

A ciklin C promóter működésének jellegzetességei emlősökben

Ph. D. értekezés tézisei

Dr. Blazsó Péter Gábor

Témavezető:

Dr. Katona Róbert

tudományos főmunkatárs

MTA SZBK Genetikai Intézet

Biológia Doktori Iskola

SZTE TTIK

2011.

Szeged

Bevezetés

A ciklin C (CCNC) az állatvilágban egy rendkívüli mértékű szerkezeti konzerváltságot mutató ciklin, amelyet nagyfokú pleiotrópia jellemez. A sejtciklus, a génátírás és a sejt-sejt kapcsolat szabályozásában vesz részt. Ciklin-függő szerin-treonin kinázokhoz kötődve, azokat aktiválva heterodimer enzimkomplexeket képez. Sejtbiológiai működését az érintett biokémiai útvonalakban való részvételén, illetve fehérjepartnerein keresztül lehet leginkább jellemezni. A sejtciklus szabályozásban eddig két ismert molekuláris mechanizmussal vesz részt. A ciklin C kötődik a CDK2 enzimhez, amellyel együttesen az LSF (late *Simian vacuolating virus 40* factor) transzkripciófaktor 309. szerinjének foszforilációjával meggátolja ezt a fehérjét abban, hogy a G1 fázisban indukáljon jellemzően S-fázis géneket. A CCNC/CDK3 enzimkomplex a pRb (Retinoblastoma) 807/811-es szerinjének foszforilálásán keresztül az E2F (adenovirus E2 promoter factor) pRb-ről történő leválasztásával, azaz aktiválásával indirekt módon hozzájárul a sejtek S fázisba léptetéséhez. Ennek eredményeképp úgy változik meg a sejt génexpressziós profilja, hogy a sejtciklus továbbhaladhasson a G0/G1/S átmenetben. A ciklin C a génátírás egyes lépéseit is serkentheti, illetve gátolhatja. Ezeket a hatásait leginkább a CDK8 kináz partnerével együtt többnyire egy RNS átírást szabályozó ún. Mediator komplexnek a CDK alegységében fejt ki. Ismert, hogy a CCNC/CDK8 enzim foszforilálja az RNS polimeráz II CTD (karboxi terminális domén) régiójában a Ser-2 és Ser-5 aminosavakat, a TFIIH (általános transzkripciófaktor IIH) ciklin H alegységének 5-ös és 304-es szerinjait valamint a Notch ICD komponensét is képes hiperfoszforilálni. Ezekon kívül a ciklin C kináz partnertől független módon, a c-Myc fehérjével együttműködve elősegíti a sejt-sejt kapcsolatok kialakítását, amelynek hátterében a VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) és a VLA-4 (very late antigen 4) integrinek egymástól független aktivációja áll. A génátírás, a sejtciklus valamint a sejtadhézió szabályozása alapvető részeit képezik az egyedfejlődési programoknak. Egyre több direkt és indirekt bizonyíték lát napvilágot, amelyek

mind jobban hangsúlyozzák a CCNC jelentőségét az eukarióta szervezetek egyedfejlődésében is. A sejtes nyálkaperész (*Dictyostelium discoideum*) korai fejlődési, sejtors meghatározási folyamatainak időzítésében vesz részt. *Drosophila melanogasterben* a korai bábállapotból történő továbbhaladásnál létfontosságú a CCNC jelenléte, illetve házi egérben (*Mus musculus*) is az embrionális fejlődés kezdeti szakaszában, feltehetően sejtorsok meghatározásában játszik közre.

A ciklin C szöveti/szervi szinten betöltött szerepéről még keveset tudunk. Ahhoz, hogy részleteiben is feltárhassuk a ciklin C fehérjének ezen funkcióit, szükség van arra, hogy az idő- és térbeli kifejeződését követni tudjuk. Ezen túlmenően azon tényezők azonosítása is szükséges, amelyek a CCNC gén expressziójára hatást gyakorolnak. Emberi sejt kultúrákon, *in vitro* kísérletekben bemutatták, hogy a D₃ vitamin, transz retinsav, illetve a cAMP (ciklikus adenzin monofoszfát) a megfelelő sejt magi elemeiken keresztül a CCNC promóteréhez kötődve befolyásolják a gén átírását. Azt is tudjuk, hogy ezek az elemek jobbra a ciklin C promóter első 3 kilobázisnyi szakaszán keresztül hatnak, de azt nem, hogy ez a DNS fragment elegendő-e emlősökben a ciklin C kifejeződésének teljes, élettani szabályozásához. Nem ismert az sem, hogy milyen más elemek játszhatnak még közre.

Célkitűzések

1. Azonosíthatók-e olyan újabb részei a CCNC promóternek, amelyek befolyásolják a gén átírását emlős sejtekben?
2. Az egér CCNC translációs startpontja mellett 5' irányban levő 3,6 kilobázis hosszúságú DNS szakasz, amely 3,4 kb promóterdarabból és 173 bázispárnnyi 5'UTR-ből (untranslated region) áll, elegendő-e ahhoz, hogy a ciklin C-re jellemző térbeli expressziós mintázatot kialakítsa?
3. Felhasználható-e ez a DNS szakasz egy riporter rendszerben a ciklin C expresszió térbeli és időbeli követésére?
4. Felnőtt egerekben milyen a ciklin C1 és C2 térbeli transzkripciós mintázata és ez összevethető-e az emberivel valamint a jelzőgén által kialakított mintázattal?

Ahhoz, hogy ezen kérdésekre válaszokat kapjunk, az egér CCNC translációs startpontjával 5' irányban szomszédos, különböző hosszúságú DNS szakaszokat építettünk össze a hrGFP jelzőgénnel. Ezután ezen jelzőgén konstrukciók kifejeződését vizsgáltuk meg *in vitro* emlős sejtekben, illetve *in vivo* transzgenikus egérmodellben.

Alkalmazott módszerek

1. Jelzőgén konstrukciók készítése (plazmid DNS tisztítás, restriktív endonukleáz kezelés, agaróz gélelektroforézis, DNS fragment tisztítás, ligálás, baktérium transzformáció és növesztés szelektív táptalajon, DNS szekvencia tervezés és illesztés szoftverrel).
2. Emlős sejtkultúrák fenntartása és transzfekciója *in vitro*.
3. Transzgenikus egérmodell előállítása (hím egerek vazektomizálása és áalterhes nőstények előállítása, élő zigóták kinyerése vemhes nőstény egerekből és *in vitro* injektálása mikromanipulátorral, embrió transzfer áalterhes nőstény egerek petevezetőjébe).
4. Genomikus DNS tisztítás egér farokból.
5. Polimeráz láncreakció, primer tervezés és optimalizálás.
6. Southern hibridizáció (alkalikus transzfer DNS kötő membránra, radioaktív izotóppal jelölt próba előállítása, DNS-DNS hibridizáció, radioaktív jel rögzítés és előhívás).
7. Fluoreszcens *in situ* hibridizáció (metafazisos kromoszómapreparátumok készítése lépből kinyert egér fehérvérsejtekből, DNS-DNS hibridizáció, immunjelölés és jelerősítés).
8. RNS tisztítás egér szervekből és minőségellenőrzés.
9. Reverz transzkripcióhoz kapcsolt kvantitatív valósídejű PCR (RNS-ek DNáz kezelése, cDNS szintézis, qPCR).
10. Fehérje kinyerés egér szervekből és immunoblotting.
11. Fluoreszcens mikroszkópia, digitális fényképezés és képfeldolgozás.
12. Transzkripció faktor kötőhely keresés JASPAR szoftverrel.

Eredmények és következtetések

Munkánk során bebizonyítottuk, hogy az egér ciklin C promóterének első 3,4 és 10,4 kilobázis méretű szakaszai az 5'UTR 1-173 nukleotidjaival képesek emlős sejtekben génkifejeződést kiváltani. Ezzel szemben a promóter első 58 bázispáros darabjának az 5'UTR-rel együttes hiánya jelentősen, azaz az észlelési küszöb alá csökkenti az expressziót. Leginkább a proximális promóterszakasz (és nem az 5'UTR) hiánya állhat ennek a jelenségnek a hátterében, mert feltételezésünk szerint az RNS polimeráz II kötődhet le ebben a régióban, bár ezt kísérletesen nem vizsgáltuk. Eredeti törekvésünk arra irányult, hogy egérmodellben egy jelzőgénnel egyszerűen tudjuk követni a ciklin C tér- és időbeli génkifejeződését. Ennek érdekében az előzetesen sejt kultúrákban is kipróbált 3,4 kb hosszúságú ciklin C promóterdarabot és 5'UTR-t egyszerre tartalmazó jelzőgén konstrukcióval, azaz P3CG-vel négy különböző homozigóta transzgenikus egér vonalat állítottunk elő. A transzgenikus egerek vizsgálata során kiderült, hogy az eredetileg kitűzött célra nem alkalmasak. A jelzőgén kifejeződése nagyon gyenge és hírvivő RNS-ének átírása is következetesen leginkább csak a herére korlátozódik. Ezzel szemben a ciklin C1 és C2 izoformák RNS expressziója kimutatható az összes általunk vizsgált szervdarabban, csakúgy, mint a felnőtt emberek szervmintáiban is. Mindezekből az is következik, hogy a ciklin C térbeli expressziós szabályozásában az izolált promóterszakaszon kívül más komponensek is részt vesznek. Ezen túlmenően kimutattuk, hogy az egér CCNC promóterének első 3,4 kilobázisnyi szekvenciája tartalmaz CRE motívumokat. Az emberi ciklin C gén promóterének első 3 kilobázisnyi szakaszán is azonosítottak négy működő CRE-t. Mivel korábban a here specifikitást mutató promóterekről leírták azt is, hogy a többi promóterhez képest több CRE helyet tartalmaznak, így feltételezzük, hogy a herében a CCNC expressziójának fenntartásához is a CRE kötő transzkripciós faktorok jelentősen hozzájárulnak. Összességében, a bemutatott eredmények felvetik a ciklin C herére jellemző egyedi, eddig még ismeretlen szerepét.

Köszönetnyilvánítás

Legelőször szeretném külön köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, **Dr. Katona Róbertnek**, hogy vállalkozott arra, hogy az elmúlt évek során lelkiismeretes, precíz és segítőkész mentorom legyen a molekuláris biológiai kutatómunkában. Nagyon sokat tanultam tőle. Mindig számíthattam rá és a széleskörű tudására szakmai és nem szakmai kérdésekben egyaránt.

Köszönet illeti **Prof. Dr. Hadlaczky Gyulát** és **Prof. Dr. Udvardy Andort**, hogy munkámat támogatta, figyelemmel kísérte és jobbitó kritikáival, tanácsaival ellátott. Hálával tartozom még **Dr. Sinkó Ildikó** kolléganőmnek, akinek embriológiával és egerekkel kapcsolatos tudásából és tapasztalatából nagyot meríthettem valamint jelenlegi és volt munkatársaimnak, **Dr. Cserpán Imrének**, **Dr. Csonka Erikának**, **Dr. Fodor Katalinnak**, **Dr. Praznovszky Tündének**, **Dr. Tubak Vilmosnak**, **Ékes Csabának** és **Tóth Annának**, hogy mindig a segítségemre voltak, ha tanácsra, információra, reagensre vagy valamilyen eszközre volt szükségem és ha elakadtam valamiben. Hálás vagyok a csoport többi tagjának, **Horváth Csillának**, **Katonáné Székely-Szűcs Kingának**, **Kereső Juditnak**, **Mózesné Holló Gyöngyinek**, **Odrovics Baláznak** és **Rózsavölgyi Mártának** is, hogy segítettek a kísérletek kivitelezésénél valamint **Deák Mária**, **Kasza György**, **Kovács Tímea**, **Márfai József**, **Veres Erika** és az **állatházi dolgozók** munkájáért, amivel lehetővé tették, hogy a kutatómunkára összpontosíthassak.

Szeretném még itt megköszönni **Prof. Dr. Raskó Istvánnak** és **kutatócsoportjának**, hogy egyetemi hallgatóként és újonc doktoranduszként közelebről is megismerkedhettem a tudományos kutatással.

Hálás vagyok még **Dr. Cibula Ágnesnek**, **Dr. Hegedűs Zoltánnak**, **Dr. Lipinszki Zoltánnak**, **Dr. Márkus Róbertnek**, **Dr. Monostori Évának** és **kutatócsoportjának**, **Dr. Sepp Róbertnek**, **Dr. Vizler Csabának**, **Winter Zoltánnak** és **Zsámboki Jánosnak** a gyümölcsöző együttműködésekért

valamint az **MTA SZBK Genetikai Intézet valamennyi dolgozójának**, hogy a szakmai fejlődést támogató közegben dolgozhattam.

Utoljára, de nem utolsósorban köszönet illeti meg **szüleimet** és **testvéremet**, akikre életem minden területén támaszkodhattam és közvetett vagy közvetlen segítségükkel is nagyban segítették szakmai előrehaladásomat.

Hálás vagyok még a **nyílt forráskódú szoftveres közösség fejlesztőinek** és **tagjainak** is, hogy munkám során nem kellett pénzt költsék értékes operációs rendszerre (Ubuntu Linux), irodai (OpenOffice.org, LibreOffice) és grafikai programokra (GIMP), hanem azokat szabadon és jogtiszta letölthettem és felhasználhattam.

Közlemények

Folyóirat közlemények

1. **Blazsó P.** Cyclin C and the development of mice. (dissertation summary) ACTA BIOL SZEGED 51(2):140. (2007)
2. Katona RL, Sinko I, Hollo G, Szucs KS, Praznovszky T, Kereso J, Csonka E, Fodor K, Cserpan I, Szakal B, **Blazsó P.**, Udvardy A, Hadlaczky G. A combined artificial chromosome-stem cell therapy method in a model experiment aimed at the treatment of Krabbe's disease in the Twitcher mouse. CELL MOL LIFE SCI 65:(23) 3830-3838 (2008) **IF: 5.511**
3. **Blazsó P.**, Sinkó I, Praznovszky T, Hadlaczky G, Katona RL. 3.6-kb mouse cyclin C promoter fragment is predominantly active in the testis. ACTA BIOL HUNG 63:(1), közlésre elfogadva (2012). **IF: 0.551**

Könyvfejezet

Blazsó P., Sinko I, Katona R. Engineered chromosomes in transgenics. Mammalian Chromosome Engineering. Methods in Molecular Biology, Vol. 738. ISBN: 978-1-61779-098-0

Szabadalom

Uher Ferenc, Monostori Éva, Joó Gabriella, Krenács László, Szebeni Gábor, Martinek Tamás, Tubak Vilmos, **Blazsó Péter**, Katona Róbert, Kovács Sólyom Ferenc, Blaskó Andrea, Gercsó András Tiborné, Fajka-Boja Roberta. Készítmény, hatóanyagok bejuttatására szolid tumorokba. Ügyszám: P0900502. Bejelentve: 2009.08.11., Közzétéve: 2011.03.28.

Előadások

1. **Blazsó P**, Sepp R, Polgár N, Rác P, Pálincás A, Mogensen J, McKenna WJ, Csanády M, Forster T. A troponin I gén mutációanalízise hypertrophiás cardiomyopathiában. A Magyar Kardiológusok Társaságának 2003 évi Tudományos Ülése. Balatonfüred, 2003. május 14-17.
2. Polgár N, Sepp R, Rác P, **Blazsó P**, Dongó Á, Jebelovszki É, Pálincás A, Csanády M, Forster T. A béta myozin nehéz lánc gén mutációanalízise dilatatív cardiomyopathiában. A Magyar Kardiológusok Társaságának 2003 évi Tudományos Ülése. Balatonfüred, 2003. május 14-17.
3. Rác P, Sepp R, **Blazsó P**, Polgár N, Pálincás A, Mogensen J, McKenna WJ, Csanády M, Forster T. A troponin T gén mutációelemzése magyar hypertrophiás cardiomyopathiás betegekben. A Magyar Kardiológusok Társaságának 2003 évi Tudományos Ülése. Balatonfüred, 2003. május 14-17.
4. Sepp R, **Blazsó P**, Pálincás A, Jebelovszki É, Dongó Á, Anastasakis A, Raskó I, Csanády M, Forster T. Fenotípus specifikus mutációanalízis hypertrophiás cardiomyopathiában. A Magyar Kardiológusok Társaságának 2003 évi Tudományos Ülése. Balatonfüred, 2003. május 14-17.
5. Csanády M, Sepp R, **Blazsó P**, Rác P, Dongó Á, Jebelovszky É, Pálincás A, Forster T. Low prevalence of beta myosin heavy chain gene mutations in Hungarian patients with hypertrophic cardiomyopathy. 64th Congress of the Italian Cardiac Society, 2003. December 6-10, Rome, Italy.
6. **Blazsó P**, Sepp R, Jebelovszki É, Pálincás A, Forster T, Csanády M. A troponin T és I gének mutációanalízise hypertrophiás cardiomyopathiában. Tudomány Napjai, Szegedi Akadémiai Bizottság. Szeged, 2004. október 3.
7. **Blazsó P**, Sepp R, Pálincás A, Jebelovszki É, Anastasakis A, Raskó I, Csanády M, Forster T. Fenotípus specifikus mutációanalízis hypertrophiás cardiomyopathiában. Magyar Humán-genetikusok V. Munkakonferenciája. Szeged, 2004. november 11-13.
8. Sepp R, Csanády M, **Blazsó P**, Pálincás A, Jebelovszky É, Anastasakis A, Raskó I, Forster T. Mutációanalízis hypertrophiás cardiomyopathiában. VI. Magyar Genetikai Kongresszus és XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok. Eger, 2005. április 10-12.

-
9. Katona R, Sinkó I, Praznovszky T, Mózesné H Gy, Katonáné Sz Sz K, Kereső J, Csonka E, Fodor K, Cserpán I, Udvardy A, **Blaszó P**, Ékes Cs, Rózsavölgyi M, Novák I és Hadlaczkgy Gy. Lehet-e gyógyítani emlős mesterséges kromoszómával? VII. Magyar Genetikai Kongresszus és XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok. Balatonfüred, 2007. április 15-17.
 10. Robert Katona, Ildiko Sinko, Tunde Praznovszky, Erika Csonka, Katalin Fodor, Imre Cserpan, **Peter Blazso**, Andor Udvardy and Gyula Hadlaczkgy: A Combined Artificial Chromosome-Stem Cell Therapy Method for the Treatment of Krabbe's Disease in the Twitcher Mouse. 2nd International Conference on Drug Discovery and Therapy, February 1st - 4th, 2010, Dubai, UAE
 11. Szebeni Gábor János, Kriston-Pál Éva, **Blaszó Péter**, Katona Róbert, Joó Gabriella, Uher Ferenc, Krenács László, Blaskó Andrea, Fajka-Boja Roberta, Vizler Csaba, Monostori Éva: A mesenchymalis őssejtekben termelődő galektin-1 alapvetően szabályozza a mesenchymalis őssejtek tumor fejlődést serkentő hatását. A Magyar Immunológiai Társaság XXXIX. Vándorgyűlése, 2010. november 3., Szeged
 12. Fajka-Boja Roberta, Blaskó Andrea, Czibula Ágnes, Szebeni Gábor János, **Blaszó Péter**, Katona Róbert, Hegyi Beáta, Uher Ferenc, Monostori Éva: A galektin-1 termelés befolyásolja a mesenchymális őssejtek limfocita proliferáció-szabályozó hatását. A Magyar Immunológiai Társaság XXXIX. Vándorgyűlése, 2010. november 3., Szeged
 13. **Blaszó Péter**, Sinkó Ildikó, Praznovszky Tünde, Hadlaczkgy Gyula, Katona Róbert: Az egér ciklin C promóter 3.6 kb szakasza a jelzőgén here specifikus átírását idézi elő. IX. Magyar Genetikai Kongresszus és XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, 2011. március 25-27., Siófok

Poszterek

1. Szabó Enikő, Czibula Ágnes, **Blaszó Péter**, Katona Róbert, Uher Ferenc, Monostori Éva: Csontvelői eredetű mesenchymális őssejtek klónozása az MSC sejtpopuláció heterogenitásának vizsgálatához. A Magyar Immunológiai Társaság XXXIX. Vándorgyűlése, 2010. november 3., Szeged
2. **Péter Blaszó**, Ildikó Sinkó, Tünde Praznovszky, Imre Cserpán, Erika Csonka, Katalin Fodor, Anna Tóth, Andor Udvardy, Gyula Hadlaczkgy, Róbert Katona: Organ specific hrGFP expression driven by a 3.5kb cyclin C promoter fragment in the mouse. December 1-2, 2010., Straub Days, Biological Research Center, Hungarian Academy of Sciences, Szeged