enhancerhez kötődő fehérje faktorok azonosítása a jövő feladatainak egyike lesz.

A transzkripció és a splicing szintjén történő szabályozásnak egyaránt fontos elemei az enhancerek, amelyek előmozdítják az adott promoternak, illetve az aktuális splicing helynek a felismerését. Mindkét típusa az enhancereknek fehérjét köt és egy magasan szervezet nukleoprotein komplexum szerveződésének biztosít helyet. A transzkripciós enhancereken formálódó enhancesoma a komponensein keresztül közvetve, vagy közvetlenül az aktuális promoteren felépülő preiniciációs komplexum szerveződését segíti. A splicing enhancereket felismerő fehérjék felelősek a korrekt „hasítási helyek” kijelölésében és a megfelelő splicing helyek párosításában. Az enhancerekhez kötődő fehérjékre jellemző a moduláris szerveződés, a nukleinsavkötő domén és a fehérje-fehérje interakciókban fontos domén rendszerint valamennyi faktornak lényeges eleme. Bár az enhancer hatás pontos molekuláris mechanizmusa nem ismert, az nyilvánvalónak tűnik, hogy a szabályozó fehérjék kooperatív együttműködése mindkét esetben esszenciális a pozitív hatás kialakításában.

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

SUMMARY OF THE THESIS

INTRODUCTION

Differentiation of committed mesenchymal cells to chondrocytes during endochondral ossification is a tightly controlled, multistep process, which leads to the activation of cartilage protein genes concomitant to chondrogenesis. The activation of the various cartilage-specific genes, however, does not take place strictly at the same time, but rather in a well-defined, sequential order (1,7). It has been shown in various *in vivo* and *in vitro* systems that the gene for $\alpha 1(\text{II})$ collagen is turned on first, followed by the aggrecan and link protein genes, while the matrilin-1 gene is activated only later (2,7). The matrilin-1 gene can be considered as a marker gene for the late proliferative stage (stage Ib) of chondrocyte differentiation.

RESULTS AND DISCUSSION

To identify, which control regions might be involved in the regulation of cartilage-specific gene expression, we performed a functional mapping of the first intron. An overlapping deletion series of the first intron was created and its effect on the minimal promoter was monitored in transient expression studies (Fig. 2) One of the deletion constructs showed high CAT activity compared to the other members of the series. The enhancer of the matrilin-1 gene shows similarities both location and tissue specificity to the enhancer of the type II collagen gene (67). While the minimal promoter showed a promiscuous activity in all cell lines tested, the newly mapped enhancer conferred tissue specific expression at all stages of chondrogenesis (Tab.1).

Recent studies identified Sox9 as a master transcription factor, which, in cooperation with L-Sox5 and Sox6, is responsible for the formation of the chondrocyte lineage and for the activation of a set of cartilage-specific genes, such as *Col2a1*, *Col9a2*, *Col11a2* and *Agc* (23, 25,72,73). However, it still remained an open question, what kind of molecular mechanisms underlie the sequential activation of the cartilage protein genes. To investigate, whether other factors or control mechanisms might be involved in the regulation of cartilage-specific gene expression, we characterized an intronic *cis* element of the chicken matrilin-1 gene enhancer, and the transcription factors bound to it. The partnership of Sox proteins with particular factors has several characteristics, and some of those can be recognized in case of the IE1 element. One of these features is the juxtaposition of the recognition sites. Putative Sox-

binding sites are located at both borders and in the spacer of the NF-I recognition sequence (Fig. 5). Neither the NF-I, nor the Sox sites match completely to the consensus, still even IE1 was capable of efficient binding of both factors. The NF-I motif TGGCN₅TCCA differs from the consensus TTGGCN₅GCCAA (34) in three nucleotides. Mutational analysis indicated that the spacer motif (IE1m2) and 3' Sox sites (compare IE1m3 and IE1m4) participated in the formation of Sox9 complexes (Fig. 8). Binding of the two factors to their adjacent sites, however, led to a stable ternary complex formation, which was disrupted by mutation in either the NF-I or the Sox9-binding sites. Using *in vivo* footprinting, we have analyzed protein-DNA interactions at the intronic enhancer region in CEC and CEF (Fig. 16). *In vivo* footprinting studies with dimethyl-sulfate (DMS) revealed some protected regions. We detected strong protection in the IE1 element. These *in vivo* data verified our previous *in vitro* findings concerned to the intronic enhancer region.

Data presented here are congruent with the hypothesis that Sox9 is a key regulator of cartilage-specific genes. In addition to this, however, our results also emphasize that the chondrogenic master transcription factor performs this function in a direct cooperative interaction with a partner factor. In fact, pairing Sox9 off with NF-I is so important in the transcriptional control of the matrilin-1 gene that a single point mutation in the NF-I site dramatically reduced the protein binding to the element (Figs. 10) and the transactivation in transient transfections not only by NF-I, but also by SOX9 (Fig. 12). Here we provide the first evidence for cooperative binding of heterologous transcription factors Sox9 and NF-I to juxtaposed sites of this control element, leading to high level of enhancement in COS-7 cells. Pull-down (Fig. 13) and co-immunoprecipitation (Fig. 14) experiments revealed a direct interaction between the two transcription factors in the expressing cell types, but not in non-expressing cells. In addition to its cooperation with L-Sox5 and Sox 6 in the regulation of the *Col2a1* (16), Sox9 has also been reported partnering with SF1 in the transcriptional control of the *AMH* gene (42). Therefore, it is plausible to assume that it may cooperate with other partners too, resulting in differences in the selective activation of cartilage protein genes. Thus, the SOX-partner cooperation model (34) may explain the sequential activation of cartilage-specific genes. Interaction of SOX9 with *cis* elements of the *Col11a2* (73) and the cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein (74) gene expressed in chondrocytes and certain cancers has been demonstrated in *in vitro* DNA-protein interaction studies (25). However, it awaits further studies to identify the respective cooperating partners.

It is not known, which NF-I isoforms are capable of partnering with Sox9. Four NF-I genes are known, which produce several isoforms as a result of alternative splicing (47).

In the cotransfection experiments, we used NF-I, which is synthesized from the homologue of the chicken NFI-C1 gene. As Sox9 is expressed by chondrocytes and chondroprogenitor cells as well, it is possible that the expression of the respective NF-I isoform leads to activation of the matrilin-1 gene during chondrogenesis. Although it requires further studies to determine the expression pattern of the various NF-I genes during skeletal development, the almost complete absence of NF-I proteins in HDM cells at day 0 (Fig. 9, lanes 8-10 and Fig. 15, lanes 5-7) is congruent with this hypothesis. Further, characteristic changes were observed in the mobilities of the nucleoprotein complexes, when nuclear extracts prepared from HDM cultures at consecutive days were used (data not shown). The nuclear proteins extracted from HDM cultures at day 4 still gave rise to ternary complexes of mobilities markedly different from those extracted from CEC cultures (compare lanes 11-13 to lanes 1-4 in Fig. 9). It is also possible that various NF-I family members compete for the NF-I site in the enhancer of the matrilin-1 gene. As NF-I proteins have been demonstrated to bind to the silencer of this gene (17), this further emphasizes the importance of NF-I family members in the regulation of matrilin-1 gene expression.

AT-AC introns exist in a variety of organisms ranging from plants to *Drosophila*, and vertebrates. The chicken matrilin-1 gene was the first reported example of introns bordered with AT-AC dinucleotides (15). AT-AC introns are spliced out from pre-mRNA by a rare U12-type spliceosome. The efficacy of the removal of AT-AC introns *in vivo* splicing studies is far below of that the GT-AG ones. One explanation for this phenomenon is that the process of intron removal is a possible post-transcriptional regulation point. Therefore, we developed a new approach to determine the splicing efficiency of the rare intron of the matrilin-1 gene *in vivo* using transient expression assays (Fig. 17). For this purpose, we created an eukaryotic minigene, which contains the bacterial chloramphenicol acetyl-transferase (CAT) gene as a reporter gene. The AT-AC intron was inserted into the coding region of the CAT reporter gene in a way that we could get measurable CAT activity in cell lysates only, if the intron was excised precisely from the reporter gene. The order of the GT-AG and AT-AC introns in the model construct resembles to that of the endogenous matrilin-1 gene. The other possible answer to the above-mentioned phenomenon is that the constructs tested in *in vitro* assays do not contain all the elements that are necessary for the efficient splicing. We also tested this hypothesis in our *in vivo* CAT assay system. When a specific intronic region was removed, we mapped via deletion analysis of the AT-AC intron splicing enhancer. In the absence of this intronic region, we could detect significantly lower splicing activity (Fig. 19). Protein factors responsible for binding to cis elements in this region are under investigation.

Regulation of both transcription and RNA splicing requires enhancer elements, this is, *cis*-acting sequences that promote the activities of linked promoters or splice sites, respectively. Both type of enhancer associate with regulatory proteins to form multicomponent enhancer complexes that recruit the necessary enzymatic machinery to promoter or splice site recognition sequences. Specific activator proteins recognize transcription enhancers, whereas members of serine-arginine-rich (SR) proteins bind most splicing enhancers. Both transcription and splicing activator proteins have in common a modular organization, with separable nucleic acid binding domains and regions required for specific interactions. Although the detailed mechanisms of enhancer function are not understood for either transcription or splicing, some common features of the two process have been identified. In both cases, cooperative binding of regulatory proteins to enhancers leads to the formation of highly stable complexes that recruit the basic components of the transcription or splicing apparatus to nearby recognition elements.

SUMMARY

We identified a chondrocyte-specific enhancer of the chicken matrilin-1 gene. In *in vitro* and *in vivo* footprint analysis, we localized several protected regions in the enhancer fragment. We provide evidence using competitive EMSA, super shift assays that both NF-I and Sox9 is involved in the binding to this element. We provide the first evidence for cooperative binding of heterologous transcription factors Sox9 and NF-I to juxtaposed sites of this control element, leading to high level of enhancement in COS-7 cells. Pull-down and co-immunoprecipitation experiments revealed a direct interaction between the two transcription factors in the expressing cell types, but not in non-expressing cells.

We developed a new eukaryotic minigene system to identify *cis* RNA motifs are involved in regulation of the U12 dependent splicing process. Using this *in vivo* approach, we identified an intronic splicing enhancer that confers high splicing efficiency for AT-AC splicing machinery.

In this dissertation, we provide data concerned to localization and composition of the transcriptional and splicing enhancers of chicken matrilin-1 gene. To get a deeper insight into the biological role of enhancers in the tissue- and developmental stage specific gene regulation, we plan to continue and extend our research on the structure, function of these *cis* and *trans*-acting elements.

8. HIVATKOZÁSOK

1. Cancedda R, Descalzi Cancedda F, Castagnola P. (1995) Chondrocyte differentiation. *Int Rev Cytol.* **159**:265-358.
2. Szűts V, Möllers U, Bittner K, Schürmann G, Muratoglu S, Deák F, Kiss I, Brückner P. (1998) Terminal differentiation of chondrocytes is arrested at distinct stages identified by their expression repertoire of marker genes. *Matrix Biol.* **7**:435-48.
3. Van der Rest M, Garrone R. (1991) Collagen family of proteins. *FASEB J.* **5**:2814-23.
4. Heinegård D, Oldberg A. (1989) Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J.* **3**:2042-51.
5. Hascall, V.C., Hascall, G.K. (1981) in *Cell biology of extracellular matrix*, Ed., Hay, E.D., Plenum, N.Y. pp.39-63.
6. Deák F, Wagener R, Kiss I, Paulsson M. (1999) The matrilins: a novel family of oligomeric extracellular matrix proteins. *Matrix Biol.* **18**:55-64.
7. Muratoglu S, Bachrati C, Malpeli M, Szabó P, Neri M, Dozin B, Deák F, Cancedda R, Kiss I. (1995) Expression of the cartilage matrix protein gene at different chondrocyte developmental stages. *Eur J Cell Biol.* **68(4)**:411-8.
8. Chapman KL, Mortier GR, Chapman K, Loughlin J, Grant ME, Briggs MD. (2001) Mutations in the region encoding the von Willebrand factor A domain of matrilin-3 are associated with multiple epiphyseal dysplasia. *Nat Genet.* **28(4)**:393-6.
9. Hauser N, Paulsson M, Heinegård D, Morgelin M. (1996) Interaction of cartilage matrix protein with aggrecan. Increased covalent cross-linking with tissue maturation. *J Biol Chem.* **271(50)**:32247-52.
10. Tsonis PA, Goetinck PF. (1988) Expression of cartilage-matrix genes and localization of their translation products in the embryonic chick eye. *Exp Eye Res.* **46**:753-64.
11. Paulsson M, Heinegård D. (1979) Matrix proteins bound to associatively prepared proteoglycans from bovine cartilage. *Biochem J.* **183**:539-45.
12. Argraves WS, Deák F, Sparks KJ, Kiss I, Goetinck PF. (1987) Structural features of cartilage matrix protein deduced from cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **84**:464-8.
13. Kiss I, Deák F, Holloway RG Jr, Delius H, Mebust KA, Frimberger E, Argraves WS, Tsonis PA, Winterbottom N, Goetinck PF. (1989) Structure of the gene for cartilage matrix protein, a modular protein of the extracellular matrix. Exon/intron organization, unusual splice sites, and relation to alpha chains of beta 2 integrins, von Willebrand factor, complement factors B and C2, and epidermal growth factor. *J Biol Chem.* **15**:8126-34.

14. Aszódi A, Beier DR, Hiripi L, Bősze Z, Fassler R. (1998) Sequence, structure and chromosomal localization of *Crtm* gene encoding mouse cartilage matrix protein and its exclusion as a candidate for murine achondroplasia. *Matrix Biol.* **16(9)**:563-73.
15. Kiss I, Deák F, Lukacsovich T. (1988) Novel type of splice junctions in the chicken cartilage matrix protein gene. *Nucleic Acids Res.* **16(3)**:1211.
16. Kiss I, Bősze Z, Szabó P, Altanchimeg R, Barta E, Deák F. (1990) Identification of positive and negative regulatory regions controlling expression of the cartilage matrix protein gene. *Mol Cell Biol.* **10**:2432-6.
17. 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.
18. Ducy P and Karsenty G. (1998) Genetic control of cell differentiation in skeleton. *Current Opinion in Cell Biology* **10**:614-619.
19. Wallis GA. (1996) Bone growth: Coordinating chondrocyte differentiation. *Current Biology* **6**:1577-1580.
20. Dhordain P, Dewitte F, Desbiens X, Stehelin D and Duterque-Coquillaud M. (1995) Mesodermal expression of the chicken *erg* gene associated with precartilaginous condensation and cartilage differentiation. *Mech. Dev.* **50**:17-28.
21. Lefebvre V, de Crombrughe B. (1998) Toward understanding SOX9 function in chondrocyte differentiation. *Matrix Biol.* **16**:529-40.
22. Shum L, Nuckolls G. (2002) The life cycle of chondrocytes in the developing skeleton. *Arthritis Res.* **4(2)**:94-106.
23. Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B. (1999) Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet.* **22**:85-9.
24. Bell DM, Leung KK, Wheatley SC, Ng LJ, Zhou S, Ling KW, Sham MH, Koopman P, Tam PP, Cheah KS. (1997) SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat Genet.* **16**:174-8.
25. Lefebvre V, Li P, 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.
26. Zhou G, Lefebvre V, Zhang Z, Eberspaecher H, de Crombrughe B. (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(24)**:14989-97.

27. Smits P, Li P, Mandel J, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B, Lefebvre V. (2001) The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev Cell*. **1(2)**:277-90.
28. Takeda S, Bonnamy JP, Owen MJ, Ducy P, Karsenty G. (2001) Continuous expression of *Cbfa1* in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues *Cbfa1*-deficient mice. *Genes Dev*. **15(4)**:467-81.
29. Smale ST. (2001) Core promoters: active contributors to combinatorial gene regulation. *Genes Dev*. **15**:2503-8.
30. Butler JE, Kadonaga JT. (2001) Enhancer-promoter specificity mediated by DPE or TATA core promoter motifs. *Genes Dev*. **15**:2515-9.
31. Burke TW, Kadonaga JT. (1996) *Drosophila* TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes Dev*. **10**:711-24.
32. Ofori-Acquah SF, Lalloz MR, Layton DM. (1999) Localisation of cis regulatory elements at the beta-globin locus: analysis of hybrid haplotype chromosomes. *Biochem Biophys Res Commun*. **254(1)**:181-7.
33. Stanford WL, Cohn JB, Cordes SP. (2001) Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond. *Nat Rev Genet*. **2(10)**:756-68.
34. Rauch T, Rentsendorj O, Karcagi I and Kiss I. (2002) The chondrogenic master transcription factor Sox9 pairs off with NF- κ B in the regulation of the matrilin-1 gene. *J Biol Chem*. Közlésre béküldve.
35. Dorsett D. (1999) Distant liaisons: long-range enhancer-promoter interactions in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev*. **9(5)**:505-14.
36. Fiering S, Whitelaw E, Martin DI. (2000) To be or not to be active: the stochastic nature of enhancer action. *Bioessays*. **22**:381-7.
37. Ronai D, Berru M, Shulman MJ. (1999) Variegated expression of the endogenous immunoglobulin heavy-chain gene in the absence of the intronic locus control region. *Mol Cell Biol*. **19**:7031-40.
38. Wegner M. (1999) From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res*. **27**:1409-20.
39. Harley VR, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. (1994) Definition of a consensus DNA binding site for SRY. *Nucleic Acids Res*. **22**:1500-1.

40. Kamachi Y, Uchikawa M, Kondoh H. (2000) Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet.* **16**:182-7.
41. Kamachi Y, Cheah KS, Kondoh H. (1999) Mechanism of regulatory target selection by the SOX high-mobility-group domain proteins as revealed by comparison of SOX1/2/3 and SOX9. *Mol Cell Biol.* **19**:107-20.
42. 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-Müllerian hormone gene. *Mol Cell Biol.* **18**:6653-65.
43. Yuan H, Corbi N, Basilico C, Dailey L. (1995) Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev.* **9**:2635-45.
44. Moggs JG, Orphanides G. (2001) Estrogen receptors: orchestrators of pleiotropic cellular responses. *EMBO Rep.* **2**(9):775-81.
45. Guggenheimer RA, Stillman BW, Nagata K, Tamanoi F, Hurwitz J. (1984) DNA sequences required for the in vitro replication of adenovirus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **81**:3069-73.
46. Gronostajski RM, Adhya S, Nagata K, Guggenheimer RA, Hurwitz J. (1985) Site-specific DNA binding of nuclear factor I: analyses of cellular binding sites. *Mol Cell Biol.* **5**:964-71.
47. Chaudhry AZ, Vitullo AD, Gronostajski RM. (1998) Nuclear factor I (NFI) isoforms differentially activate simple versus complex NFI-responsive promoters. *J Biol Chem.* **273**(29):18538-46.
48. Alevizopoulos A, Dusserre Y, Tsai-Pflugfelder M, von der Weid T, Wahli W, Mermoud N. (1995) A proline-rich TGF- β -responsive transcriptional activator interacts with histone H3. *Genes Dev.* **9**:3051-66.
49. Altmann H, Wendler W, Winnacker EL. (1994) Transcriptional activation by CTF proteins is mediated by a bipartite low-proline domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**:3901-47.
50. Xiao H, Lis JT, Xiao H, Greenblatt J, Friesen JD. (1994) The upstream activator CTF/NF1 and RNA polymerase II share a common element involved in transcriptional activation. *Nucleic Acids Res.* **22**(11):1966-73.
51. Kim TK, Roeder RG. (1994) Proline-rich activator CTF1 targets the TFIIB assembly step during transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**(10):4170-4.

52. Gao B, Jaffe H, Kunos G. (1998) Histone H1 isoforms purified from rat liver bind nonspecifically to the nuclear factor 1 recognition sequence and serve as generalized transcriptional repressors. *Mol Cell Biochem.* **178(1-2)**:187-96.
53. Chiang CM, Roeder RG. (1995) Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators. *Science.* **267(5197)**:531-6.
54. Tarapore P, Richmond C, Zheng G, Cohen SB, Kelder B, Kopchick J, Kruse U, Sippel AE, Colmenares C, Stavnezer E. (1997) DNA binding and transcriptional activation by the Ski oncoprotein mediated by interaction with NFI. *Nucleic Acids Res.* **25(19)**:3895-903.
55. Baserga, S.J. and Steitz, J.A. eds. (1993) *The RNA word*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
56. Breathnach R, Benoist C, O'Hare K, Gannon F, Chambon P. (1978) Ovalbumin gene: evidence for a leader sequence in mRNA and DNA sequences at the exon-intron boundaries. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **75(10)**:4853-7.
57. Shapiro MB, Senapathy P. (1986) Automated preparation of DNA sequences for publication. *Nucleic Acids Res.* **14(1)**:65-73.
58. Jackson JJ. (1991) A reappraisal of non-consensus mRNA splice sites. *Nucleic Acids Res.* **19(14)**:3795-8.
59. Reed R, Hurt E. (2002) A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell.* **108(4)**:523-31.
60. Levine A, Durbin R. (2001) A computational scan for U12-dependent introns in the human genome sequence. *Nucleic Acids Res.* **29(19)**:4006-13.
61. Tarn WY, Steitz JA. (1996) A novel spliceosome containing U11, U12, and U5 snRNPs excises a minor class (AT-AC) intron in vitro. *Cell.* **84(5)**:801-11.
62. Hall SL, Padgett RA. (1994) Conserved sequences in a class of rare eukaryotic nuclear introns with non-consensus splice sites. *J Mol Biol.* **239(3)**:357-65.
63. Hall SL, Padgett RA. (1996) Requirement of U12 snRNA for in vivo splicing of a minor class of eukaryotic nuclear pre-mRNA introns. *Science.* **271(5256)**:1716-8.
64. Tarn WY, Steitz JA. (1996) Highly diverged U4 and U6 small nuclear RNAs required for splicing rare AT-AC introns. *Science.* **273**:1824-1832.
65. Grabowski PJ, Black DL. (2001) Alternative RNA splicing in the nervous system. *Prog Neurobiol.* **65**:289-308.
66. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

67. Horton W, Miyashita T, Kohno K, Hassell JR, Yamada Y. (1987) Identification of a phenotype-specific enhancer in the first intron of the rat collagen II gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **84(24)**:8864-8.
68. Gorman C. (1985) *DNA Cloning: A Practical Approach* (Glover, D. M., ed) Vol. 2, pp. 143-190, IRL Press, Oxford.
69. Frilander MJ, Steitz JA. (1999) Initial recognition of U12-dependent introns requires both U11/5' splice-site and U12/branchpoint interactions. *Genes Dev*. **13(7)**:851-63.
70. Hastings ML, Krainer AR. (2001) Functions of SR proteins in the U12-dependent AT-AC pre-mRNA splicing pathway. *RNA*. **7(3)**:471-82.
71. Markovtsov V, Nikolic JM, Goldman JA, Turck CW, Chou MY, Black DL. (2000) Cooperative assembly of an hnRNP complex induced by a tissue-specific homolog of polypyrimidine tract binding protein. *Mol Cell Biol*. **20(20)**:7463-79.
72. Zhou G, Lefebvre V, Zhang Z, Eberspaecher H, de Crombrughe B. (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(24)**:14989-97.
73. Bridgewater LC, Lefebvre V, de Crombrughe B. (1998) Chondrocyte-specific enhancer elements in the Col11a2 gene resemble the Col2a1 tissue-specific enhancer. *J Biol Chem*. **273(24)**:14998-5006.
74. Xie WF, Zhang X, Sakano S, Lefebvre V, Sandell LJ. (1999) Trans-activation of the mouse cartilage-derived retinoic acid-sensitive proteingene by Sox9. *J Bone Miner Res*. **14(5)**:757-63.
75. Deere M, Rhoades Hall C, Gunning KB, LeFebvre V, Ridall AL, Hecht JT. (2001) Analysis of the promoter region of human cartilage oligomeric matrix protein (COMP). *Matrix Biol*. **19(8)**:783-92.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A dolgozat témájául szolgáló munkát az MTA Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézetének Köttöszöveti Csoportjában végeztem. Köszönettel tartozom a Szegedi Biológiai Központ, Biokémiai Intézet vezetőinek, az intézet és csoportunk valamennyi dolgozójának, akik munkám során segítségemre voltak .

Témavezetőmnek, Dr. Kiss Ibolyának nagyon sok hálával tartozom azért, hogy pályámon elindított és mindig számíthattam a támogatására a tudományos problémákat meghaladó kérdésekben is. Köszönöm Dr. Deák Ferencnek az elméleti és gyakorlati támogatását, amivel nagyon sokszor segített a felmerülő problémák megoldásában. A Köttöszöveti Laboratórium minden egykori és jelenlegi munkatársának, köszönöm a baráti légkört, ami a mindennapi eredményes munka előfeltételét biztosította számomra.

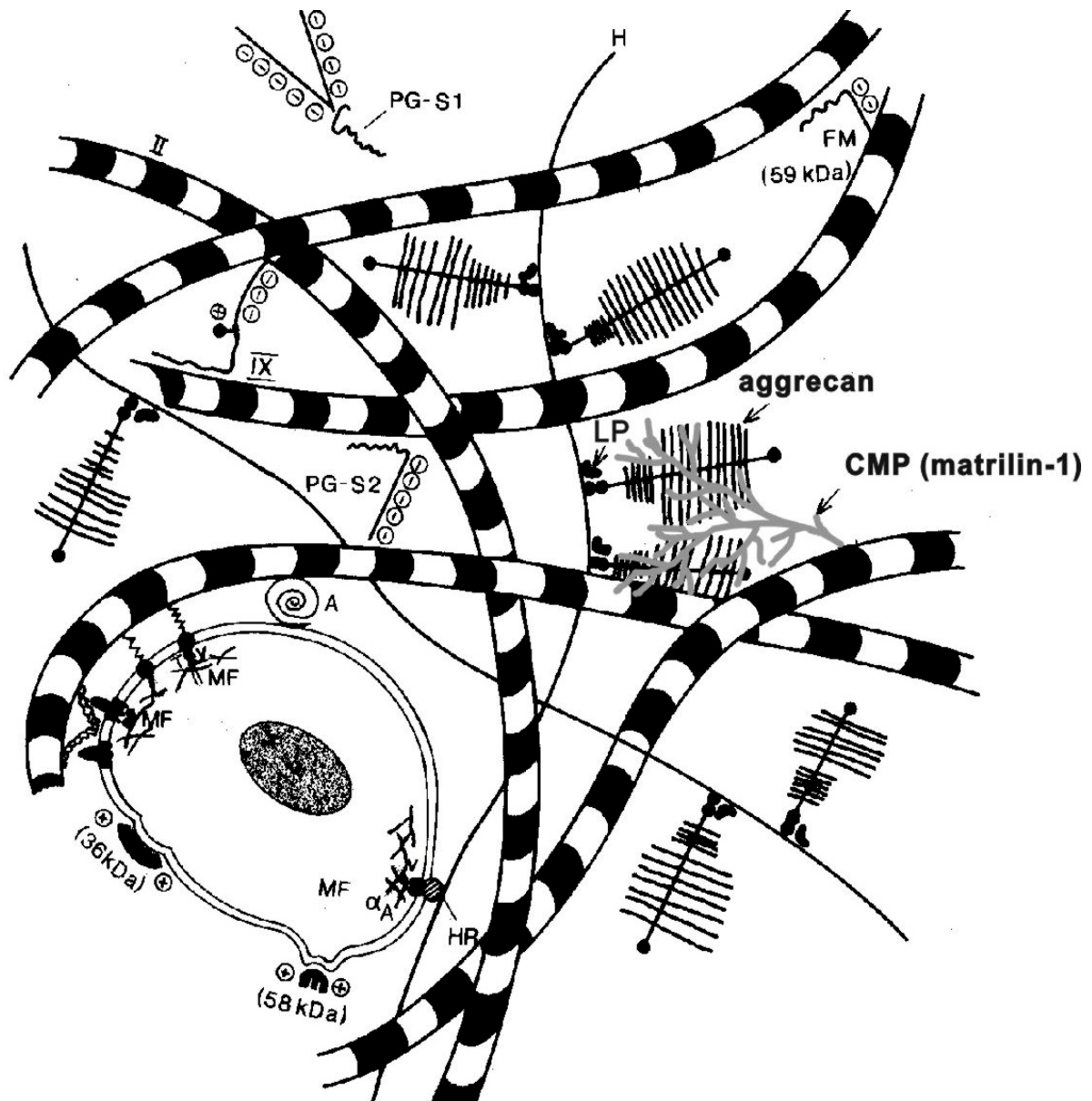
Külön köszönöm:

- Dr. Domonkos Ágotának a fehérje expressziós munkákkal kapcsolatos tanácsait.
- Karcagi Ildikónak az AT-AC intronok vizsgálatában fontos plazmidkonstrukciók elkészítését, valamint önzetlen baráti támogatását.
- Mátés Lajosnak a tudományos és lélekemelő baráti diszkusszióit.
- Dr. Nagy Tündének a tranziens expressziós kísérletekben nyújtott segítségét.
- Dr. Jaideep Moitra-nak a DNS-fehérje kölcsönhatások vizsgálatára alkalmas technikák átadását.
- Otonchimeg Rentsendorj-nak a transzkripciós enhancer szubklónozásában végzett munkáját és az *in vivo* footprint technikának az átadását.
- Dr. Szabó Piroskának a primer szövettenyésztési módszerek és rekombináns DNS technikák fortélyainak átadását és segítőkészségét.
- Dr. Szelei Józsefnek a nemi és egyéb szteroid hormonokkal kapcsolatos baráti beszélgetéseit és tanácsait.

Szeretném megköszönni a csoportunk asszisztenseinek: Illésné Kovács Katalinnak, Kravjár Ildikónak és Simon Ferencné, Anikónak a nélkülözhetetlen és segítőkész munkáját.

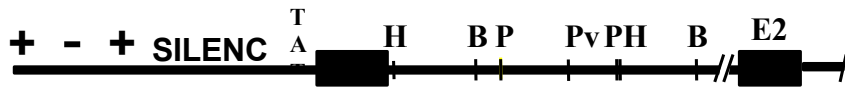
Hálával tartozom Tóth Sándornének a disszertáció ábráinak elkészítéséért.

Végül, de nem utolsósorban szeretnék köszönetet mondani szüleimnek és a tágabb családomnak is a bizalomért és a támogatásért, amit mindig magam mögött tudhattam. Külön köszönöm Dunai Ágnesnek, feleségemnek az általa megteremtett nyugodt családi háttérrel és Míra lányunk nevelésében fel/át-vállalt rész maradéktalan teljesítését.



1. ábra: A porc mátrix jellegzetes makromolekulái és a sejt-mátrix kapcsolatok.

II: II. típusú kollagén, IX: IX. típusú kollagén, PG: aggrecan, H: hialuronsav, PG-S1: biglükán, PG-S2: decorin, LP: kapcsolófehérje, CMP: porc matrix fehérje, FM: fibromodulin, HR: hialuronsav receptor, A: anchorin, 36 kDa: 36 kDa fehérje, 58 kDa: 58 kDa fehérje. MF: mikrofilamentum. V: vinculin. T: talin. α A: α -aktinin.

A**B**

Relatív CAT aktivitás

40 80 120 140

Ha(-)

B(+)(-)

PB1(+)

PPv(+)

PB2(+)

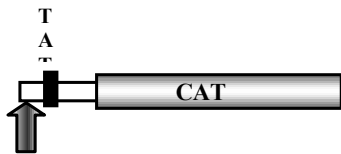
BPv(+)(-)

Pb(+)

PvB(+)

CEC

HDM

C

2. ábra: A csirke matriline-1 gén első intronjának funkcionális térképezése.

A: Az egyes deléciós konstrukciók által lefedett introni szakaszok.

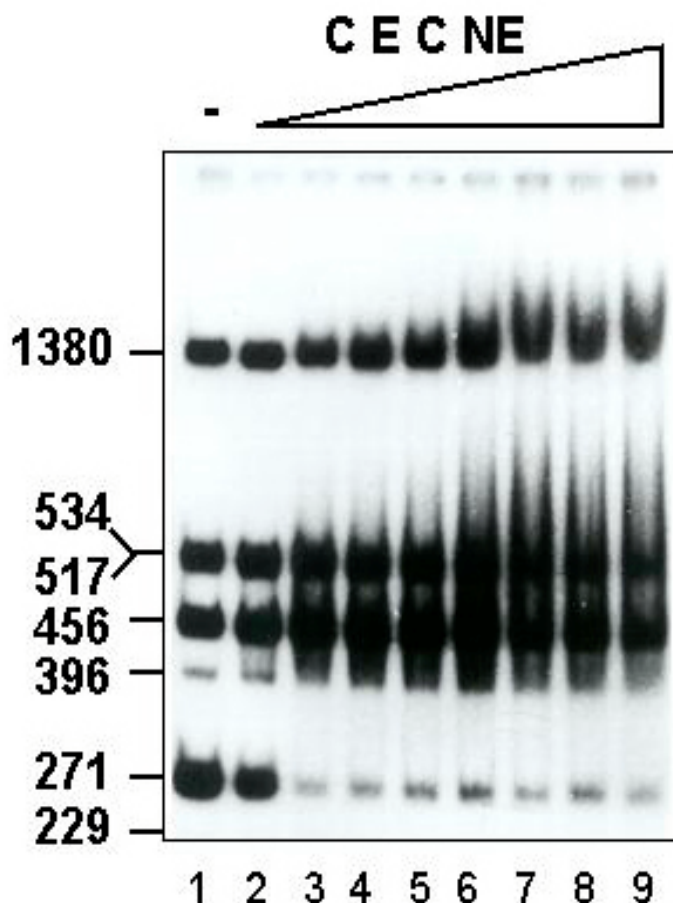
B: A deléciós sorozat tagjainak tranziens expresszióban detektált aktivitása, CEC és HDM kultúrában.

C: A matriline-1 gén minimál promoterét hordozó alapkonstrukció sematikus képe, amibe a sorozat egyes elemeit építettük. A nyíl az illesztés helyét mutatja.

Sejtkultúrák	Relatív CAT aktivitás	
	N(-15)	N(-15)*E _{CMP}
CEC	29.2% +/- 2.9	142.3% +/- 5.3
HDM	36.7% +/- 3.2	119.8 +/- 7,7
CEF	24.2% +/- 3.4	35.4% +/- 5.7
CEM	31.5% +/- 4.5	23.5% +/- 5.7
HeLa	16.6% +/- 6.8	28.1% +/- 6.9

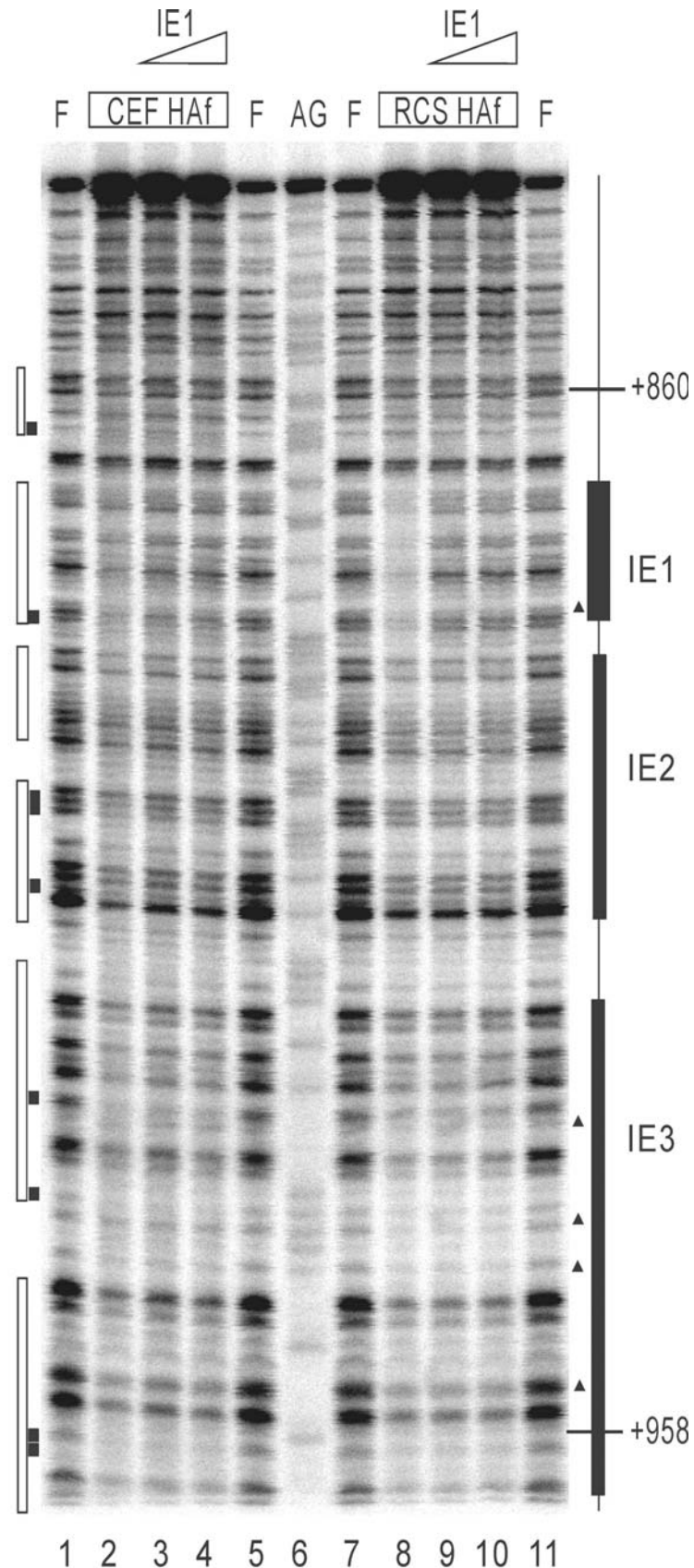
1.táblázat: A matrillin-1 minimál promotert és enhancert tartalmazó riporter gén konstrukciók működése különböző sejttípusokban.

A relatív CAT aktivitásokat a pSV2CAT kontroll plazmid esetén mért konverziós értékek alapján számoltuk. N(-15): minimál promoter, N(-15)*E_{CMP} : matrillin-1 enhancer, CEC: chicken embryonic chondrocyte, HDM: high density mesenchyme, CEF: chicken embryonic fibroblast, CEM: chicken embryonic myoblast.



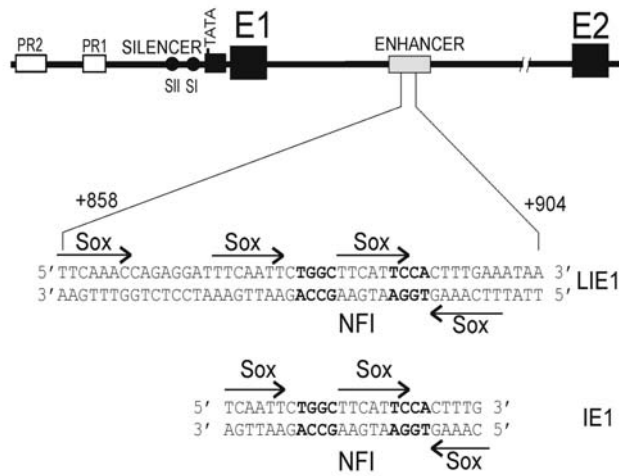
3. ábra: „Multiple Band Shift” kísérlet a DNS-fehérje kölcsönhatásban leginkább érdekelt introni enhancer szakasz *in vitro* azonosítására.

A teljes introni enhancer régiót hordozó plazmidkonstrukció *Hinf* I-gyel történő hasítása után kapott fragmentum populációt radioaktívan jelöltük, majd emelkedő mennyiségű CEC sejtmagi kivonattal inkubáltuk. A kialakuló nukleoprotein komplexeket natív gélen választottuk el. Az ábra bal oldalán a a fragmentumok méreteit jelöltük.



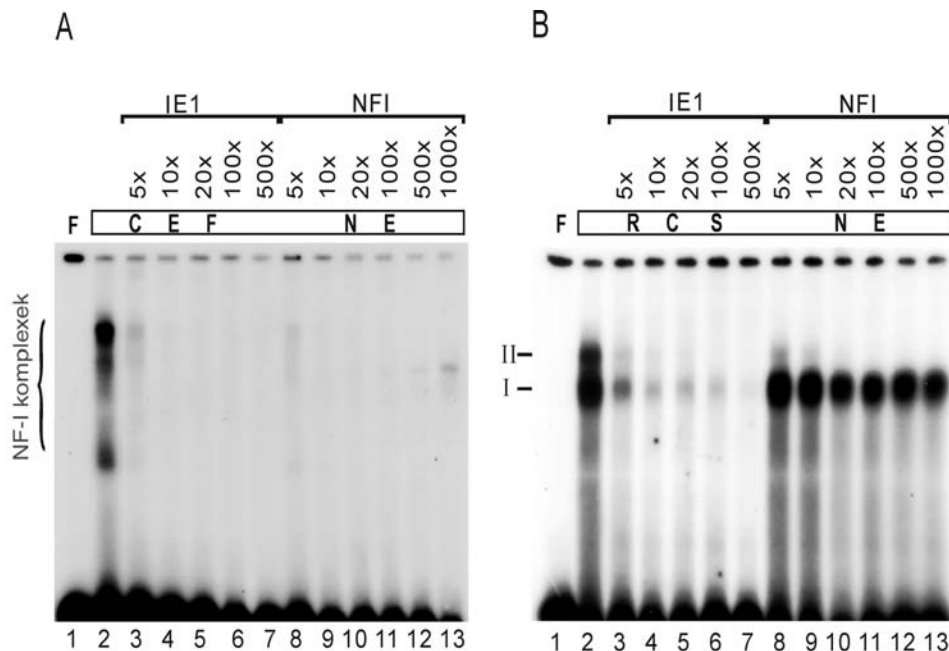
4. ábra: *In vitro* DNase I footprint kísérlet a matrilin-1 introni enhancer régiójához kapcsolódó fehérjék kimutatására.

A kísérletben heparin-agarose oszlopon részlegesen tisztított CEF és RCS sejtmagi kivonatok frakcióit használtuk (2-4. és 8-10. sáv). 10x-es (3. és 9. sáv) és 100x-os (4. és 10. sáv) moláris feleslegben ds IE1 hideg kompetítort adtunk a reakciókhoz. Fehérje frakció nélküli kontroll: 1, 5, 7 és 11. sáv. AG: Maxam-Gilbert szekvenciázó létra. Az ábra két oldalán téglalapok mutatják a DNase I-védett szakaszok elhelyezkedését. A jobb oldalon a TATA motívumtól számított távolságot jelöltük.



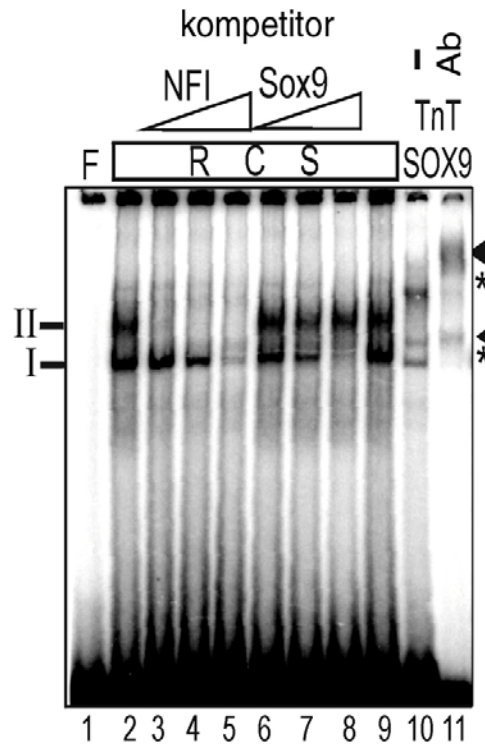
5. ábra: A csirke matrilin-1 gén fontosabb transzkripció szabályozó régiói.

A rövid "IE1" és hosszú "LIE1" introni enhancer elem nukleotid szekvenciája. A nyílak putatív Sox-típusú transzkripció faktorok kötőhelyeit jelzik, míg a megvastagított szekvencia részletek a putatív NF-I kötőhelyeket mutatják.



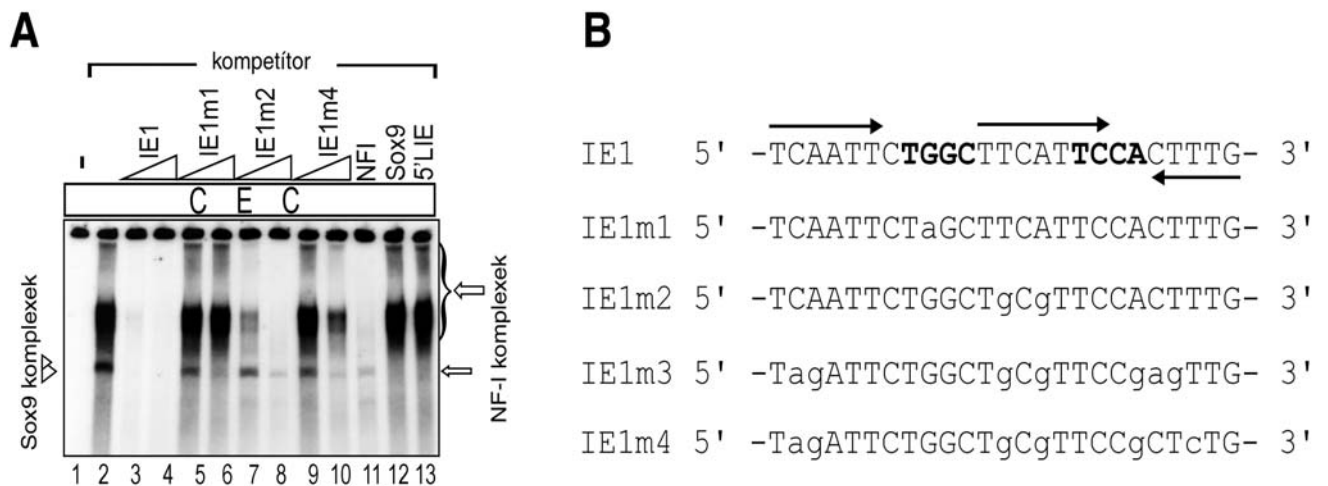
6. ábra: Az IE1 elemhez kötődő transzkripció faktorok azonosítására kompetíciós EMSA kísérlettel.

A végjelölt oligonukleotidokat CEF és RCS sejtmagi kivonattal inkubáltuk, majd hideg dupla szálú kompetitorokat adtunk emelkedő moláris feleslegben a reakciókhoz.



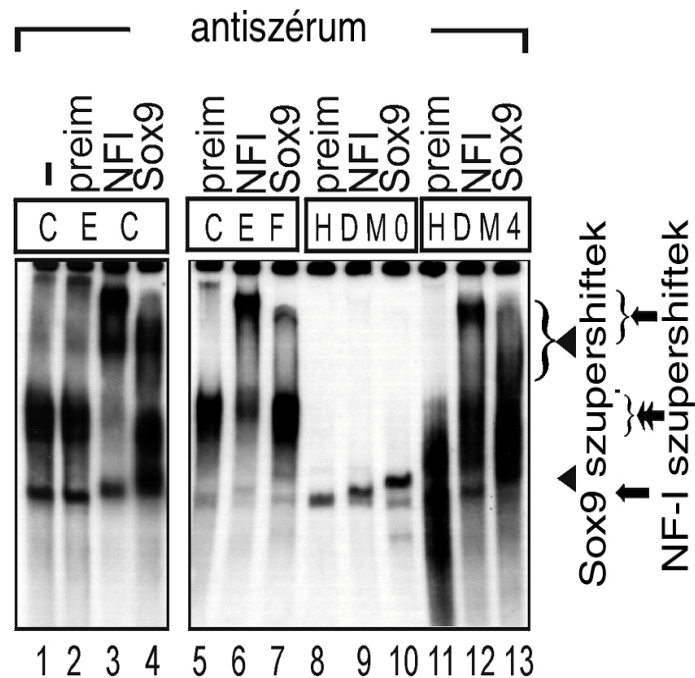
7. ábra: Az IE1 elemhez kötődő transzkripció faktorok azonosítása kompetíciós EMSA kísérlettel.

A végjelölt oligonukleotidokat RCS sejtmagi kivonattal és *in vitro* szintetizált SOX9 transzkripció faktorral inkubáltuk, majd hideg, dupla szálú kompetitorokat adtunk 100-, 500- és 2500-szeres moláris feleslegben az ábra tetején jelzett reakciókhoz. Végül SOX9 specifikus ellenanyagot adtunk a jelzett reakcióhoz.



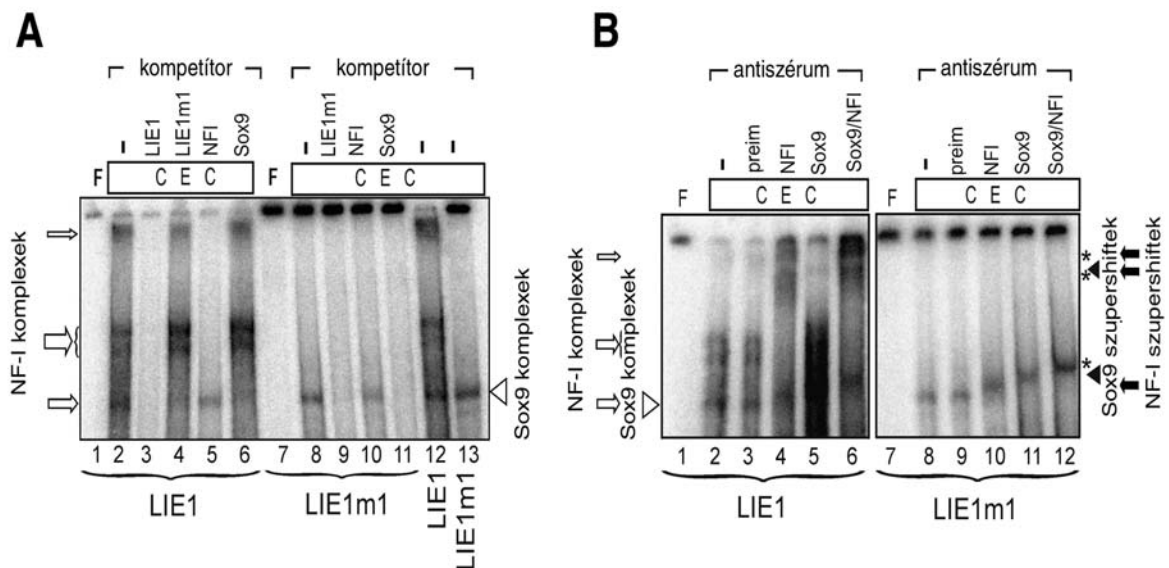
8. ábra: Az NF-I és SOX9 faktorok IE1 elemhez kötődésének bizonyítása kompetíciós EMSA kísérlettel.

A: A végjelölt oligonukleotidokat CEC sejtmagi kivonattal inkubáltuk, majd hideg, dupla szálú mutáns kompetitorokat adtunk 10- és 100-szoros moláris feleslegben a reakciókhoz. **B:** A mutáns oligonukleotidok nukleotid szekvenciája. Csak a felső szálát mutatjuk, kisbetűvel szedve a mutáns nukleotidokat. A nyílak a Sox9 kötőhelyeit, a vastagon szedett szekvencia részletek az NF-I felismerő motívumokat jelzik.



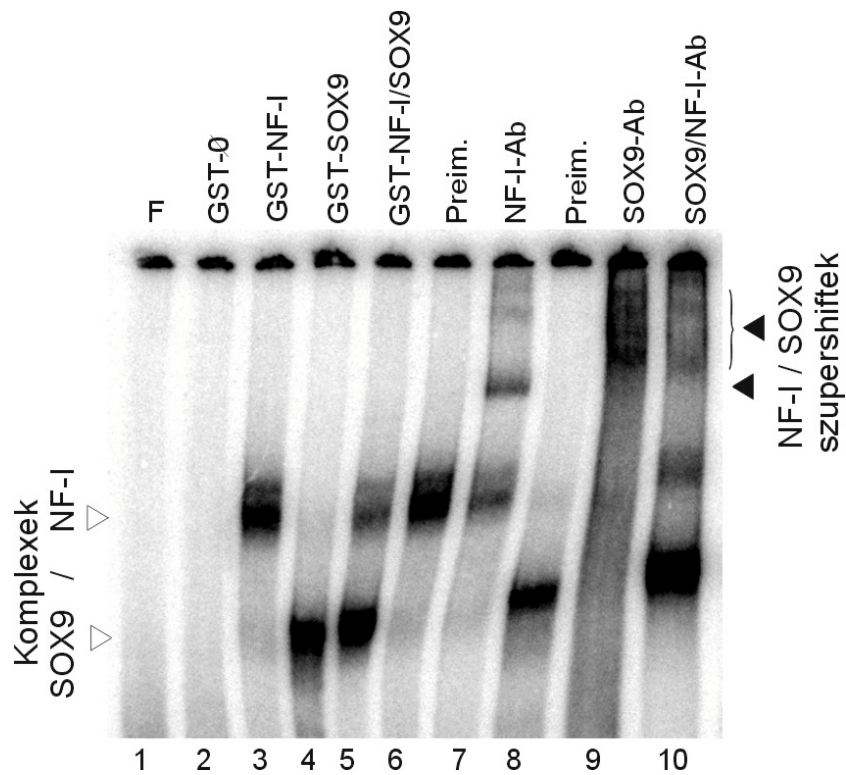
9. ábra: Az IE1 elemhez kötődő transzkripció faktorok azonosítása “supershift” kísérletekkel.

A végjelölt oligonukleotidokat CEC, CEF, HDM0 és HDM4 kultúrákból tisztított sejtmagi kivonattal, valamint SOX9 és NF-I specifikus ellenanyagokkal inkubáltuk. Az ellenanyagok SOX9, illetve NF-I specifikus kötődése folytán elmozdult komplexeket az ábra jobb oldalán jelöltük.



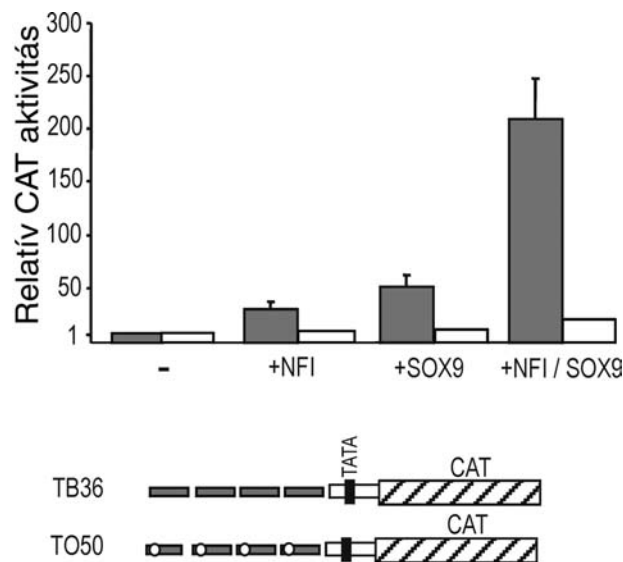
10. ábra: Az NF-I és Sox9 faktorok introni LIE1 elemhez kötődésének bizonyítása.

A: A végjelölt LIE1 és LIE1m1 (NF-I köthelyben mutáns) oligonukleotidokat CEC sejtmagi kivonattal inkubáltuk, majd hideg, dupla szálú kompetitorokat adtunk 100-szoros moláris feleslegben a reakciókhoz. **B:** Az NF-I és Sox9 faktorok kötődésének bizonyítása “supershift” kísérlettel. A jelzett mintákhoz preimmun szérumot, SOX9 és NF-I specifikus ellenanyagokat adtunk. Az ábra két oldalán jelöltük az ellenanyagok specifikus kötődése következtében elmozdult komplexeket.



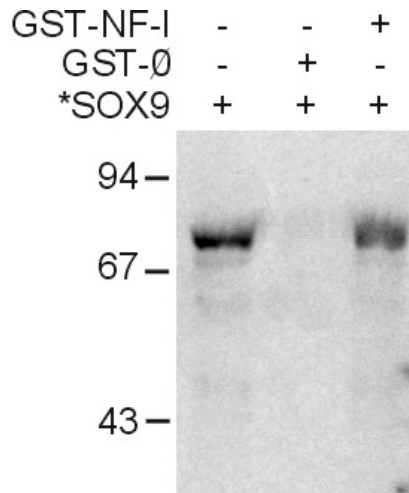
11. ábra: Tisztított GST-SOX9 és GST-NF-I fúziófehérjék *in vitro* kötődésének vizsgálata EMSA kísérlettel.

Baktériumokkal termeltetett és affinitás tisztított fehérjéket használtunk a kötési reakciókban, a transzkripciós faktorokra specifikus ellenanyagokkal megerősítettük a fehérjék introni enhancerhez való kötődését.



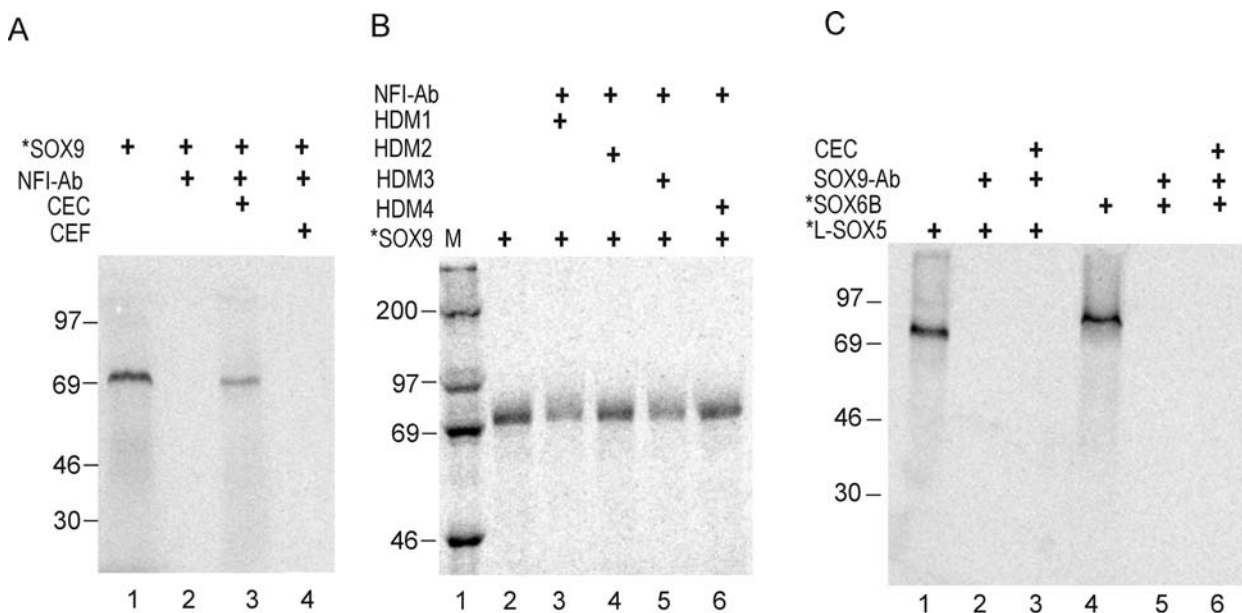
12. ábra: A Sox9 és NF-I faktorok kooperatív működésének vizsgálata tranziens expressziós kísérletben.

COS-7 sejteket 100 ng NF-I-et és 500 ng SOX9-et expresszáló plazmidokkal transzfektáltuk, a teszt plazmidokból (TB35 és TO50) 1-1 ug-ot juttattunk a sejtekbe. Alul mutatjuk be a riporter konstrukciókat, amelyek 4 példányban hordozzák az introni 102 bp-os enhancert. A TO50-ben az NF-I hely van elmutáltatva. A relatív CAT aktivitásokat teszt plazmid alap aktivitásához viszonyítottuk.



13. ábra: A SOX9 és NF-I faktorok *in vitro* kölcsönhatásának vizsgálata.

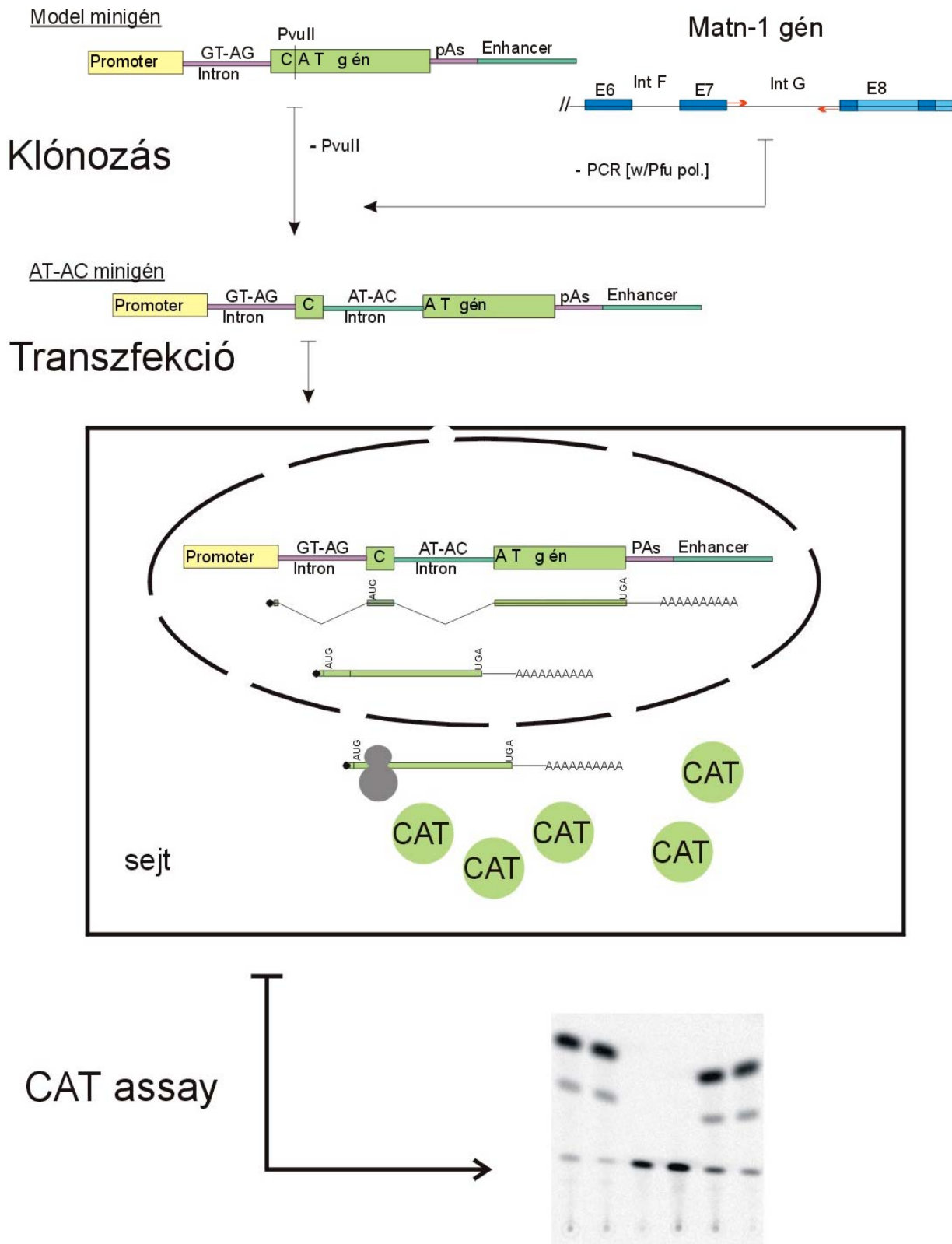
A GST pull-down kísérletben a SOX9-et ^{35}S jelölt formában adtuk, míg az NF-I-et GST-vel fúzionáltatott formában volt. (Részletes magyarázat a szövegben.)



14. ábra: A Sox9-cel kölcsönható NF-I izoformák előfordulása különböző sejtípusokban.

A: Az immunprecipitációs kísérletben a SOX9-et ^{35}S -jelölt formában adtuk a különböző eredetű sejtmagi kivonatokhoz, majd NF-I specifikus ellenanyaggal távolítottuk el a kölcsönható izoformákat. **B:** Különböző korú HDM kultúrákból származó magi fehérjekivonatok tesztelése **C:** ^{35}S -jelölt L-Sox5 és Sox6 adásával vizsgáltuk az NF-I és Sox9 faktorok kölcsönhatásának specifikusságát.

16. ábra: *In vivo* footprint kísérlet CEC és CEF sejtekben az introni enhancer régió vizsgálatára. CEC és CEF kultúrákat DMS és UV kezelésnek tettünk ki, majd összehasonlítottuk a tisztított genomi DNS védettségét az *in vivo* nem kezelt DNS mintákból származó mintázattal. (Részletes magyarázat a szövegben.)



17. ábra: Az eukaryota minigént tartalmazó riporter konstrukció elkészítésének vázlata.

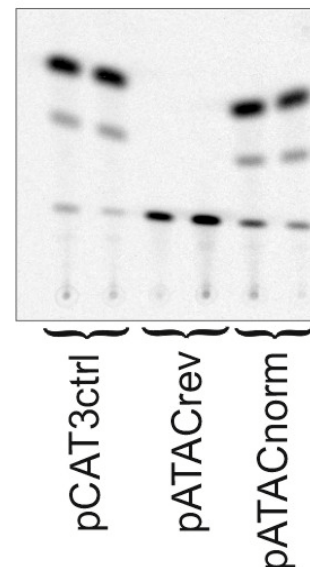
18. ábra: Az eukaryota AT-AC minigént hordozó modellek tranziens expresszióban történő vizsgálata.

pCAT3ctrl: nem manipulált eredeti riporter plazmid

pATACrev: az AT-AC intront fordított orintációban hordozó minigén

pATACnorm: az AT-AC intront eredeti orintációban hordozó minigén

COS-7 sejteket transzfektáltunk a jelzett konstrukciókkal, majd 48 óra múlva mértük a CAT aktivitást.



Humán matrilin-1:

GGAAACUAUCCUCCCAGAGGGGCUGGGGCUGGGAGGGGCGCAGGCCAGUGUU
GGGGAGGCGGGGC

Egér matrilin-1:

GGAAGCAUAUCCUUCUCAGGCUGUGGAGGGCAGGAGUGGGAGGACUGGAGGAG
UACAGGGGCCAGGAUGCGGGGUCAUCCACAGAGAGGUCUGGCUUAGGUGUUG
CCUAAAGCUUGGGGCAGCCUCCUCCUGCUAAGGCCUGGAU

Csirke matrilin-1:

CAGAAUAUCCUUUGGAAGCUCUUGUUCAGCACCCAGUUGAGCUGGGUUGGGCUU
UCUGGAGGGAUCACCUGAGAAAGUCUAUCCAUGGGGAAAACAGGCAGGUUAGAUUA
ACGGUICGGGAAGUUGGGAACUAGAUUGGUUGGGUUCUUGAATUGUUGU

19. ábra: Matrilin-1 gének AT-AC intronjainak 5' szakasza.

A megvastagított fekete színű szekvencia részletek az 5' exoni szekvenciákat jelölik. A kékre színezett szakaszok a konszenzus AT-AC splice donor helyeket mutatják, míg a piros szekvencia részletek a konzerválódott *cisz* motívumokat jelölik.

20. ábra: Az eukaryota deléciós minigének működésének vizsgálata tranziens expressziós kísérletben

pCAT3ctrl: nem manipulált, eredeti riporter plazmid

pATACnorm: az AT-AC intront eredeti orintációban hordozó minigén.

pATACdel: az AT-AC intron deléciós változata.

COS-7 sejteket transzfektáltunk a jelzett konstrukciókkal, majd 48 óra múlva mértük a CAT aktivitást

