

Zárójelentés

Munkám fő célkitűzése különböző ABC transzportergének kifejeződésének szabályozásának vizsgálata volt sejtvonalakban. Különböző vegyületek ABC transzporterek expressziójára gyakorolt hatását vizsgáltuk HepG2 sejtekben qRT-PCR technika segítségével. Kimutattuk, hogy az oxidatív stressz indukálja az ABCC1, 2, 3 és az ABCG2 gének kifejeződését. Az ABCB6 expressziójának szignifikáns növekedését is megfigyeltük néhány (pl kobalt, tert-butyl-hydroquinon, oltipraz (oxidatív stressz-válasz induktor)), de nem minden oxidatív stresszt eredményező kezelés hatására. Ezzel szemben minden oxidatív stresszt eredményező kezelés gátolta az ABCC6 expresszióját. Az ABCA1, ABCB1, ABCB4, ABCC4 és ABCC5 gének nem voltak érzékenyek a kezelésre.

Hasonlóképpen vizsgáltuk az ERK1/2 kaszkád valamint a protein kináz C-k indukciójának hatását ugyanezen transzporterekre. Kimutattuk, hogy a kezelések hatására az ABCC6 és az ABCB6 expressziója szignifikánsan csökkent, míg az ABCG2 expressziója szignifikánsan növekedett. A többi gén esetén a kezeléseink hatása komplex szabályozási mechanizmus meglétét sugallja. Hasonló kezeléseket végeztünk Hep3B ugyancsak human hepatocytá eredetű sejteken is. Ezekben a sejtekben kisebb, de hasonló hatásokat figyeltünk meg.

Azt is megfigyeltük továbbá, hogy az aryl hydrocarbon receptor (AhR) aktiválása serkenti az ABCG2 expreszióját, míg a többi általunk vizsgált transzporter kifejeződésére nincs hatással a HepG2 sejtekben. Végezetül különböző fémekkel történő kezelések sem voltak hatással a transzportergének kifejeződésére, kivéve a már említett kobaltot, valamint a kadmiumot, mely utóbbi indukálta az ABCC1 gént.

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy az ABCG2 három (A, B és C) promótere közül melyikre milyen hatással vannak a kezeléseink a vizsgált sejtvonalakban. Azt tapasztaltuk, hogy a C promóterről nem szintetizálódik transzkriptum. Azt is megfigyeltük, hogy a B promóterről íródik át transzkriptum a legnagyobb mennyiségben és ennek megfelelően annak szabályozása határozza meg, hogy mennyi ABCG2 transzkriptum keletkezik. Ennek ellenére mindig mindkét promóterről (A és B) történő átíródás hasonlóan, bár nem feltétlenül ugyanolyan mértékben szabályozott. Így megállapítottuk, hogy az ERK1/2 kaszkád hatása elsősorban az A, míg az AhR hatása elsősorban a B promóteren jelentkezik. Kísérleteinket Orbán Tamással (SE, Membránbiológiai Kutatócsoport) együttműködésben végeztük. (de Boussac, H., kézirat előkészületben)

A különböző kezelések mRNS expresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata után az ABCB6-ra, illetve ABCG2-re gyakorolt hatásait fehérje szinten is megvizsgáltuk. ABCB6 esetén Western blot technikával hasonló eredményeket kaptunk, mint mRNS esetén. ABCG2 esetén FACS segítségével vettük igénybe, az eredmények itt is megerősítették a qRT-PCR kísérletek eredményeit. Kísérleteinket Szakács Gergely (MTA Enzimológiai Intézet) és Sarkadi Balázs (SE, Membránbiológiai Kutatócsoport) munkacsoportjával együttműködésben végezzük.

További vizsgálataink az ABCC6 kifejeződésének szabályozásának jobb megértésére irányultak. Az ERK kaszkád aktiválódásának hatására bekövetkező ABCC6 expresszió-csökkenést vizsgálva bebizonyítottuk, hogy a hatás a transzkripció gátlásán alapul; azonosítottuk a hatásért felelős kötőhelyet (-165/-153 a transzlációs iniciációs helyhez képest); megállapítottuk, hogy ez egy funkcionális HNF4 (hepatocita nukleáris faktor) kötőhely; igazoltuk, hogy az ERK1/2 aktiválása gátolja a HNF4 okozta ABCC6 expressziófokozódást; beláttuk továbbá, hogy a HNF4 jelenléte szükséges a további transzkripciós aktivátor faktorok hatásához és ez meghatározza az ABCC6 szövetspecifikus expresszióját, ami egybeesik a HNF4 expressziós mintázatával. Kísérleteinket Lukasz Pulaski (Lodz, Lengyelország) munkacsoportjával együttműködésben végeztük. Fenti eredményeinket 2010-ben a J Biol Chem folyóiratban publikáltuk.

További kísérleteink során igazoltuk, hogy az ABCC6 gén első intronjában található egy 60bp hosszúságú szakasz, mely egy erős aktivátor (6-8x expressziófokozódást eredményez a jelenléte). Bebizonyítottuk azt is, hogy ez a szekvencia nem egy enhancer. Ez az aktivátor megfigyeléseink alapján sejtvonal-specifikus, hiszen hasonló hatást figyeltünk meg HepG2 és Caco-2 sejtekben (mindkettőben kifejeződik az ABCC6), míg aktivátor hatást nem tapasztaltunk HeLa és HEK sejtekben, melyek nem fejezik ki az endogen ABCC6 fehérjét sem. A 60bp hosszú intronikus aktivátor régió eredményeink alapján legalább két kötőhelyet tartalmaz aktivátor faktorok számára. Luciferáz esszé (vad típusú, illetve mutáns konstrukciók alkalmazásával), valamint kromatin-immunoprecipitáció segítségével bebizonyítottuk, hogy az endogen ABCC6 gén egyik intronikus kötőhelye a C/EBP enhancer családba tartozó beta fehérjéket köti. Kimutattuk továbbá, hogy a fehérjék transzkripciós aktiváló hatásának kifejtéséhez szükség van a proximális promotérral való együttműködésére. Azt is bebizonyítottuk, hogy ez az interakció nem (közvetlenül) az ugyancsak általunk kiemelkedő jelentőségűnek leírt HNF4 transzkripciós faktorról jön létre. Eredményeink azt mutatják, hogy az ABCC6 gén promotere a C/EBP alfa fehérjét is köti. Végezetül azt is kimutattuk, hogy ez az általunk felderített szabályozó mechanizmus főemlős specifikus. Kísérleteinket Lukasz Pulaski (Lodz, Lengyelország) munkacsoportjával együttműködésben végeztük. Jelenleg próbáljuk azonosítani azokat a fehérjéket, melyek a promotér azon szakaszához kötődnek, amelynek jelentőségét a C/EBP-vel való együttműködés szempontjából különösen fontosnak találtunk. Fenti eredményeinket közlésre nyújtottuk be a tavalyi év során. Eredményeink, melyek segítségével az ABCC6 gén transzkripciós szabályozását derítettük fel azt sugallják, hogy a gén egyedi funkciójú lehet a többi ABC transzporter között, hiszen másként és más faktorok által szabályozódik, mint a többi ABC transzporter. A munkánk során azonosított legfontosabb transzkripciós faktorok különlegesen fontos szerepet játszanak a sejtek és

így a hepatocyták metabolizmusának szabályozásában, ami felveti, hogy az ABCC6 is szerepet játszon ezekben a folyamatokban. Ezek az elképzelések új irányt jelentenek mind az ABCC6, mind a pseudoxanthoma elasticum nevű recesszív öröklődésű, de egyelőre nagyrészt ismeretlen patomechanizmusú betegség kutatásában.

Az ABCC6 gén mutációi a pseudoxanthoma elasticum nevű recesszív öröklődésű betegség kialakulásához vezetnek. További vizsgálataink során megerősítettük, hogy a mutáció hordozói, bár nem alakul ki bennük a betegség, csaknem 10x nagyobb kockázatnak vannak kitéve a coronaria arteriabetegség kialakulása tekintetében, mint a kontroll populáció. Fenti eredményeinket a Genet Test Mol Biomarker c újságban jelentettük meg.

Több olyan munkában is részt vettünk, ami az ABCC6, illetve más ABC transzporterek élettani szerepével foglalkozik. Így elvégeztük egy ABC transzportergének szekvenciariánsainak klinikai jelentőségét prediktáló szoftver tesztelését irodalmi adatokra építve (Arányi, T 2011 Protein Sciences); beláttuk, részben az általunk megfigyelt ABCC6 gén expresszió gátlásra alapozva, hogy a K3 vitamint és metabolitjait nem transzportálja a fehérje (Fülöp, K BBRC 2011); részt vettünk PXE-t okozó ABCC6 mutációk hordozó fehérjék májspecifikus kifejezésének kialakításában és a különböző mutáns fehérjék lokalizációjának analízisében, illetve annak kimutatásában, hogy kémiai chaperonok segítségével néhány fehérje visszanyerheti helyes plazmamembrán lokalizációját (Le Saux, O PLOS One 2011).

További kísérleteink során az ABCC6 gén locusz epigenetikai profiljának leírását is tervbe vettük. Ennek érdekében beállítottunk egy új módszert a DNS metiláció vizsgálatára. A HPLC/MS-MS módszert optimalizáltuk egyedi szekvenciák analízisére, valamint később teljes genom metilációjának vizsgálatára. Kísérleteinket András Páldi (Párizs, Franciaország) és Szabó Pál (MTA KKI) munkacsoportjaival együtt végeztük. Kísérleteink során megállapítottuk különböző sejtvonalak össz DNS metilációját, illetve annak változását a DNS metilációjának gátlásának hatására. Kísérleti eredményeink segítségével igazoltuk, hogy a DNS metiláció egy dinamikus egyensúly eredménye, amely a sejtek osztódásától független folyamatos demetiláció és remetiláció eredménye. Fenti eredményeinket az Epigenetics 2012 februári számában publikálja majd.

További kísérleteink során beállítottuk a DNS hydroxymetilációjának analízisét is, melyet más munkacsoportok egyelőre nem tudnak hozzánk hasonló pontossággal kvantifikálni.

Végezetül együttműködésben egy belga kutatócsoporttal (Jo Wandesompele, Gent) kialakítottunk egy web servert, ami a DNS metiláció vizsgálatához alkalmazott biszulfitos genomszekvenálás módszer alkalmazásában nyújt segítséget (Lefever, S 2010 Epigenetics).

Az elmúlt három év során munkacsoportunk a következő módszereket állította be/alkalmazta:

Általános molekuláris biológiai metodikák

Emlős sejt kultúra

qRT-PCR

DNáz hiperszenzitivitási esszé

Luciferáz esszé

Chromatin Immunoprecipitáció

DNS metilációs esszé (ld fent)

Immunfluoreszcens mikroszkópia alkalmazása kromatinsztruktúra vizsgálatára

Konfokális mikroszkópia

Western blot

FISH