

**Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola**

**A szarvasmarha neonatális Fc receptor
transzkripciós szabályozása**

Ph.D. értekezés tézisei

készítette:

Doleschall Márton

2007

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....
Dr. Imre Kacs Kovics, Ph.D.
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar, Élettani és
Biokémiai Tanszék (2006. szeptemberéig)
Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar,
Biológiai Intézet, Immunológia Tanszék (2006. szeptemberétől)

Prof. Dr. Sármay Gabriella, Ph.D., D.Sc.
Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar,
Biológiai Intézet, Immunológia Tanszék

Prof. Dr. Frenyó V. László, Ph.D.
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar, Élettani és
Biokémiai Tanszék

.....
Doleschall Márton

A neonatális Fc receptor (FcRn) egy α -láncból és egy β_2 -mikroglobulin (β_2m) áll. A szarvasmarha tőgyben, vékonybélben, alsó légutakban és endotél sejtekben is megfigyelték az FcRn jelenlétét. Miközben az epitel sejtekben megtalálható FcRn az IgG transzportban vesz részt, addig az endotél sejtekben kifejeződő receptor az IgG katabolizmust szabályozza. Ezen lényeges immunológiai funkciók miatt a bovin FcRn gén regulációja kiemelt jelentőségű. Bár a génreguláció több szinten zajlik, az egyik legfontosabb ezek közül a transzkripció folyamatának szabályozása, mely folyamatban a gén mRNS-re íródik át, hogy a végén fehérje épülhessen fel a gén által kódolt információ alapján. A transzkripció reguláció a transzkripció faktorok és egy adott gén transzkripciót reguláló DNS szakaszán elhelyezkedő transzkripció faktor kötéshelyek szoros kölcsönhatásán keresztül valósul meg. A transzkripció faktorok, hogy feladatukat teljesíteni tudják, a transzkripciót befolyásoló és a saját kötéshelyük irányában szekvencia specifikus DNS kötő képességgel rendelkeznek. A fentiek alapján működő, FcRn transzkripciót reguláló DNS szakaszt izolálták egérben és emberben, de immunológiai szempontból releváns transzkripció szabályzó funkciókat mindeztidáig még nem sikerült meghatározni.

Az értekezés elsődleges célja a bovin FcRn (bFcRn) transzkripció regulációjának vizsgálata volt. A bovin β_2m (b β_2m) transzkripció szabályozását szintén vizsgáltuk, mivel az FcRn molekula két gén

termékéből épül fel, így a két gén transzkripciók regulációjának esetleges közös vonatkozásait fontosnak tartottuk elemezni. Vizsgálataink elvégzéséhez laboratóriumunkban három új metodikát, a luciferáz riportter gén rendszert, a gél retardációs és az irányított mutagenézis technikát vezettünk be. Az értekezéshez kapcsolódó kísérletes munka közben merült fel az igény, hogy az NF κ B bFcRn-re gyakorolt hatását szarvasmarha specifikus sejtmodellben is végezzünk el, ezért klónoztuk és funkcionálisan jellemeztük a bovin NF κ B p65 alegységét (bp65).

Az értekezésben foglalt eredmények alapvetően két metodikára épülnek, a luciferáz riporttergén és a gél retardációs módszerre. Az előbbi együtt alkalmazva az irányított mutagenézissel az egyetlen olyan technikát képviseli, amellyel felmérhető az adott transzkripciók faktor kötőhelyek egyedi hozzájárulása egy gén transzkripciójához, míg az utóbbi közös alapelven nyugvó technikák gyűjtőneve, amellyel *in vitro* tanulmányozható a transzkripciók faktor és a kötőhelye közötti kölcsönhatás.

A bFcRn α -lánc transzkripciók szabályozásának vizsgálatához izoláltuk és klónoztuk a transzkripciók reguláló DNS szakaszt, amely indukálhatónak bizonyult a természetes és adaptív immunitás kialakításában egyaránt kulcsfontosságú NF κ B transzkripciók faktor által mind humán, mind szarvasmarha sejtmodellben. A gén transzkripciók reguláló DNS szakaszában három κ B kötőhelyet sikerült azonosítani, amelyek irányított mutagenézise a bFcRn

transzkripciót reguláló DNS szakasz NF κ B indukálhatóságának teljes elvesztését vonta maga után. A κ B kötőhelyek gél retardációs vizsgálata kimutatta, hogy a kötőhelyek valóban képesek az NF κ B transzkripciós faktor megkötésére, és a kötődő NF κ B komplex tartalmazza a transzkripció-aktiváló hatásért felelős p65 alegységet. A fenti eredmények összhangban vannak a közelmúlt *in vivo* adataival, igazolva, hogy a bFcRn α -lánc transzkripciója aktiválódik a gyulladásban és a fertőzések elleni védekezésben jelentős transzkripciós faktor hatására.

A β 2m egy segédfehérje, amely az FcRn-hez illetve más MHC I típusú fehérjékhez asszociált, hogy biztosítsa a megfelelő struktúrát és működést. A β 2m széleskörűen kifejeződik, szabályozására jellemző, hogy konstitutív és immun-kapcsolt transzkripciós kontroll alatt állnak. A humán β 2m transzkripciót reguláló DNS szakaszának működése kísérletesen jól jellemzett, egy κ B kötőhely és egy ISRE kötőhely felelős az immun-kapcsolt transzkripciós szabályozásért. (Az ISRE kötőhelyhez az immunológiában releváns IRF transzkripciós faktor család tagjai kapcsolódnak.) Első lépésként a b β 2m transzkripciót reguláló DNS szakaszt izoláltuk és klónoztuk, hogy tanulmányozzuk az FcRn-hez kötődő transzkripciós szabályozását. Bár az ISRE kötőhely jól konzervált szarvasmarhában, a κ B kötőhelyben a humán kötőhelyhez képest két nukleotid terjedelmű deléciót találtunk. Luciferáz riportergén rendszerben elemezve a b β 2m transzkripciót reguláló DNS szakasz

valóban nem volt indukálható NF κ B-vel humán és szarvasmarha sejtmodellben, ami arra utalt, hogy ezt a gént a szarvasmarhában nem szabályozza az NF κ B. A deletált b β 2m κ B kötőhely ezzel szemben képes volt kötni a p65 tartalmú NF κ B komplexet a gél retardációs vizsgálatban, ami ellentmondásossá teszi ezeket az *in vitro* eredményeket. Az adatok, amelyek a b β 2m *in vivo* mRNS szintjének NF κ B indukálhatóságára vonatkoznak, szintén ellentmondásosak, így egyelőre nem lehet megbízható következtetést levonni a b β 2m transzkripciót reguláló DNS szakasz NF κ B indukálhatóságát illetően. A konzervált b β 2m ISRE kötőhely működését mind a luciferáz riporter gén, mind a gél retardációs technikával készült eredmények igazolták, így megállapítható volt, hogy a b β 2m ISRE kötőhely köti az IRF transzkripció faktor család tagjait, és nincs jelentős funkcionális különbség a humán és bovin kötőhely között.

A fenti vizsgálatokat szarvasmarha specifikus sejtmodellben is elvégeztük, ehhez izoláltuk és klónoztuk a bovin p65 alegység (bp65) fehérjét kódoló DNS szakaszát. A klónozott bp65-öt különböző emlős sejtekben expresszáltattuk, amelyekben a bp65 indukálta a NF κ B specifikus gén expressziót. Ezenkívül a bp65 képes volt kötődni a konszenzus κ B kötőhelyhez a gél retardációs vizsgálataink szerint, így a bp65 két fő transzkripció faktor tulajdonságát igazoltuk. A szarvasmarha, humán és egér aminosav szekvenciák összehasonlító elemzése kimutatta, hogy mind a DNS kötő domén (Rel homology domain, RHD), mind a transzaktivációs

domén (transactivation domain, TAD) magas szinten homológ. A filogenetikai analízis új betekintést engedett az NFκB transzkripció faktor család evolúciójába, illetve megoldotta az emlős p65 molekulák filogenetikai topológiáját. Bár az RHD konzervált a gerincesek között, ebben a rendszertani csoportban a TAD szekvenciák eltérnek egymástól, sőt a TAD szekvenciák gyorsabb evolúciós folyamaton mentek keresztül, mint az RHD szekvenciák.

Új tudományos eredmények

Luciferáz riporter gén technikával bizonyítottuk, hogy az NF κ B aktiválja a bovin FcRn α -lánc transzkripcióját emlős és szarvasmarha sejtmodellben. Irányított mutagenezissel és gél retardációs technikával három κ B kötőhelyet azonosítottunk a bFcRn α -lánc transzkripciót reguláló DNS szakaszon, amelyek a bFcRn α -lánc NF κ B indukálhatóságáért felelnek, és képesek megkötni a p65 tartalmú NF κ B komplexet.

Luciferáz riporter gén technikával bizonyítottuk, hogy hasonlóképpen humán ortológjához a bovin β 2m ISRE kötőhely közvetíti a transzkripciót reguláló DNS szakasz IRF1 indukálhatóságát emlős sejtmodellben. Ennek megfelelően, a b β 2m ISRE kötőhely IFN- γ specifikus komplexet kötött a gél retardációs vizsgálataink alapján.

Klónoztuk a bovin p65 NF κ B alegységet, és speciális transzkripció faktor tulajdonságait jellemeztük luciferáz riporter gén és gél retardációs technika segítségével.

A filogenetikai analízis új betekintést engedett az NF κ B transzkripció faktor család evolúciójába, illetve megoldotta az emlős p65 molekulák filogenetikai topológiáját. A genetikai analízis bebizonyította, hogy a TAD szekvenciák gyorsabb evolúciós folyamaton mentek keresztül, mint az RHD szekvenciák.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Kis Zs., Mayer B., Juhász V., Doleschall M., Frenyo L. V. and Kacs Kovics I. (2004) A szarvasmarha neonatalis Fc receptor (bFcRn) tőgybeli expressziója és IgG kötő képessége. *Magyar Állatorvosok Lapja* 10, 598-605

Doleschall M., Zhao Y., Mayer B., Hammarstrom L. and Kacs Kovics I. (2005) Isolation of the gene encoding the bovine neonatal Fc receptor. *Vet Immunol Immunopathol* 108, 145-150

Mayer B., Doleschall M., Bender B., Bartyik J., Bosze Z., Frenyo L. V. and Kacs Kovics I. (2005) Expression of the neonatal Fc receptor (FcRn) in the bovine mammary gland. *J Dairy Res* 72, 107-112

Kacs Kovics I., Mayer B., Kis Zs., Doleschall M., Bősze Zs. and Bender B. (2005) Az IgG transzportját és katabolizmusát szabályozó FcRn génregulációs elemzések szarvasmarhában. *Magyar Tudomány* 6, 714-23

Doleschall M., Mayer B., Cervenak J., Cervenak L. and Kacs Kovics I. (2007) Cloning, expression and characterization of the bovine p65 subunit of NFκB. *Dev Comp Immunol* 31, 945-961

Doleschall M. and Kacs Kovics I. (2007) Az NFκB és transzkripciós faktor tulajdonságainak vizsgálata. *Magyar Immunológia* (elfogadva)

Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni hálám témavezetőmnek, Dr. Kacs Kovics Imrének, hogy végig támogatott doktori munkám alatt. Integrált látásmódja, amellyel a kutatásra tekint és logikus gondolkodás módja nagy érték volt a számomra. Köszönetet mondok, Prof. Dr. Sármai Gabriellának (Eötvös Loránd Egyetem) és Prof. Dr. Frenyó V. Lászlónak, akik konzulensként nyomon követték munkámat. Köszönettel tartozom Cervenak Juditnak, Kis Zsuzsannának, Dr. Zeöld Anikónak (Kísérletes Orvostudományi Kutatóintézet) és végül, de nem utolsósorban Dr. Mayer Baláznak baráti segítségükért, amely végigkísérte az értekezés elkészülését. Köszönetet óhajtok mondani Dr. Yaofeng Zhao-nak and Prof. Dr. Lennart Hammarström-nek (Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden), hogy a luciferáz riporter gén vizsgálatokhoz vezető kezdő lépéseket megtették. Hálás vagyok asszisztenseinknek, Horn Ilonának, Méhes Ágnesnek és Bíró Zsoltnak, hogy munkájukkal támogatták laboratóriumi ténykedésem. Szeretnék köszönetet mondani a Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar, Élettani és Biokémiai Tanszék teljes gárdájának, sok kellemes órát töltöttem a társaságukban.

Köszönöm Hajdu Klárának, hogy volt türelme végignézni az értekezés kéziratát nyelvészeti szempontból. A legmélyebb hálával tartozom Doleschall Zoltánnak (Országos Onkológiai Intézet), aki

sohasem utasította vissza egyetlen egy kérésemet se, és nagyban hozzájárult a szarvasmarha FeRn magas szintű kvantitatív PCR-re alapuló elemzéséhez. Szeretnék köszönetet mondani Dr. Major Ágnesnek (Magyar Természettudományi Múzeum) a filogenetikai analízishez nyújtott segítségéért. Köszönettel tartozom Dr. Gereben Baláznak (Kísérletes Orvostudományi Kutatóintézet), aki segítségemre volt a doktori munka alatt és türelmével tüntetett ki az értekezés elkészítésének utolsó részében.

Külön szeretnék köszönetet mondani családomnak, hogy végig támogattak a doktori értekezés elkészítésében.