

A pseudoxanthoma elasticum öröklődő betegség kialakulásáért felelős *ABCC6/MRP6* gén
transzkripció szabályozásának vizsgálata

F48684

Zárójelentés

2000-ben vált ismertté, hogy a pseudoxanthoma elasticum betegséget egy humán ABC transzporter, az *ABCC6/MRP6* génjében bekövetkező mutációk okozzák. A pseudoxanthoma elasticum (PXE, OMIM #264800 és #177850) ritka, recesszíven öröklődő betegség, amely különböző szerveket, szervrendszereket érint : a bőrt, a szemet, a kardiovaszkuláris és a gasztrointesztinális rendszert, de minden tünet egy közös okra, az elasztikus rostok meszesedésére, majd széttöredezésére vezethető vissza. Az első tünetek a bőrön jelentkeznek sárgás papulák formájában, majd későbbi életkorban a retina és az érhártya között található, elasztikus rostokkal teli Bruch membrán széttöredezik, és a törések mentén az erek benőnek a retina területére, amely a látás romlásához, majd elvesztéséhez vezet. A keringési rendszerben jelentkező tünetek az atheroszklerózis, az intermittens klaudikáció, valamint gasztrointesztinális vérzések és korai szívinfarktus. A PXE diagnózisa bőrbioptziás minta von Kossa festéssel történő vizsgálatán alapszik, amellyel láthatóvá válnak a kalcium lerakódások és a széttöredezett elasztikus rostok.

A 31 exonból álló, több 10 kb hosszú *ABCC6* gén a 16-os kromoszóma rövid karján található. Ugyancsak a 16p régióban található két pszeudogénje, melyek promótere és első 4, illetve 9 exonja csaknem 100% szekvenciaazonosságot mutat a betegség génjével. Ezidáig több, mint 300 mutációt azonosítottak az *ABCC6* génjében. Nagy részük misszensz mutáció, és olyan aminosavat érint, amelyek az ABCC alcsaládban konzerváltak. Mind a mai napig nem derült fény azonban arra, hogy mi a kapcsolat a hibás fehérjeműködés és az általa okozott PXE fenotípus között.

Vizsgálataim során a betegség patomechanizmusának jobb megértése érdekében a gén expressziójának szabályozását tanulmányoztam. Munkám célja az *ABCC6/MRP6* gén

promóterében található főbb regulációs elemek azonosítása, valamint a hozzájuk kötődő szabályozó fehérjék identifikálása volt. Kísérleteimben különös gondot fektettem arra, hogy a gén kifejeződésének tanulmányozása során feltérképezett mehanizmusok amennyire lehet az élettani viszonyokat tükrözzék. Ennek megfelelően kísérleteim döntő részében a máj eredetű HepG2 modellsejteket használtam, hiszen a májban a legjellemzőbb a gén expressziója. Kísérleteim jelentős részében ugyancsak ebből a megfontolásból az *ABCC6* gént endogén kromatin miliójában vizsgáltam. A következőkben az elért eredményeket, illetve a hozzájuk vezető utat, mely számos módszerfejlesztést is magában foglalt, mutatom be röviden.

Vizsgálataimat azzal kezdtem, hogy kiválasztottam azt a régiót, ami leginkább felelősnek tekinthető a gén erőteljes szövetspecifikus kifejeződéséért. Azt feltételeztem, hogy a legjelentősebb szabályozó régiók konzerválódtak az evolúció során. Így filogenetikai footprintinget végeztem, azaz szekvenanciaanalízis alapján határoztam meg, hogy az ember, csimpánz, kutya, egér és patkány *ABCC6* gén 5' nem kódoló 10 kb hosszúságú szakaszában, valamint az első intronban található-e konzervált szekvenciák. Három ilyen 200-500 bp hosszúságú szekvenciaelemet azonosítottam -9 kb, -0,5 és 1,3 kb távolságban a transzlációs iniciációs helytől.

A két 5' nem kódoló régióban található szekvenciáról azt is kimutattam, hogy CG dinukleotidokban gazdag, ami a CpG szigetek általános jellemzője. A CpG szigetek pedig a DNS metiláció targetjei, ami jelentős szerepet játszik a szövetspecifikus génextpresszió szabályozásában. Hipotézisem az volt, hogy ott lesznek a legjelentősebb szabályozó szekvenciák, ahol az *ABCC6* gén metilációja és kifejeződése között összefüggést lehet kimutatni.

Különböző sejtvonalakat vizsgáltam tehát, és ennek során találtam *ABCC6* expresszáló és nem-expresszáló sejteket. A továbbiakban ezek metilációs mintázatát analizáltam a két CpG szigetben négy kiválasztott sejtvonalban. A munkához a biszulfitos genomszekvenálás módszerét használtam, melyet be is állítottam a laborban. A módszerrel kapcsolatos fejlesztés eredményeit lásd alább. A munka során a nagyfokú szekvenanciaazonosság miatt, párhuzamosan meg kellett határozni mind az *ABCC6*, mind két pszeudogénjének metilációs mintázatát mindkét régióban, mind a négy sejtvonalban.

A módszer a DNS metiláció allélikus mintázatának statisztikus reprezentációját adja, így legalább 15-20 klón meghatározása szükséges egy régió metilációjának pontos vizsgálatához. Összességében tehát 400 klón analízisével jutottam arra a következtetésre, hogy az *ABCC6* gén proximális promóterének evolúciósan konzervált része szövetspecifikus metilációt mutat, mely korrelál a gén expressziós szintjével, így valószínűleg fontos szerepet játszik a transzkripció szabályozásában.

A továbbiakban luciferáz riportergén esszé segítségével vizsgáltuk a proximális promótert egy lengyel munkacsoporttal (Lukasz Pulaski, Centre for Medical Biology PAS) kollaborációban. Megállapítottuk, hogy az első ATG-hez képest -150 és -330 bp között található egy aktivátor szekvencia, míg -330 bp és -700 bp között található egy represszor szekvencia. Végezetül in vitro metilációt követő luciferáz esszé segítségével megállapítottuk, hogy az aktivátor szekvencia valóban gátolható DNS metilációval.

Úttörő eredményeinket, melyekben a gén transzkripció iniciációs helyét is meghatároztuk, valamint a pszeudogének kismértékű expresszióját is megállapítottuk, a **Journal of Biological Chemistryben publikáltuk (Aranyi et al, 2005)**. A továbbiakban más munkacsoportok is megerősítették eredményeinket. A kísérleti eredmények és szekvenenciaanalízis azonban nem, vagy csak kevés támpontot adtak arra nézve, hogy milyen faktorok szabályozhatják az adott régióban az expressziót.

A továbbiakban a gén transzkripció szabályozásának jobb megértése érdekében különböző kismolekulasúlyú vegyületek hatását teszteltük a gén expressziójára. Azt terveztük, hogy az expressziót indukáló vegyületeket keresünk, melyek alkalmazásával DNáz hiperszenzibilitási, majd annak alapján luciferáz riportergén esszék segítségével feltérképezzük a szabályozó szekvenciákat és azonosítjuk a szabályozó fehérjéket.

A kismolekulasúlyú vegyületek screenelésére kidolgoztunk egy algoritmust, mely a HepG2 sejteken történő kezelések hatását kvantitatív PCR segítségével detektálta. A módszer beállítása során történt fejlesztésekről lásd alább. A kismolekulasúlyú vegyületek kiválasztása során irodalmi adatokra támaszkodtunk és különböző nukleáris receptor agonistákat, általános hatású, stb vegyületeket választottunk. Mindezedig hozzávetőlegesen 35 vegyület tesztelése történt meg. Az eredeti, csak az *ABCC6*-ra fókuszáló tesztelés fokozatosan kibővült az *ABCC1-5* és *ABCG5* génekkel.

Vizsgálataink eredményeként mindezüdig főként erősen gátló hatású vegyületeket azonosítottunk (forbol észter; trichostatin A és Na butirát – hiszton deacetiláz inhibitorok; beta naphtoflavon, kobalt, tert butil hidrokinon – Nrf2 agonista/oxidatív stressz). A forbol észter hatását gátolja és talán önmagában is gyenge aktiváló hatása is van az UO126-nak, mely az ERK aktiváció gátlószere. Egyértelmű aktivátort nem találtunk.

A screeneléssel párhuzamosan beállítottuk a DNáz hiperszenzibilitási esszét (DHE), hogy kezelés nélkül, illetve kezelést követően megállapíthassuk melyek a betegségokozó gén promóterének DNase I hyperszenzitív szekvenciái (DHS). Azok a régiók a legérzékenyebbek az enzim aspecifikus hasítására, amelyek kromatinstruktúrája nyílt (rendezetlen) az aktivátor fehérjék kötődése miatt. Feltérképezésük a DNase emésztést követő restrikciós hasítás Southern blottal való analízisével történik. Esetünkben külön kihívás a pszeudogének és a betegségokozó gén közötti rendkívül nagyfokú azonosság. Annak érdekében, hogy a betegségokozó gén szabályozását a pszeudogénektől elkülönítve vizsgálhassuk, úgy terveztük meg a Southern blot-ot, hogy a restrikciós hasítások következtében megkülönböztethető legyen egymástól a három szekvencia. A Southern blot analíziséhez olyan szondát használtunk, amely a pszeudogéneket az eltérő restrikciós hasítás miatt könnyen elkülöníthetővé teszi a betegségokozó géntől és a kísérlet analízését nem zavarja. Ez az eredeti kísérleti felállítás azonban nehezen értékelhető eredményeket adott, így végül olyan megközelítést használtunk melynek során a rendszer nem tett különbséget az *ABCC6* szerű szekvenciák között. Kezeletlen HepG2 sejteken kimutattunk négy DHS-t, melyből egy -15 kb-ra található a transzkripciós iniciációs helytől, a szomszédos gén első intronjában, míg a második a proximális promóterben található a harmadik és negyedik pedig az *ABCC6* első intronjának középső harmadában, evolúciósan nem konzervált szekvenciakörnyezetben. Ugyanezek a DHS-ek HeLa sejtekben, melyek a gént nem fejezik ki, nem voltak jelen.

Ezen a ponton három különböző irányban folytattuk kísérleteinket:

Elkezdjük vizsgálni DHE segítségével a screenelés alapján kiválasztott vegyületeket. Ezek a vizsgálatok azonban egyelőre folyamatban vannak és végkövetkeztetések még nem vonhatóak le belőlük.

A kiválasztott vegyületek hatásmechanizmusának megértéséhez különösen szerencsés helyzetben vagyunk az előzőek ellenére is. Az *ABCC6* génről igencsak nagy

mennyiségben keletkezik ugyanis egy trunkált mRNS is (URG7), aminek átírása a gén második intronjában fejeződik be. Az 5' szabályozószekvenciák tehát közösek, de a 3' UTR régiók teljesen eltérőek a két szekvenciánál. Kvantitatív PCR detektálást állítottunk be az URG7 szekvenciára is és megállapítottuk, hogy a legtöbb esetben a kiválasztott vegyületek hatása megegyezik az ABCC6 és az URG7 esetén. Mindebből azt a következtetést vontuk ebből le, hogy a kiválasztott vegyületek minden bizonnyal az 5' nem kódoló régióban hatnak, azaz valószínűleg a transzkripciót gátolják.

Végezetül a harmadik kutatási irány újabb luciferáz reportergén esszék kivitelezése volt a lengyel munkacsoporttal kollaborációban. Kísérleteink során a kezeletlen HepG2 sejtek *ABCC6* intronikus DHS környezetének transzkripciós aktivitását kezdtük vizsgálni és előzetes eredményeink alapján megállapítottuk, hogy 500 és 950 bp között igen erőteljes aktivátor szekvenciák vannak, melyek a korábban azonosított aktivátor szekvencia hatását 5-10-szeresére növelik. Kísérleti eredményeinkből a kézirat készül.

Kísérleteim elvégzése során, amint azt a korábbiakban már említettem számos módszer került beállításra a laboratóriumban (biszulfitos genomszekvenálás, DHA és kvantitatív PCR). A módszerek beállításához kapcsolódóan ezek az irodalomban leírtakhoz képest kísérleti felállásunkhoz adaptálva történt, ami esetenként az alkalmazott módszer jelentős fejlesztését eredményezte. Az alábbiakban ezen a területen elért fontosabb eredményeimet foglalom össze.

Kifejlesztettünk egy primer-tervező és analizáló programot, mely különösen a DNS metiláció meghatározásához használatos biszulfitos genomszekvenáláshoz nyújt segítséget. A biszulfitos genomszekvenálás alapját egy kémiai reakció képezi, melynek során a genomban található nem metilált citozinok uracilokká alakulnak. Ismert szekvenciák metilációs állapota a konvertált genom PCR-es analízisével, majd szekvenálásával határozható meg, hiszen a metilált citozinok a kémiai kezelés során nem konvertálódnak. A módszer egyik nehézsége az, hogy a vizsgált szekvenciák a konverzió előtt igen gazdagok citozinban, így a kezelést követően erősen feldúsulnak uracilban, ami specifikus primerek tervezését rendkívül megnehezíti. Intézetünk bioinformatikai munkacsoportjában Tusnády Gáborral együttműködve erre a problémára kerestünk megoldást. Kifejlesztettünk egy programot, mely primereket tervez a biszulfitos konverzió átesett szekvenciákra. Már önmagában ez is hiánypótlónak számított, hiszen

elkészültekor mindössze egyetlen hasonló program létezett. A program különlegessége azonban, aminek rendkívüli sikerét is köszönheti, hogy a megtervezett primereket *in silico* analizálja és nagy hatékonysággal prediktálja az összes potenciális target szekvenciákat, melyeket a (konvertált vagy natív) genomról a primerek amplifikálhatnak. Ez jelentősen csökkenti „rossz” primerekkel való kísérletezés valószínűségét. A szoftvert **webszerverként** működtetjük intézetünk honlapján. A szerveren az elmúlt két évben mintegy 170 000 futtatás történt. A fejlesztést két lépcsőben végeztük el, ennek megfelelően két közlemény (**Tusnády,....., Arányi (2005) Nucleic Acids Research, Aranyi et al (2006) BMC Bioinformatics**) és egy könyvfejezet (**Aranyi and Tusnady (2007) Methods Mol Biol**) született a munka eredményeiből.

Munkánk során beállítottuk a kvantitatív PCR technikát is, ami egy másik általános érvénnyel alkalmazható új eljárás kidolgozásához vezetett. Az elmúlt évek során a kvantitatív PCR technika széles körben elterjedt, mind a kutatás és fejlesztés, mind a diagnosztika területén. A technika bár egyszerű, a megfelelő kontrollok használata az eredmények értékelhetőségéhez elengedhetetlen. Ehhez általában ‘belső standardként’ az ún. ‘housekeeping’ gének mRNS-eit szokás felhasználni, leggyakrabban a Gapdh-t. A helyes kontroll kiválasztása a módszer gyakorlati alkalmazásának sokszor legnehezebb része, mert a kvantifikálás a klasszikus standardokkal számos esetben megbízhatatlannak bizonyul. Ezért egy teljesen új elven alapuló normalizálási eljárást dolgoztunk ki kísérletsorozatunkban. Ennek során a standardet sejt formájában adjuk hozzá a vizsgálni kívánt mintához, közvetlenül a nukleinsav extrakcióját megelőzően, ami ezután kevert mintából történik meg. A mintánként azonos külső kontroll sejtek biztosítják a referenciatemplátot, melynek koncentrációja ennek megfelelően allandó. Az új módszert (external cell control PCR – eccPCR) különböző sejtes rendszerekben validáltuk és kimutattuk, hogy alkalmazása megbízhatóbb eredményt nyújt, mint a leggyakrabban használt normalizálási forma, melynek során a Gapdh mRNS mennyiségét használják kontrollként. Kollaborációs munkánkból (Kovács Tünde és Tordai Attila munkacsoportja OGYK) **szabadalmaztatási** eljárás indult és eredményeinket cikk formájában is publikáltuk (**Bors,....., Aranyi (2008) Anal Biochem**).

Kísérleteink újabb iránya az *ABCC6* gén pszeudogénjeinek kialakulását vizsgálja. Ez a munka jobbra ugyancsak *in silico* vizsgálatokat jelent. Kimutattuk, hogy az *ABCC6* egy

dinamikusan változó fragilis genomi régióban található, amit többek között az is bizonyít, hogy több főemlősben egymástól függetlenül alakultak ki a pszeudogének. Megfigyeltük, hogy az *ABCC6* szerű szekvenciák szegmentális duplikációkban találhatóak, melyek valószínűleg non-allelikus homológ rekombinációval jöttek létre. A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy milyen következményekkel járhat az *ABCC6* szerű szekvenciákat tartalmazó szegmentális duplikációk kialakulása, illetve jelenléte. In vitro kísérletekkel alátámasztott in silico eredményeink egyértelműen bizonyítják, hogy új, hibrid humánspecifikus transzkriptumok jönnek/jöhetnek létre a pszeudogének részvételével. Ezek élettani jelentőségét egyelőre nem ismerjük, de bizonyosan hozzájárul(hat)nak az emberi faj és egyéb főemlősök a régióra jellemző gyors evolúciójához. Megfigyeltük továbbá, hogy a két trunkált pszeudogén, melyek funkcionális ABC fehérjeként nem működhetnek elkezdtek szekvenciavaránsokat (mutációkat) akkumulálni az *ABCC6* kódoló régiójának megfelelő szekvenciákban. A nagyon hasonló, de mégis különböző pszeudogén és betegségkókozó szekvenciák jelenléte így génkonverzió kialakulásához vezethet, ami néhány esetben az irodalomban dokumentált betegségkókozó mutációt eredményez. Végezetül azt is megfigyeltük, hogy ez a rendkívül fragilis genomi régió mind emberben, mind más főemlősökben nagyméretű genomi átrendeződéshez vezet(het), ami mind a közelmúltban egyre jobban felismert interindividuális (pl copy number variation CNV), mind a fajok közötti variabilitáshoz jelentősen hozzájárul. Munkánk eredményét összefoglaló kéziratunkat benyújtottuk közlésre.

Végezetül a fentebb felsorolt eredményeken kívül a jelentésben meg szeretném említeni, hogy egy a biszulfitos genomszekvenálás további módszertani fejlesztését célul kitűző háromoldalú magyar-magyar-francia együttműködés (Szabó Pál, KKKI és Andras Paldi, Genethon) kialakítását kezdeményeztem. Ennek keretei között született ötlet eredményeként egy a DNS metiláció emlős egyedfejlődés során történő változásáról szóló review cikket is írtunk, amit 2006-ban publikáltunk (**Aranyi and Paldi (2006) FEBS Letters**).

Az elmúlt évek során a fent leírt munkába az együttműködő partnereken kívül bekapcsolódott Hugues de Boussac és Symmons Orsolya PhD hallgatók, valamint Köblös Gabriella egyetemista is.