

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

***A Metal-responsive transcription factor-1 és a
glutathion peroxidáz család tagjait kódoló gének azonosítása és
expressziójának jellemzése pontyban***

Ferencz Ágnes

Témavezető: Dr. Hermes Edit
egyetemi adjunktus

Környezettudományi Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

2010.

1. BEVEZETÉS

Környezetünk, és ezen belül folyó-, és állóvizeink szennyezése napjainkban is visszatérő és megoldásra váró problémája társadalmunknak, mely aktualitását tovább fokozhatják egyes katasztrófa helyzetek, mint például a Tiszán végigsöprő 2000. évi cián- és nehézfém-szennyezés. A vizeinkben élő halak számára fokozott veszélyt jelent, hogy nem csak a táplálékkal együtt halmozhatják fel testükben az idegen anyagokat, de kopolyájukkal és bőrükkel állandó, szoros közelségben vannak a vízzel, és a vízben oldott anyagokkal.

A nehézfémek (mint például Cd^{2+} , As^{3+}) számos élettani folyamatot befolyásolhatnak negatív irányban; közvetlenül károsíthatják a sejt fehérjéit és az örökítő anyagát, reaktív oxigén szabadgyökök és intermedierek (ROS) képződését gerjeszthetik, amelyek fokozott sejt-, és szövethárosodást idézhetnek elő. A környezet stresszhatásaira adott gyors válaszadás képessége, illetve az ennek során aktiválódó gének és fehérjék rendszere általános jellemzője az élőlényeknek, és nagyfokú homológiát mutat a baktériumoktól kezdve az emlősökig.

Jelenlegi ismereteink szerint a nehézfémek által indukált válaszreakciók két fő útvonal köré csoportosulnak a sejtben. Az egyik útvonal részvevői a nagymennyiségű fém-ion megkötésére képes metallothioneinek (MT) és a MT-ek transzkripcióját elsődlegesen szabályzó *Metal-responsive transcription factor* (MTF-1) faktor. A másik útvonal tagjai a redukált glutation (GSH) és azok az enzimek, melyek vagy a GSH-t használják koszubrátként; mint a glutation peroxidázok (GPx) és a glutation-S-transzferázok (GST), vagy a GSH szintézisében vesznek részt; mint a γ -glutamil-cisztein szintetáz (γ -GCS) és a glutation szintetáz (GSS). Az általunk is vizsgált MTF-1, GPx1 és GPx4 család fehérjei kulcsfontosságú tagjai ezen védekező rendszereknek. Expressziós mintázatukról és szabályzásukról korlátozottak az irodalmi ismeretek, pedig vizsgálatuk hozzájárulhat a sejtek antioxidáns védekező rendszerének alaposabb megismeréséhez. Mivel kísérleteinket *in vivo*,

kifejlett állatokon végeztük, így eredményeink valószínűleg jól közelítik a valós ökoszisztémákban bekövetkező változásokat.

Stresszmentes körülmények között a MT-ek fontos szerepet játszanak az esszenciális fémionok (Zn^{2+} , Cu^{2+}) szállításában és raktározásában. Jelentőségük fokozott, ha toxikus nehézfémek (Cd^{2+} , As^{3+} , Pb^{2+}) jutnak a szervezetbe. A MT-ek denaturálódás nélkül képesek a fémionok megkötésére. A MT-ek expressziója elsődlegesen transzkripcionális úton szabályozódik, a folyamat egyik kulcsszereplője az MTF-1 faktor. Az elmúlt két évtized során az MTF-1-et konstitutívan expresszáló fehérjeként könyvelték el, feltételezték, hogy szabályozása kizárólag poszttranszlációs úton történhet.

A GSH egy mindössze három aminosavból (γ -Glu-Cys-Gly) álló antioxidáns hatású molekula. Szabad -SH csoportja révén oxidatív stressz esetén könnyebben oxidálódik, mint a sejt fehérjéi; nehézfém terhelés esetén fémionokat köthet. Emellett részt vesz az aszkorbinsav és rajta keresztül az E-vitamin regenerálásában. Szerepet játszik a H_2O_2 és a lipidperoxidok redukálásában, illetve a xenobiotikumok semlegesítésében.

A GPx enzimek az antioxidáns védelmi rendszer nélkülözhetetlen elemei. Egyes családok a membránok védelmét biztosítják, mások a citoszol és a sejtorganellumok oxidatív károsodása ellen hatnak. Képesek semlegesíteni a H_2O_2 -t, egyes szerves lipidperoxidokat, és a koleszterol-észtereket, redukált GSH-t használva fel kozubsztrátként. Emlősökben eddig nyolc különféle, a GPx családba tartozó fehérjét azonosítottak; halakban elsősorban a klasszikus GPx1 és a membránokhoz közvetlenül kapcsolódni képes foszfolipid hidroperoxid GPx (GPx4) család tagjait vizsgálták.

2. CÉLKITŰZÉS

Munkacsoportunk fő célja minél több, a stressz-válaszadásban résztvevő géncsalád azonosítása halakban és szerepük vizsgálata a környezeti stresszhatásokkal szembeni védekezésben. A dolgozatomban szereplő kísérletek kezdetén célul tűztük ki az MTF-1 transzkripciós faktort és a GPx-ok két legismertebb családjának tagjait, a GPx1 és GPx4 enzimeket kódoló gének azonosítását pontyban.

Terveztük továbbá a gének expressziós mintázatának vizsgálatát egyrészt kezeletlen halak, másrészt nehézfém-kezeléseknek (Cd^{2+} , As^{3+}), vagy hirtelen hőmérséklet-változásnak kitett állatok szerveiben. A stresszhatásokat követően a génexpresszió-változásokat májban, a méregtelenítés egyik központi szervében, illetve az agyban terveztük követni. Az agy magas oxigén-tartalma miatt különösen érintett a szabadgyök-képződéssel járó folyamatokban.

Kísérleteink harmadik részében a Cd^{2+} -kezelést követően kívántuk vizsgálni a sejtek károsodását jelző paramétereket; a lipidperoxidációt, a redukált és oxidált GSH mennyiségének, illetve az egy- és kétszálú DNS-ek arányának változását, valamint a GPx és a glutation reduktáz (GR) enzimek aktivitását.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleti állatok és kezelési körülmények

Valamennyi, a dolgozatban leírt kísérletet ponttyal (*Cyprinus carpio* L.) végeztük el. A halakat a Tiszai Halgazdaság Fehértói Telepéről szereztük be. A halakat a kezeléseik előtt jól levegőztetett kádakban 2-3 hétig akklimatizáltuk. A kezeléseikhez a halakat 100 l-es akváriumokba helyeztük át (mérettől függően 2-3 hal/akvárium).

A kísérleti állatokat $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -val és $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -val kezeltük, a fémionra normalizált végkoncentráció minden esetben 10 mg/l volt. A hidegsokk esetén a halakat 7 °C-os hőmérséklet csökkenésnek tettük ki. Mintavétel közvetlenül a hidegsokk, illetve 1 órás *recovery* periódus után történt. A kezeléseik minden mintavételi pontjában három vagy négy egyedet használtunk fel a mérésekhez.

Alkalmazott módszerek

Nukleinsav preparálás (genomi DNS, mRNS, plazmid DNS)

In vitro DNS rekombinációs technikák: ligálás, transzformálás

Reverz transzkripcióval kapcsolt polimeráz láncreakció

GSH/GSSG szint meghatározás

Lipidperoxidáció mérése

GPx és GR aktivitás mérése

DNS száltörés meghatározása fluorimetriás módszerrel

Filogenetikai analízis

4. EREDMÉNYEINK

Mivel az *mtf-1*, és a *gpx* gének esetében nem állt rendelkezésünkre szekvencia információ pontyból, ezért először a GenBank-ban található hal és emlős fajok szekvenciái alapján olyan primereket tervezzünk, melyek lehetővé tették a vizsgálni kívánt gének azonosítását, egy-egy hosszabb szakaszának felamplifikálását. A szekvencia analízisek eredményei alapján elmondhatjuk, hogy 1.) bár a szintén a pontyfélék családjába tartozó zebradánió esetében két *gpx1* gént azonosítottak, más fajokhoz hasonlóan pontyban csak egy *gpx1* gén található; 2.) több más halfajhoz (zebradánió, aranyhal, lazac) hasonlóan két *gpx4* gén, *gpx4a* és *gpx4b* azonosítható pontyban. Mindhárom ponty *gpx* gén esetében a fehérjéjé kódoló régió több mint 95 %-át meghatároztuk. 3.) egy fajon belül elsőként azonosítottunk két különböző *mtf-1* gént (*mtf-1.1* és *mtf-1.2*), illetve izoláltuk az *mtf-1.1* gén egy *splice*-variánsát (*mtf-1.1a*). Az MTF-1.1 és az MTF-1.2 fehérje 98 %-os hasonlóságot mutat, kilenc pozícióban található aminosav-csere; kizárólag a transzaktivációs doménekben. Emiatt valószínűsíthető, hogy a két ponty MTF-1 fehérje más partnerekkel lép kölcsönhatásba. A ponty a *Cyprinidae* család számos tagjához hasonlóan több teljes illetve részleges genom- és gén-duplikáción esett át; egy természetes tetraploid faj. Az MTF-1.1a izoforma esetében az alternatív *splicing* során kialakult *frame shift* megváltoztatja a fehérje C-terminálisának aminosav-sorrendjét. A DNS-kötő domének azonosak az MTF-1.1 fehérjével, így az izoforma feltételezhetően képes kötődni az MTF-1 faktor target génjeinek promóteréhez, a transzaktivációs domének hiánya miatt azonban az eredeti formájában nem képes ellátni a funkcióját. Mindegyik azonosított ponty gén igen nagy hasonlóságot mutat a pontyfélék családjába tartozó többi fajból (zebradánió, aranyhal, amur) ismert *gpx* és *mtf-1* gének szekvenciáival. A fehérjékben megtalálhatóak az egyes fehérjecsaládokra jellemző motívumok és kulcsfontosságú pozíciójú aminosavak.

Kísérleteink további részében az azonosított szekvenciák alapján ponty-specifikus primereket terveztünk, melyek felhasználásával követtük a gének expresszióját kezeletlen halak öt különböző szövetében; májban, vesében, szívben, izomban és agyban, illetve három izolált agyrégióban; a szaglólebenyben, a középagy régióban és a kisagyban.

Májban kiemelkedően magas *gpx4a* expressziót mértük. A *gpx4b* esetében a legmagasabb expressziót a szaglólebenyben tapasztaltuk, míg a vesében és a kisagyban nem volt kimutatható. A *gpx4* gének expressziója korábban nem volt ismert halakban, emlősök esetében pedig minden eddig ismert fajban csak egy *gpx4* gént tudtak azonosítani. A *gpx1* gén expressziója májban, vesében és agyban ismert volt néhány halfajban, azonban a ponty *gpx1* expressziója lényeges eltérést mutat más fajok eredményeihez képest. A ponty *gpx1* legnagyobb mennyiségben a szívben expresszáldott, de vesében és a középagy régióban is magas szinteket mértünk. Mind az aranyhalban, mind a fehér busában végzett kísérletek során a *gpx1*-nek elsősorban máj-specifikus expressziójáról számoltak be, agyban az aranyhal esetében nem volt detektálható mennyiségben jelen.

Az *mtf-1* gének korábbi vizsgálataiban során Northern-hibridizációval nem mutattak ki szövetspecifikus expressziót kezeletlen állatokban; sem halakban, sem emlősökben. Kísérleteink során mindhárom *mtf-1* mRNS-t az agyban tudtuk jelentős mennyiségben detektálni. Májban a legalacsonyabb *mtf-1.1* mRNS mennyiségeket mértük, az *mtf-1.1a* szint pedig a kimutathatósági határon mozgott. Az *mtf-1.2* mRNS kizárólag az agyban volt jelen kimutatható mennyiségben. Itt az *mtf-1.1/mtf-1.2* aránya közel három a kettőhöz volt. A vizsgált szövetekben az *mtf-1.1* expresszió volt a meghatározó.

A fémkezelések során 10 mg/l Cd^{2+} - illetve As^{3+} -kezelésnek tettük ki a halakat 24-96 óra hosszan. Minden vizsgált gén esetében idő- és szövetspecifikus változásokat tapasztaltunk. A Cd^{2+} -kezelés hatására májban a *gpx1*, *gpx4a* és *mtf-1.1* gének expressziója mérsékelt módon emelkedett; az *mtf-1.2*, az *mtf-1.1a* és a *gpx4b* mRNS-ek nem voltak

kimutatható mennyiségben jelen. Az agyrégiókban minden vizsgált gén expressziója a kezelési időtől függően különböző mértékű csökkenést mutatott. Az As^{3+} -kezelés hatására az *mtf-1* gének esetében bár kisebb mértékű, de hasonló tendenciájú változásokat láttunk mindkét szövetben, a *mtf-1.la splice*-variáns kivételével. Az *mtf-1.la* mRNS szintek a 48 órás As^{3+} -kezelést követően erős növekedést mutattak májban és agyban is. Az *mtf-1* és a *gpx4* gének transzkripcionális szintű szabályozására korábban nem volt példa az irodalomban. A *gpx1* expresszióját Cd^{2+} -kezelést követően egyedül aranyhal májban vizsgálták, azonban velünk ellentétben a *gpx1* mRNS szintek nagymértékű csökkenését tapasztalták már rövid idejű kezelést követően is.

A fizikai stresszhatások közül a hirtelen hőmérséklet-változás hatásait vizsgáltuk. Egyrészt, mivel ismert, hogy az édesvízi halak életében a természetben is nagy szerepet játszhat ez a stressz, másrészt mivel a hidegkezelés az oxidatív stresszhez hasonló hatást gyakorol a sejtekre. 1 illetve 5 óráig tartó 7 °C-os hőmérséklet-csökkenésnek tettük ki a halakat, illetve ezt követően egy 1 órás időtartalomra visszahelyeztük őket az inkubációs hőmérsékletre, amivel hősokkot váltottunk ki. Az 5 órás kezelésekre hatására az *mtf-1* gének, míg az 1 órás kezelésekre hatására a *gpx1* gén mutatott indukciót. A *gpx4a* gén esetében csökkent mRNS szinteket detektáltunk. A közvetlenül a hidegsokk után, illetve a *recovery* periódust követően vett minták között nem találtunk különbséget az *mtf-1*, *gpx1* és *gpx4a* gének vizsgálata során. A *gpx4b* gén expressziója, mely a fémkezelések hatására minden esetben csökkent, közvetlenül a hidegsokkot követően májban 2,5-szeres indukciót mutatott.

Jól ismert, hogy a Cd^{2+} -kezelés többek között oxidatív stresszhatást vált ki a sejtekben. Az oxidatív sejtkárosodás leggyakrabban vizsgált paramétereinek közé tartoznak a lipidperoxidáció és a DNS száltörés mértékének meghatározása, illetve a redukált és oxidált GSH szint változásainak követése. Májszövetben a 10 mg/l koncentrációjú Cd^{2+} -kezelést követően a korai időpontban mindhárom paraméter változása sejtkárosodásra, míg a 48 órás

kezelés után a lipidperoxidáció és a glutation szintek változásai a védőrendszerek hatásos aktivációjára utaltak. Emellett mindkét, a GSH-homeosztázisban szerepet játszó enzimesalád, a GPx-ok és a GR, esetében is aktivációt mutattunk ki.

Munkánk folytatásaként jelenleg is több olyan stresszgén azonosítását, és expressziójának vizsgálatát végezzük, melyek segítségével még részletesebb képet nyerhetünk a halak *in vivo* válaszreakcióiról.

KÖZLEMÉNYEK

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

Agnes Ferencz and Edit Hermes. *Identification and characterization of two mtf-1 genes in common carp.*

Comp. Biochem. and Physiol. Part C. 2008. 128(3), 457-465.

IF₂₀₀₉: 2,582

Agnes Ferencz and Edit Hermes. *Identification of a splice variant of the metal responsive transcription factor mtf-1.*

Comp. Biochem. and Physiol. Part C. 2009. 150, 113-117.

IF₂₀₀₉: 2,582

Edit Hermes and **Agnes Ferencz**. *Identification of two phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (GPx4) genes in carp.*

Comp. Biochem. and Physiol. Part C. 2009. 150, 101-106.

IF₂₀₀₉: 2,582

A dolgozat témájához közvetlenül nem kapcsolódó közlemények:

K. Said Ali, **Agnes Ferencz**, Aranka K. Deér, J. Nemcsók and Edit Hermes. *Expression of two metallothionein genes in different brain regions of common carp.*

Acta Biol. Hung. 2009. 60(2), 149-158.

IF₂₀₀₉: 0,551

Zsuzsanna Hracsko, Edit Hermes, **Agnes Ferencz**, Hajnalka Orvos, Z. Novak, A. Pal, Ilona S. Varga. *Endothelial nitric oxide synthase is up-regulated in the umbilical cord in pregnancies complicated with intrauterine growth retardation.*

In Vivo. 2009. 23(5), 727-732.

IF₂₀₀₉:1,171

K. Said Ali, **Agnes Ferencz**, J. Nemcsók, Edit Hermes. *Expressions of heat shock and metallothionein genes in the heart of common carp (Cyprinus carpio): effects of temperature shock and heavy metal exposure.*

Acta Biol. Hung. 2010. 61(1), 10-23.

IF₂₀₀₉: 0,551

Folyóiratban megjelent, idézhető absztraktok:

K. S. Ali, **Agnes Ferencz**, Magdolna Abraham, Edit Hermes. *Induction of heat shock protein by heavy metal exposure and temperature stress in fish.*

30th FEBS Congress, Budapest, Hungary, G1-018P.

FEBS J. 2005. 272(1), 352-353.

IF₂₀₀₉: 3,042

Edit Hermes, **Agnes Ferencz**, Aranka K. Deer, K. S. Ali. *Isoform-specific stress response of two metallothionein genes in the heart of common carp during exposure to metal ions.*

32nd FEBS Congress, Vienna, Austria, C4-94.

FEBS J. 2007. 274(1), 362.

IF₂₀₀₉: 3,042

Edit Hermes, Sz. Abraham, **Agnes Ferencz**, Veronika Kovacs, M. Boros, G. Lazar Jr. *Expression of metallothionein and heme oxygenase in gadolinium chloride-pretreated endotoxemic rats.*

32nd FEBS Congress, Vienna, Austria, C4-95.

FEBS J. 2007. 274(1), 362.

IF₂₀₀₉: 3,042

S. Abraham, **Agnes Ferencz**, Andrea Szabo, G. Lazar, M. Boros, Edit Hermes, G. Lazar Jr. *Hepatic expression and regulation of metallothionein and heme oxygenase genes in endotoxemic rats with obstructive jaundice – the role of Kupffer cell.*

42nd Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR), Rotterdam, NL.

European Surgical Res. 2007. 39(1), 38 – 39.

IF₂₀₀₉: 1,5

Agnes Ferencz, Edit Hermes. *Isolation and tissue specific expression of the mtf-1 gene of common carp (Cyprinus carpio).*

33rd FEBS Congress and 11th IUBMB Conference, Athen, Greece, PP2C-8.

FEBS J. 2008. 275(1), 146.

IF₂₀₀₉: 3,042

S. Abraham, Edit Hermes, **Agnes Ferencz**, Andrea Szabo, Gy. Lázár, M. Boros, Gy. Lazar jr. *Antioxidant defense system in endotoxemic rats with obstructive jaundice.*

6th Congress of the International Federation of Shock Societies & 31st Annual Conference on Shock 7th International Conference on Complexity in Acute Illness, Cologne, Germany, P248.

Shock 2008, 29(1), 76.

IF₂₀₀₉: 2,871

Agnes Ferencz, Edit Hermes. *Alternative splicing of Metal-responsive Transcription Factor (MTF-1).*

34th FEBS Congress and Young Scientist Forum, Prague, Czech Republic, YSF24.

FEBS J. 2009. 276(1), 364-365.

IF₂₀₀₉: 3,042

Edit Hermes, **Agnes Ferencz**. *Regulation of metal responsive transcription factor MTF-1 expression in common carp.*

A Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság V. Kongresszusa, Szeged, P-13.

Acta Biol. Szegediensis. 2009. 53(1), 47.

Sz. Ábrahám, Edit Hermes, **Ágnes Ferencz**, Andrea Szabó, Gy. Lázár, Gy. Lázár Jr.

A metallothionein és hemoxigenáz gének expressziója és szabályozása májban, epeúti elzáródást követő endotoxémiában – a Kupffer sejtek szerepe.

Magyar Sebészet. 2009. 62(3), 152.

NYILATKOZAT

Alulírott, Dr. Hermeszt Edit az alábbiakban felsorolt közlemények felelős szerzője kijelentem, hogy Ferencz Ágnes a publikációk eredményeihez meghatározó fontossággal hozzájárult, ezért indokolt, hogy az ezekben közölt eredményeket a Ph.D. értekezésében felhasználja. A közlemények eredményeit eddig más nem használta fel tudományos fokozat megszerzéséhez, és a jövőben sem fogja felhasználni.

Agnes Ferencz, Edit Hermeszt. *Identification and characterization of two mtf-1 genes in common carp.*

Comp. Biochem. and Physiol. Part C, 2008. 128(3), 457-465.

Agnes Ferencz, Edit Hermeszt. *Identification of a splice variant of the metal responsive transcription factor mtf-1.*

Comp. Biochem. and Physiol. Part C, 2009. 150, 113-117.

Edit Hermeszt, **Agnes Ferencz**. *Identification of two phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (GPx4) genes in carp.*

Comp. Biochem. and Physiol. Part C, 2009. 150, 101-106.

Szeged, 2010. július 31.

.....
Dr. Hermeszt Edit