

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

XXXI. OTDK

Biológia szekció

**Az acetiláció szerepe az SF-1 és a szteroid konverzió
szabályozásában**

Kovács Dávid

Biológus MSc II. évfolyam



Témavezetők

Prof. Dr. Boros Imre

Borsos Barbara

2012

1. Tartalmi összefoglaló

A szteroid hormonok szintézisét szövetspecifikusan expresszáldó citokróm P450 enzimek végzik. A bioszintézisben résztvevő enzimek transzkripció szabályozásában meghatározó szerepe van az SF-1 (steroidogenic factor-1) sejtmagi receptornak, mely minden olyan szövetben jelen van, ahol szteroid hormonok termelődnek. Az SF-1 célgénjei közé tartozik az általunk vizsgált, CYP11A1 enzimet kódoló gén is, mely a szteroid hormonok bioszintézisének első lépését katalizálja. Az SF-1 működésének szabályozásában poszttranszlációs módosítások (acetiláció, foszforiláció és szumoiláció) és fehérje kölcsönható partnerek játszanak szerepet. Jelentős szerepe van az SF-1 acetilálásában a GCN5 hiszton acetil-transzferáz aktivitású fehérjének, mely az ATAC és SAGA hiszton acetil-transzferáz komplexek egyik katalitikus alegysége.

Korábbi kísérleteink azt mutatják, hogy ADA2a (ATAC HAT komplex egyik alegysége) mutáns *Drosophila*-kban a szteroid konverziót szabályozó *Halloween* gének expressziója lecsökkent. Ezek alapján feltételezhető, hogy az ATAC hiszton acetil-transzferáz komplex és az acetiláció valamilyen módon szerepet játszik a szteroid hormonok szintézisének szabályozásában.

Munkánk fő célja az volt, hogy vizsgáljuk, az acetiláció hogyan befolyásolja a szteroid konverzióban résztvevő gének működését emlős sejtvonalakban. Feltételezésünk szerint, acetiláció hatására az SF-1 fehérje aktiválódik, és a sejtmagba jutva indukálja a szteroid konverzióban résztvevő gének transzkripcióját. Vizsgáltuk, hogy az acetilációs szint megnövelése TSA – trichostatin A – hiszton deacetiláz inhibitor kezeléssel befolyásolja-e az SF-1 szubcelluláris lokalizációját és hatással van-e a transzaktivációs képességére. Célunk volt továbbá annak vizsgálata, hogy hogyan változik magának az *Sf-1* génnek és az általa szabályozott *Cyp11a1* génnek az expressziója különböző hiszton deacetiláz gátló kezelések hatására.

A kísérletek során GCN5 inhibitor (HATi IV), illetve hiszton deacetiláz gátló kezeléseket alkalmazva módosítottuk a sejtek acetilációs állapotát. Immuncitokémia segítségével megállapítottuk, hogy az SF-1-et nem termelő HeLa és U2Os sejtekben a túltermeltetett SF-1 fehérje TSA kezelés hatására főként a sejtmagban, míg HATi IV kezelés hatására a citoplazmában van jelen. Kísérleteink eredményei arra utalnak, hogy az acetiláció befolyásolja az SF-1 transzaktivációs képességét. Real-time PCR segítségével megállapítottuk, hogy az acetilációs szint növelése Y1 sejtekben befolyásolja a *Cyp11a1* és az *Sf-1* génekről átíródó mRNS mennyiségét.

2. Tartalomjegyzék

1. Tartalmi összefoglaló	2
2. Tartalomjegyzék.....	3
3. Rövidítések jegyzéke	4
4. Irodalmi áttekintés	5
4.1 Az eukarióta kromatinszerkezetet befolyásoló tényezők.....	5
4.2 A szteroid hormonok bioszintézise.....	6
4.3 A <i>cyp11a1</i> gén általános jellemzői és transzkripció szabályozása.....	7
4.4 A szteroid konverzió általános szabályozója: az SF-1.....	9
4.5 Az SF-1 poszttranszlációs módosításai és kölcsönható partnerei.....	11
5. Célkitűzések	14
6. Felhasznált anyagok és módszerek	15
6.1 Agaróz gélelektroforézis	15
6.2 DNS visszaizolálása agaróz gélből.....	15
6.3 Baktérium transzformáció	15
6.4 Plazmid DNS tisztítás baktérium sejtekből	15
6.5. Plazmid DNS tisztítás <i>Midiprep Qiagen Kittel</i>	16
6.6. Emlős sejtvonalak fenntartása és transzfektálása	16
6.7. Emlős sejtek kezelése HDAC inhibitorokkal és HATi IV-el	17
6.8. Luciferáz aktivitás mérés.....	17
6.9. Western blot analízis	17
6.10. Immuncitokémia.....	18
6.11 RNS izolálás Y1 sejtekből és reverz transzkripció	19
6.12. Real-time PCR.....	20
7. A kísérletek során használt konstrukciók elkészítése	21
7.1. A patkány SF-1 klónozása pCDNA3-FLAG vektorba	21
7.2. A patkány <i>Cyp11a1</i> promóterének klónozása pGL3 luciferáz riporter gént tartalmazó vektorba.....	22
8. Eredmények	25
8.1. A HATi IV megfelelő koncentrációjának beállítása Y1 sejteken.....	25
8.2. Az SF-1 szubcelluláris lokalizációjának vizsgálata TSA és HATi IV kezelés hatására	26
8.3 Az acetiláció szerepének vizsgálata a <i>Cyp11a1</i> gén promóterének működésében.....	28
8.4. HDAC inhibitor és HATi IV kezelések hatása az SF-1 transzaktiváció képességére	29
8.5. Az HDAC inhibitorok hatása a <i>Cyp11a1</i> és <i>Sf-1</i> gének expressziójára Y1 sejtekben.....	31
9. Összefoglalás	33
10. Felhasznált irodalom és hivatkozások	35
11. Köszönetnyilvánítás	42
12. Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez.	43

3. Rövidítések jegyzéke

AP-2 – Activating Protein 2

cAMP – ciklikus adenzin-monofoszfát

CBP – Creb Binding Protein

CPTH2 – cyclopentylidene-[4-(4'-chlorophenyl)thiazol-2-yl]hydrazone

CREB – cAMP Responsive Binding Protein

DAX-1 – Dosage-Sensitive Sex Reversal

DKD – DNS-Kötő Domén

FTZ – Fushi Tarazu Protein

FTZ-F1 – Fushi Tarazu Factor 1

GATA4 – GATA-Binding Factor 4

HAT – Hiszton Acetil-transzferáz

HATi IV – Hiszton Acetil-transzferáz Inhibitor IV

HDAC – Hiszton Deacetiláz

LKD – Ligand-Kötő Domén

MAPK – Mitogen Activated Protein Kinase

MBF1 – Multiprotein Binding Factor 1

NaB – Nátrium-butirát

NLS – Nukleáris Lokalizációs Szignál

PCNR – Proliferating Cell Nuclear Antigen

PKA – Protein Kináz A

RIP140 – Receptor Interacting Protein 140

SF-1 – Steroidogenic Factor 1

SMRT – Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid Receptor

SOX9 – SRY-box containing gene 9

SRC1,2 – Steroid Receptor Coactivator 1,2

StAR – Steroidogenic Acute Regulating Protein

TSA – Trychostatin A

TSPO – Translocator Protein

UBC9 – Ubiquitin Carrier Protein 9

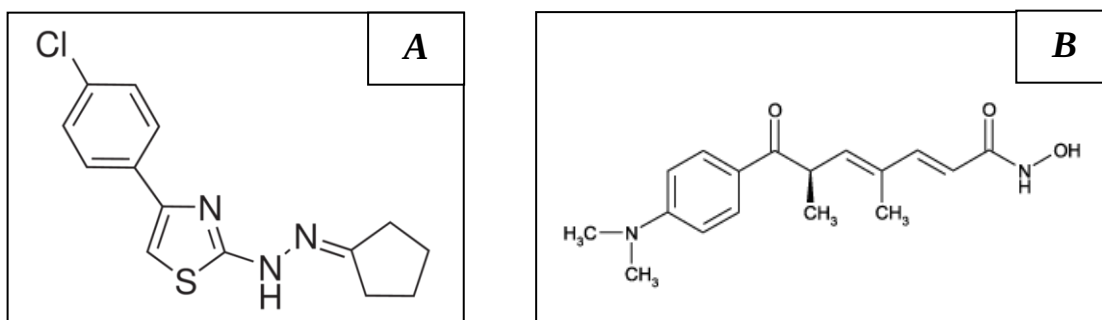
VPA – Valproinsav

ZIP67 – Zinc-finger Protein 67 kDa

4. Irodalmi áttekintés

4.1 Az eukarióta kromatinszerkezetet befolyásoló tényezők

A hiszton fehérjék eukarióta sejtekben szerepet játszanak a DNS kompakt szerkezetének kialakításában és a farki végükön történő kovalens módosítások segítségével fontos szabályozói a génexpressziónak. A hisztonok - főleg a H3 és H4 - N-terminális farki végein számos poszttranszlációs módosítás lehetséges, ezek közül leggyakrabban az acetiláció (Wade és mts., 1997), metiláció (Jenuwein és mts., 2001), foszforiláció, szumoiláció (Shiio és mts., 2003) és ubikvitináció (Shilatifard és mts., 2006) fordul elő. A lizin aminosavak acetilálódásának hatására az oldallánc pozitív töltése megszűnik, így a nukleoszómának nehezebb lesz semlegesíteni a DNS negatív töltését, a kromatin komplex destabilizálódik, lazább lesz. Ilyen körülmények között bizonyos specifikus DNS szakaszokon lévő gének hozzáférhetővé válnak, főként génexpresszió aktivációt, esetenként repressziót eredményezve.



1. ábra A HATi IV (A) és a TSA - HDAC inhibitor - (B) szerkezete.

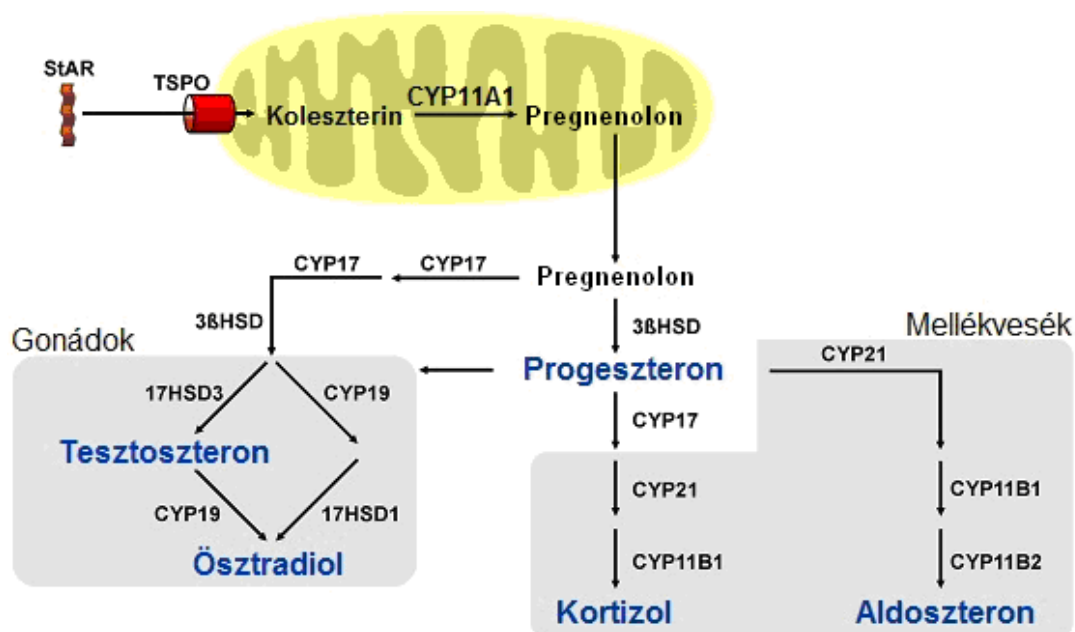
A kromatinszerkezetet befolyásoló hiszton acetiláció enzimatikusan katalizált. A hisztonok acetilációját hiszton acetil-transzferáz (HAT) enzimek végzik, míg a hiszton deacetilázok (HDAC) működése során a hisztonok acetiláltsága megszűnik, illetve nagymértékben lecsökken. A szabályozatlan HAT és HDAC aktivitásnak fontos szerepe van több ráktípus kialakulásában, így ezen enzimek specifikus inhibitorai potenciális rákellenes szerek (**1. ábra**). Ilyen inhibitorokkal történő kezelés során a sejtekben általánosan acetilált vagy deacetilált állapot indukálható. A HDAC inhibitorok alkalmazása során a hiszton molekulák acetilált állapotban maradnak, esetenként hiperacetiláció is megfigyelhető. Ilyen körülmények között a megváltozott kromatinszerkezet miatt általánosan megemelkedett génexpresszió tapasztalható (Bolden és mts., 2006). HDAC inhibitor a *Streptomyces platensis* gomba által termelt trichostatin A (TSA), melyet a klinikumban kemoterápiás szerként

használnak, a valproinsav (VPA), mely alkalmazása hatékony gyógymódnak bizonyul az epilepszia kezelésében (Kang és mts., 2012) illetve a nátrium-butirát (NaB) is. Érdekes megfigyelés, hogy a klinikumban alkalmazott HDAC inhibitorok a betegekben mellékhatásként csökkent szteroidhormon produkciót okoznak (Gregoraszczuk és mts., 2000). A HAT inhibitor molekulákból eddig keveset jellemeztek, irodalmuk kevésbé jól ismert. A HAT inhibitoroként működő garcinol 5-10 mM-os koncentrációban képes gátolni a p300/CBP és a GCN5/PCAF acetil-transzferázokat (Balasubramanyam és mts., 2003, 2004), míg a *Curcuma longa* növényből izolált kurkumin csak a p300/CBP sepcifikus gátlószere (Balasubramanyam és mts., 2004). Az újonnan leírt CPTH2 (HATi IV) kezelés *in vitro* és *in vivo* is specifikusan gátolja a GCN5 acetil-transzferáz hálózat elemeit (Chimenti és mts., 2009).

4.2 A szteroid hormonok bioszintézise

A humán szervezetben a szteroid hormonok fő forrásai az ovarium, a testis és a mellékvesekéreg, illetve embrionális fejlődés során a placenta. Az ovarium granulosa és theca sejtjei felelősek az ösztrogén és a progeszteron termeléséért, míg a testis Leydig-féle sejtjei tesztoszteront termelnek. A mellékvesekéreg morfológiailag és funkcionálisan három különböző zónára tagolható: az aldoszteront termelő glomerulosa, a kortizol szekréciójáért felelős fasciculata, és a reticularis zóna, ahol elsődlegesen dehidroepiandroszteron termelődik. Lokálisan a központi idegrendszerben és a szívben is történik szteroid hormon szekréció. Az idegrendszerben és a szívben termelődött szteroidok bioszintézisének szabályozása hasonló mechanizmusokkal történik, mint a fő szteroid hormonokat termelő szövetekben (Brown és mts., 2000, Kayes-Wandover és mts., 2000).

A szteroid hormonok szintézisének közös prekursora a koleszterin. A biosztintetikus útvonal két nagy lépésre bontható: az első a koleszterin bejutása a mitokondriumba, és átalakulása pregnenolonná, a második a keletkezett pregnenolon különböző szövetspecifikus enzimekkel történő módosítása, mely során kialakul az adott hormontermelő szerv szekréciós profilja. Az első lépés során a StAR protein az intracelluláris koleszterint a mitokondrium külső membránjához transzportálja, ahol a TSPO transzlokátor segítségével bejut a mitokondrium mátrixba (Rone és mts., 2009). A mitokondriumban lévő CYP11A1, egy citokróm P450 enzim, a bejutott koleszterint pregnenolonná alakítja, ami képes szabadon diffundálni a citoplazmába, ahol különböző enzimek szövetspecifikus szteroid hormonokat szintetizálnak belőle (Daniel B. Martinez-Arguelles és mts., 2010) (2. ábra).



2. ábra A mitokondriumban lévő *cyp11a1* gén által kódolt szteroid-hidroxiláz az első enzim, ami részt vesz a szteroid hormonok szintézisében. A koleszterinből keletkezett pregnenolon a mitokondrium membránján szabadon diffundál a citoplazmába, ahol szövetspecifikus enzimek átalakítják a megfelelő hormonná (Daniel B. Martinez-Arguelles és mts., 2010).

4.3 A *cyp11a1* gén általános jellemzői és transzkripció szabályozása

A széleskörű biológiai funkciókat ellátó citokróm P450 enzimek közös jellemzője, hogy fehérjéjként egy hem csoportot tartalmaznak, mely redukált állapotban, szén-monoxidot kötve 450 nm-es hullámhosszon abszorbeálja a fényt. A CYP11A1 P450 enzim a szteroidhormonokat szintetizáló szövetek mitokondriumaiban fordul elő, és a koleszterin pregnenolonná történő átalakítását katalizálja. Sokáig ezt a lépést tartották a szteroidszintézis sebesség-meghatározó lépésének, de ma már tudjuk, hogy a szintézis kritikus lépése a koleszterin szállítása a mitokondriumba, melyet a StAR fehérje végez (Stocco és mts., 2000). A StAR fehérje minden olyan szövetben előfordul, ahol szteroidszintézis történik, kivéve a placentában, így ebben a szervben a CYP11A1 által katalizált reakció a sebesség-meghatározó lépése a teljes bioszintézisnek (Tuckey és mts., 2005).

Az SF-1 (steroidogenic factor 1, NR5A1) egy sejtmagi receptor, mely fontos szerepet játszik a szteroidkonverzióban résztvevő gének – így a *cyp11a1* szabályozásában is. Ezt alátámasztja az, hogy patkányban az SF-1 overexpressziója során a *Cyp11a1* mRNS szintje jelentősen megemelkedik (Hong és mts., 2004). Az SF-1 szabályozó hatása *in vivo* és *in vitro*

is kimutatható: SF-1 knock out egerekben lecsökken a P450 enzimek mérhető aktivitása a herékben (Jeyasuria és mts., 2004), mutáns SF-1-et expresszáló Y1 sejtvonalon pedig a *Cyp11a1* mRNS szintje a felére csökken a vad típusú SF-1-et kifejező sejtekhez képest (Frigeri és mts., 2000).

Ember	GGAAGGA---CGTGAACATTTTATCAGCTTCTGGTA TGGCCTTGAGCT GGT---AGTTATAAT	-23
Juh	GGAAG-----CTGACCGCCCTGTCAGCTTCTCCATTAGCCTTGAGCTGGT---GATTATAAG	-21
Sertés	GGAGGAGGGAGTCTGATCGCTTAGTCAGCTTCTCGCTTAACCTTGAGCTGGT---GGTTATAAG	-24
Patkány	GGA-GGGGGG AGGTCA ACACTCCATCAGCTCCTCTCT TAGCCTTGAGCT AGTTAGTGGTTATAAG	-23
Egér	GGAAGGGGGGAGGTCACCGCTCCATCAGCTTCTCTCT TAGCCTTGAGCT GGT---GGTTATAAG	-24



SF-1



SF-1



TATA-box



AP-2

3. ábra A *cyp11a1* gén proximális promóterének összehasonlítása különböző emlős fajok között. Mind a szekvencia, mind az egyes transzkripciós faktorok kötőhelyeinek elhelyezkedése nagy hasonlóságot mutat. Az SF-1 proximális kötőhelye minden fajban megtalálható, rágcsálókban létezik egy disztális célszekvencia is (Holly és mts., 2009).

A *cyp11a1* gén proximális promóterének szekvenciája emlősök közt konzervált, és nagyjából azonos pozícióban tartalmazza egyes transzkripciós faktorok kötőhelyeit. A patkány *Cyp11a1* promóter szekvenciájában egy proximális és egy disztális SF-1-kötő szekvencia is található (3. ábra). Transzgenikus egerekben, a humán promóter proximális SF-1 kötőhelyének mutációja következtében a CYP11A1 LacZ fúziós partnere nem detektálható, ami azt jelenti, hogy ez a kötőhely fontos szerepet játszik a humán *cyp11a1* gén expressziójában *in vivo* (Hu és mts., 2001). A disztális SF-1-kötő szekvenciában létrehozott delécia nem okoz jelentősebb változást a gén kifejeződésében (Liu és mts., 1999). Amennyiben rágcsálókban mindkét SF-1 kötőhelyet elmutálták, az állatokban – a vártak megfelelően – csökkent a termelt szteroid hormonok szintje, viszont az ovariumban és a placentában a P450 enzimek expressziója nem változott (Shih és mts., 2008). Ez magyarázható azzal, hogy rágcsálókban az SF-1 nem expresszálódik a placentában. Bár emberben az SF-1 kifejeződik a placentában, valószínűleg nem szabályozza a *cyp11a1* gén működését. A proximális SF-1 kötőhely patkányban és egérben is átfed egy AP-2 kötőhellyel. Kísérletes eredmények azt támasztják alá, hogy egérben az AP-2 γ , emberben pedig az AP-2 α játszik nagyobb szerepet a placenta *cyp11a1* génjének szabályozásában (Ben és mts., 2002).

4.4 A szteroid konverzió általános szabályozója: az SF-1

Az SF-1 egy szövetspecifikusan kifejeződő sejtmagi receptor, mely transzkripciósfaktorként működve fontos szerepet játszik a szteroid konverzióban résztvevő gének szabályozásában. Az SF-1 már az embrionális fejlődés során megkezdte működését. A nemi differenciálódás során nélkülözhetetlen szabályozó faktornak bizonyul, majd később, a posztnatális élet alatt fontos szabályozója az adrenális és gonadális funkcióknak, minden olyan szövetben expresszálódik, ahol szteroid hormon szintézis történik (Parker és mts., 1997).

Az SF-1 fajok közötti konzerváltsága igen magas, az egér és a humán SF-1 fehérje szinten 95%-os homológiát mutat. Ezen kívül az SF-1-nek léteznek ortológjai gerinctelen fajokban is. Ilyen ortológ a *Drosophila melanogaster*-ben termelődő FTZ-F1 fehérje, melynek - az FTZ fehérje transzkripciósfaktoraként - jelentős szerepe van a szegmentáció kialakulásában (Ohno és Petkovich, 1993) és a szteroid konverzióban résztvevő *Halloween* gének expressziójának szabályozásában is. Az SF-1-et ortológjaival együttesen az NR5A sejtmagi receptor családba soroljuk (Parker és mts., 1999).



4. ábra Az SF-1 doménszerkezete. A DNS-kötő doménben (DKD) található a DNS megkötésében szerepet játszó cink-ujj motívum. A DNS-kötő domént az NR5A családra jellemző FTZ-F1 box egészíti ki, ahol egy nukleáris lokalizációs szignál (NLS) is elhelyezkedik. A DNS-kötő domént a ligand-kötő doménnel (LKD) egy prolin-gazdag régiót tartalmazó domén köti össze. Az összekötő régióban és a ligand-kötő doménben található 1-1 aktivációs domén (AF-1, AF-2) (Erling A. Hoivik és mts., 2010).

Az SF-1 fehérjének a sejtmagi receptorokra jellemző doménszerkezete van (**4. ábra**). Az N-terminális végen található a DNS-kötő domén, ahol egy Cys-Cys cink-ujj motívum segíti a célszekvenciához történő kötődést. C-terminális részén helyezkedik el a ligand-kötő domén, amit a DNS-kötő doménnel egy prolin gazdag flexibilis régió köt össze. Az NR5A család jellegzetessége, hogy a DNS-kötő domént kiegészíti egy konzervált „FTZ-F1 box”, ahol egy sejtmagi lokalizációs szignál található. A legtöbb sejtmagi receptorral ellentétben az SF-1 monomerként kötődik a DNS-hez, nem dimerként. Az SF-1 legnagyobb affinitással az 5' YCAAGGYCR 3' szekvenciához kötődik, ahol Y=T/C és R=G/A (Ueda és Hirose, 1991).

Sokáig az SF-1-et az „árva” sejtmagi receptorokhoz sorolták, jelezve ezzel, hogy nem találtak még olyan molekulát, ami kölcsönhat a ligand-kötő doménjével. Úgy tűnik, az SF-1 ligand kötése nélkül is képes ellátni funkcióját, ugyanis overexpresszáva folyamatos aktivitást mutat ligand kötése nélkül is. *In silico* strukturális vizsgálatok során a ligand-kötő doménben felfedeztek egy olyan speciális konformációt, amely lehetővé teszi az SF-1 ligand-független, aktív működését (Desclozeaux és mts., 2002). Baktériumokkal termeltetett SF-1 molekulák krisztallográfiás analízisével felfedeztek a ligand-kötő doménben egy hidrofób ligand-kötő zsebet, amely számos foszfolipid molekulát tartalmazott, főként foszfatidil-glicerint és foszfatidil-etanolamint. (Krylova és mts., 2005). Amikor a ligand-kötő zsebben pontmutációkat generáltak, az SF-1 nem tudott kölcsönhatást kialakítani koaktivátoraival és transzkripciót sem tudott aktiválni (Wang és mts., 2005). Néhány ilyen mutánsnál megfigyelték, hogy az SF-1 nem foszforilálódott, melyből feltételezhető, hogy az SF-1 ligand-kötő tulajdonsága és poszttranszlációs módosításai összefüggésben vannak egymással.

Az SF-1 transzkripció faktoraként gének nagy csoportját szabályozza. Az SF-1 a koleszterin metabolizmus fő szabályozója – szinte az összes gén szabályozásában részt vesz, melyek termékei szerepet játszanak a koleszterin mobilizálásában vagy a szteroid hormonok bioszintézisében. Az SF-1 aktiválja a koleszterin szintézisében résztvevő HMG-CoA szintáz kódoló gént (Mascero és mts., 2000) és a koleszterin transzportjában résztvevő StAR expresszióját is befolyásolja (Caron és mts., 1997). Szteroid hormonokat termelő szövetekben az SF-1 fontos szabályozó faktora a citokróm P450 szteroid hidroxilázoknak (CYP enzimek) is, melyek a koleszterin szteroid hormonokká történő átalakításában vesznek részt. Az SF-1 célgénjei közé tartoznak olyan gének is, melyek fontos szabályozói a szexuális determinációnak és differenciációnak (Parker és mts., 1997). Úgy tűnik, az embrionális élet során az SF-1 több gén szabályozásán keresztül a hím fenotípus fejlődésének kedvez. Embrionális korban a szteroid hormon szintézisen kívül a Wolff-cső megjelenése is SF-1-

függő. Az SF-1 a Sox-9-cel és Gata4-gyel együtt stimulálja az anti-Müller hormon képződését, amely szükséges a női fenotípusra jellemző Müller-cső degenerálódásához (De Santa Barbara és mts., 1998).

Az SF-1 *in vivo* pontos szerepének tisztázása érdekében *sf-1*^{-/-} knock out egér modelleket hoztak létre a kilencvenes évek közepén (Shinoda és mts., 1995, Sadovsky és mts., 1995, Lou és mts., 1994). A különböző laboratóriumokban létrehozott knock out modellek mind hasonló fenotípust mutattak. Az újszülött egerekben nem fejlődtek ki a mellékvesék és a gonádok, kromoszómális nemüktől függetlenül nőstény genitáliákkal rendelkeztek. A knock out egerek élve születnek, ami azt jelenti, hogy *in utero* nincs szerepe az SF-1-nek az állat túlélésében, viszont a létfontosságú szervek hiányában az újszülöttek néhány órával születésük után elpusztulnak. Mellékvese transzplantációval, vagy hormon injekciók alkalmazásával az újszülött állatok élete meghosszabbítható (Majdic és mts., 2002).

4.5 Az SF-1 poszttranszlációs módosításai és kölcsönható partnerei

A szteroid hormonok bioszintézisét az agyalapi mirigy által termelt peptid hormonok (FSH, LH, ACTH) stimulálják. ACTH hatására mellékvesekéreg sejtekben összetett szignalizációs utak aktiválódnak, mint például a cAMP és Ca²⁺-függő vagy a protein kináz C és MAP-kináz útvonalak (Gallo-Payet és mtsai., 2003). Az aktivált cAMP szintézis és az emelkedett cAMP-függő protein kináz A (PKA) aktivitás hatására a CYP-hidroxiláz enzimek transzkripció szintje megemelkedik (Sewer és mts., 2003), és ezzel párhuzamosan fokozott szteroid-szintézis figyelhető meg (Guo és mts., 2007). Az emelkedett cAMP-szint következtében aktiválódott gének nagy része egyben SF-1 célgén is. Az összefüggés, ami a két mechanizmust összeköti, jelenleg is intenzíven kutatott. *In vitro* a PKA közvetlenül foszforilálja az SF-1-et (de Santa Barbara és mts., 2001), ennek ellenére az emelkedett cAMP-szint nem befolyásolja annak foszforilációs állapotát *in vivo* (Sewer és Waterman, 2002). Az SF-1-függő gének transzkripció szintjének emelését a cAMP és a PKA valószínűleg nem közvetlenül az SF-1 foszforilálásán keresztül, hanem más közvetett utakon okozzák. Eddig csak egy foszforilációs helyet - a S203-at - azonosítottak az SF-1-en. A 203. szerin alaninná történő cseréje nem befolyásolja a fehérje stabilitását, szubcelluláris lokalizációját és DNS-kötő tulajdonságát sem (Hammer és mts., 1999).

A szumoiláció lizin oldalláncokon történő, eukarióta sejtek közt evolúciósan konzervált poszttranszlációs módosítás. Szumoiláció során egy három lépésből álló folyamat történik, mely során egy E1 aktiváló, egy E2 konjugáló enzim és E3 ligáz enzimek lépnek

működésbe. A kromatin vagy a transzkripció faktorok szumoilációja általában negatív jel, mely a gének kifejeződésének represszióját eredményezi. (Shilatifard és mts., 2006). Az SF-1 a DNS- és ligand-kötő doméneket összekötő régióban két lizin oldalláncon is (K119 és K194) szumoilálódik. Közvetlenül kölcsönhat az UBC9 SUMO-1 E2 konjugáló enzimmel és a PIAS család E3 ligázaival. (Yang és mts., 2009). Szumoiláció hatására az SF-1 funkciója represszálódik (Chen és mts., 2004). Egér mellékvesekéreg eredetű Y1 sejtvonalban szumoiláció hiányában az SF-1 célgének expressziója megnő (Yang és mts., 2009).

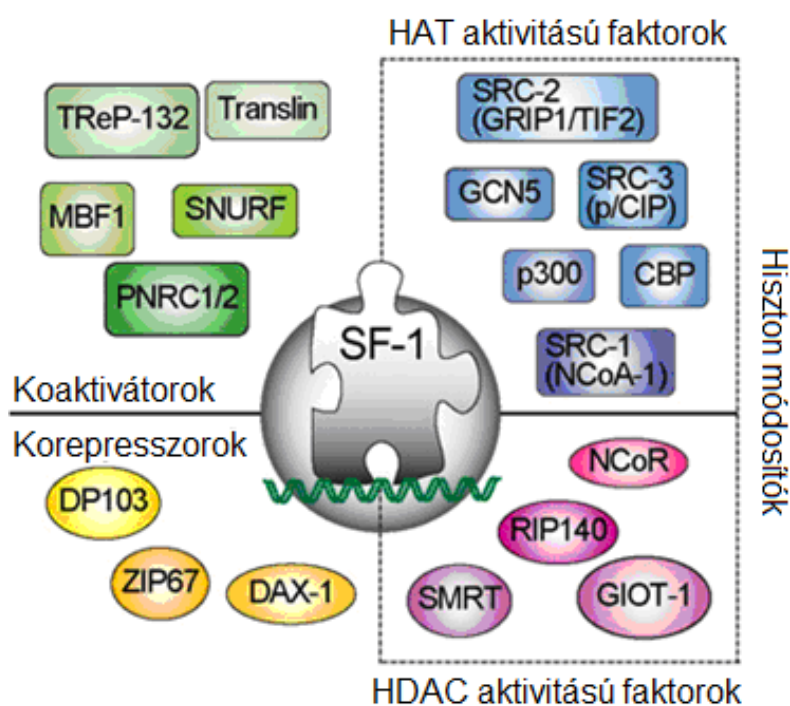
Az acetiláció egy olyan poszttranszlációs módosítás, ami egy acetyl-csoport kovalens kötését jelenti egy fehérje szubsztráton. Az acetiláció fontosságát elsősorban a hiszton fehérjék módosításai között szokás említeni. A hisztonok acetilált állapota sok esetben összefügg a transzkripcionálisan aktív kromatin szerkezettel. A HAT és a HDAC enzimeknek a hisztonokon kívül sok más nem hiszton fehérje szubsztrátjai is vannak. Az acetiláció a foszforilációval szemben a fehérjék működésének finom szabályozását teszi lehetővé, egyszerre több funkció is változhat egy fehérje acetilálódása során.

A sejtmagi receptorok közül először az ösztrogén és az androgén receptorról állapították meg, hogy létezik acetilált és deacetilált állapota is (Fu és mts., 2000). Ezek az eredmények sugallták, hogy más sejtmagi receptoroknál is történhet acetiláció, és hogy ez hatással van a sejtmagi receptorok működésére. Jelenleg 11 sejtmagi receptorról tudjuk, hogy egyes lizin oldalláncaikon acetilálódhatnak. Acetiláció hatására a sejtmagi receptoroknak megváltozhat a DNS-kötő képességük, ligandjukhoz való affinitásuk, stabilitásuk és szubcelluláris lokalizációjuk (Chenguang és mts., 2011).

Az SF-1 fehérjén eddig 3 acetilációs helyet találtak, melyek egy konzervált KQKKK aminosav-szekvencia lizinjein találhatóak. A 34-es, 38-as és a 72-es lizin oldalláncok a fehérje DNS-kötő doménjében találhatóak és a GCN5 acetyl-transzferáz által acetilálódnak. A GCN5 által katalizált acetiláció hatására az SF-1-nek megnő a transzaktivációs képessége (Jacob és mts., 2001). Az FTZ-F1-boxban található lizin-gazdag régiót a CBP/p300 is acetilálhatja. A CBP/p300 általi acetiláció a fehérje transzaktivációs képességére nincs hatással, de megnöveli az SF-1 DNS-kötő képességét (Chen és mts., 2005).

Az SF-1-nek számos koaktivátorát és korepresszorát írták le eddig (**5. ábra**). Az SF-1 koaktivátor partnerei közé tartoznak a CBP/p300 és a GCN5 acetyl-transzferázok (Dammer és mts., 2007), az SRC-1, SRC-2 (Winnay és mts., 2006) és a PCNR (Zhou és Chen, 2001). Korepresszorként működnek a RIP140 (Mellgren és mts., 2003) és az SMRT (Kelly és mts., 2005) hiszton deacetilázok. Az SF-1-gyel több transzkripció faktor – a Sox 9 (De Santa Barbara és mts., 1998), a CREB (Carlone és Richards, 1997) és a DAX-1 (Ito és mts., 1997) -

is kölcsönhat, így módosíthatják annak transzaktivációs képességét. A DAX-1 és az SF-1 fehérjék között nagyon fontos funkcionális és fehérje-fehérje kapcsolat van, együtt játszanak szerepet az adrenogonadális fejlődésben is (Yu és mts., 1998), melynek egyik jele, hogy ez a két faktor a szteroidhormonokat termelő szövetekben együtt expresszálódik (Saito és mts., 2005). A két faktor szoros funkcionális működését igazolja, hogy azok a betegek, akik az *Sf-1* vagy a *Dax-1* génekben hordoznak mutációt, hasonló fenotípust mutatnak. A DAX-1 egy atipikus sejtmagi receptor, ugyanis nem rendelkezik konzervált DNS-kötő doménnel, viszont rendelkezik olyan ismétlődő peptidszekvenciákkal, amelyek különösen alkalmassá teszik más fehérjékkel történő kölcsönhatásra. Ezek a motívumok szabályozzák a DAX-1 kölcsönhatását az SF-1 ligand-kötő doménjével (Suzuki és mts., 2003). A DAX-1 oly módon gátolja az SF-1 célgénjeinek expresszióját, hogy az SF-1 koaktivátoraival – mint az SRC-1 – kompetícióban áll, így sok esetben a DAX-1 hat kölcsön az SF-1-gyel, gátolva annak funkcióját (Altincicek és mts., 2000). Sejtkultúrákon végzett kísérletek alapján a DAX-1 az SF-1 célgének közül gátolja a *StAR* (Yu és Li., 2006) és a *Cyp11a1* (Kim és mts., 2005) gének expresszióját is.



5. ábra Az SF-1 kölcsönható fehérjepartnerei. A hisztin módosításokat végző faktorok közül a HAT enzimek aktivátorként, a HDAC enzimek pedig represszorként működnek, de ezeken kívül egyéb koaktivátorok (pl. Translin, MBF1) és korepresszorok (pl. DAX-1, ZIP67) is szabályozzák az SF-1 működését (Erling A. Hoivik és mts., 2010).

5. Célkitűzések

Munkánk során fő cél volt, hogy emlős rendszerben vizsgáljuk, hogyan történik a szteroid konverzió szabályozása, és az acetiláció milyen szerepet játszik benne.

1. Ennek kivitelezéséhez szükség volt arra, hogy SF-1-et tudjunk expresszálni olyan sejtvonalakban (HeLa, U2Os), ahol alapvetően a fehérje nem termelődik. Ennek érdekében a patkány SF-1 kódoló szekvenciáját egy emlős sejtvonalakban működő pCDNA3-FLAG vektorba klónoztuk.
2. Célunk volt, hogy megállapítsuk, az SF-1 aktiválásában szerepet játszik-e az acetiláció. Ennek érdekében U2Os és HeLa sejtekben vizsgáltuk, hogyan változik az SF-1 fehérje szubcelluláris lokalizációja TSA, illetve HATi IV kezelés hatására.
3. Célul tűztük ki, hogy vizsgáljuk, az SF-1 egyik célgénjének, a *Cyp11a1* promóterének aktivitása függ-e a sejtek acetilációs állapotától. Ennek érdekében szükség volt arra, hogy létrehozzunk egy olyan riporter vektort, amely segítségével közvetve mérhető a *Cyp11a1* gén promóterének aktivitása.
4. Munkánk során célunk volt megállapítani, hogyan befolyásolják a különböző HDAC inhibitorok és a HATi IV az SF-1 transzaktivációs képességét.
5. Real-time PCR-rel vizsgálni, milyen hatása van a HDAC inhibitoroknak (TSA, VPA és NaB) az *Sf-1* génjének és célgénjének, a *Cyp11a1*-nek az mRNS szintjére.

6. Felhasznált anyagok és módszerek

6.1 Agaróz gélelektroforézis

A DNS minták elektroforézisét 1%-os agaróz/TAE (40 mM Tris-ecetsav, pH=7,6; 1 M Na₂EDTA) gélen végeztük. A mintákat a DNS bázisai közé interkalálódó etídium-bromid festékkel tettük UV fény alatt láthatóvá. A molekulaméret meghatározásához 1 kb plus markert használtunk (*Fermentas*).

6.2 DNS visszaizolálása agaróz gélből

A megfuttatott gél pár másodpercre megvilágítottuk UV fénnel, majd steril pengével kivágtuk a megfelelő fragmenteket. Miután lemértük a gél darabok súlyát, *Qiagen gélextrakciós kitet* használtunk a gyártó utasítása szerint. A visszaizolált fragmentek méretét és mennyiségét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

6.3 Baktérium transzformáció

A transzformáláshoz DH5α *Escherichia coli* kompetens sejteket használtunk. 50 µl kompetens sejthez 2,5 µl DNS-t adtunk, majd 30 percig jégen inkubáltuk. 45 másodpercig 42°C-on hősokkoltuk a mintát, hogy a baktériumsejttel pórusai kitáguljanak. Ez után, hogy a pórusokon a DNS bejusson, 2 percig jégen inkubáltuk. 950 µl LB tápoldattal 1 ml-re egészítettük ki a térfogatot, majd 1 órán át 37°C-on növesztettük a sejteket. Ezt követően 3000 rpm-en 3 percig centrifugáltuk a baktériumsejteket, a felülúszó LB-t leöntöttük, és a baktériumsejteket ampicillines LB lemezre szélesztettük. 37°C-on 16 óráig növesztettük a telepeket.

6.4 Plazmid DNS tisztítás baktérium sejtekből

A lemezen felnőtt telepekből a miniprepet megelőző napon ampicillint tartalmazó LB tápoldatba oltottunk le, melyeket 37°C-on, éjszakán át forgatva inkubáltunk. Másnap a

tápoldatból centrifugálással összegyűjtöttük, és mintánként 100 µl BRS oldatban (50 mM glükóz, 50 mM Tris-HCl pH=8,0; 10 mM EDTA) felfuszpendáltuk a sejteket. A további lépések során a mintákat tartalmazó Eppendorf csöveket végig jégen tartottuk. Mintánként 200 µl LS oldattal (200 mM NaOH, 1% SDS) lizáltuk a sejteket, majd 150 µl KoAc oldattal (11,5% jégecet, 3 M K-acetát) kicsaptuk a baktérium kromoszómális DNS-ét és a fehérjéket. A felülúszóból 96%-os etanollal kicsaptuk a plazmid DNS-t, amit aztán 75%-os etanollal mostunk a szennyező sóktól. Szárítás után a preparált plazmid DNS-t RNáz-t tartalmazó TE pufferben (100 mM Tris-HCl pH=8,0; 1 mM EDTA) oldottuk vissza.

6.5 Plazmid DNS tisztítás *Midiprep Qiagen Kittel*

Annak érdekében, hogy az emlős sejtkultúrákat transzfektálhassuk az elkészült konstrukciókkal, a plazmid DNS-t nagy tisztaságban *Qiagen Midiprep Kit* segítségével tisztítottuk. Előző nap 50 µl ampicillint tartalmazó, 50 ml LB tápoldatba oltottunk le az ampicillines lemezen felnőtt telepekből és éjszakán át 37°C-os rázóban növesztettük a sejteket. Másnap elvégeztük a megfelelő protokollt a gyártó utasítása szerint. A midiprep után a kapott DNS koncentrációját és tisztaságát Nano Droppal ellenőriztük.

6.6 Emlős sejtvonalak fenntartása és transzfektálása

Munkánk során a humán eredetű HeLa (méhnyakrák), U2Os (csontvelőrák) és egérből származó Y1 (mellékvesekéreg tumor) sejtvonalakkal dolgoztunk. A U2Os és HeLa sejteket 10% (U2Os) illetve 5% (HeLa) FCS-t (Fetal Calf Serum), 1x antibiotikumot és 4 mM glutamint tartalmazó DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) tápoldatban (*Lonza*), az Y1 sejteket 2,5% FCS-t, 15% HS-t (Horse Serum), 1x antibiotikumot és 1 mM glutamint tartalmazó F12 médiumban (*Lonza*) növesztettük 37°C-on, CO₂-os inkubátorban.

A transzfektálások előtt 3×10^5 sejtet osztottunk 6-lyukú plate-be. A sejteket Bürker kamra segítségével számoltuk. A U2Os sejteket ExGen 500, a HeLa és Y1 sejteket TurboFect *in vitro* transzfekciós reagens felhasználásával transzfektáltuk a gyártó (*Thermo scientific*) utasítása szerint.

6.7. Emlős sejtek kezelése HDAC inhibitorokkal és HATi IV-gyel

A kezelés előtt 24 órával 6×10^5 sejtet osztottunk 6 cm-es csészékbe. A transzfektált minták esetében a transzfekció után 24 órával alkalmaztuk a kezelést. A TSA-t 30-120 mM, a VPA-t és a NaB-ot 1-2 mM, a HATi IV-et pedig 20–150 μ M koncentrációban alkalmaztuk. A kezelést követően a sejteket 24 óráig 37°C-os termosztátban inkubáltuk.

6.8. Luciferáz aktivitás mérés

A kezeléseket után a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, majd 1500 μ l PBS pufferben kapartuk fel őket. A mintákat Eppendorf csövekbe mértük, majd 6 percig tartó 8000 rpm-es centrifugálással üleptítettük a felkapart sejteket. A felülúszó eltávolítása után mintánként 200 μ l 1x lízis pufferben (*Promega*) szuszpendáltuk fel, majd 60 percen keresztül jégen tartottuk a sejteket. Az inkubáció alatt a mintákat a lízis elősegítése érdekében időnként vortexeltük. A lízist követően a keletkezett sejttörmelékét 5 percig tartó 13000 rpm-es centrifugálással üleptítettük és a felülúszót új Eppendorf csövekbe mértük át. A sejtextraktumok fehérjekoncentrációját Bradford reagens felhasználásával határoztuk meg. A luciferáz aktivitás mérése során 96-lyukú plate egy well-ébe 20 μ l-t mértünk a sejtextraktumból és 25 μ l luciferáz-esszé reagenst (20 mM tricin, 1,07mM $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2,67 mM MgSO_4 , 0,1 mM EDTA, 33,3 mM DTT, 270 μ M koenzim A, 470 μ M luciferin, 530 μ M ATP) adtunk hozzá. Az aktivitást luminométerrel mértük.

6.9. Western blot analízis

Y1 sejtekben a H4K5 specifikus acetiláció mértékét western blot segítségével vizsgáltuk. A kezeléseket után a 6×10^5 sejtet tartalmazó csészéket PBS-sel mostuk, majd a mintákat 40 μ l szonikációs pufferben (50 mM TRIS, 2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 50 mM NaCl) vettük fel. A sejtek feltárását háromszor egymást követően folyékony nitrogénben történő fagyasztás és 37°C-on történő olvasztás váltakozásával segítettük elő. A minták fehérjekoncentrációját Bradford reagens segítségével meghatároztuk, majd ezt követően a mintákat 5 percig β -merkaptoetanolt tartalmazó 2x SDS-loading pufferben 100°C-on forraltuk.

Mindegyik mintából 20 μ g fehérjét vittünk fel SDS-t tartalmazó poliakrilamid gélre. 1x ELFO pufferben 100 V-on futtattuk a mintákat, amíg a minták el nem érték a gél alját.

Ezután transzfer puffert használva másfél óráig 200 mA áramerősségen nitrocellulóz membránra blottoltuk a méret szerint elválasztott fehérjéket. A membránt Ponceau festékkel (*Reanal*) festettük, így ellenőrizve, hogy sikeres volt-e a transzfer. A festést vízzel kontrasztosítottuk, majd a Ponceau-t TBST-vel (5 mM TRIS, 15 mM NaCl pH=7,4; 0,05% Tween) kimostuk a membránból. A membránt éjszakán át 5%-os tejpor-TBST oldatban 4°C-on inkubáltuk, így a membrán szabad fehérjekötő helyeit blokkoltuk.

Másnap a membránt háromszor 10 percig TBST-vel mostuk, majd az 1%-os tejpor-TBST-ben hígított elsődleges ellenanyaggal másfél órán keresztül ringatón inkubáltuk. Az inkubáció után a membránt ismét háromszor 10 percig TBST-vel mostuk, majd ráértük a megfelelő, torna-peroxidázzal konjugált másodlagos ellenanyagot, melyet szintén 1%-os tejpor-TBST-ben hígítottunk ki. Egy órás ringatás után háromszor mostuk a membránt TBST-vel, majd ECL előhívó reagenst (*Millipore*) mértünk rá 1:1 arányban (luminogén reagens és a torna-peroxidáz enzim szubsztrátja). 5 percig a membránon hagytuk, majd ezt követően az oldatot alaposan leittattuk. A membránra fóliát helyeztünk, majd a keletkezett kemilumineszcens jelet sötét szobában röntgen filmre exponáltuk, a filmet előhívtuk és fixáltuk. A membránt amidoblack festékkel festettük, majd a festést TBST-s mosással kontrasztosítottuk.

Fehérje	Méret	Akrilamid	Elsődleges ellenanyag		Másodlagos ellenanyag	
			Típus	Hígítás	Típus	Hígítás
SF-1-FLAG	~ 55 KDa	10 %	anti-M2FLAG	1:10000	anti-mouse	1:20000
H4K5 ac	11 kDa	12 %	anti-H4K5ac	1:2000	anti-rabbit	1:4000
Aktin	~40 kDa	12 %	anti-aktin	1:5000	anti-goat	1:10000

1. táblázat Az egyes fehérjék kimutatásához használt antitestek és hígításuk

6.10. Immuncitokémia

A FLAG-peptiddel jelölt, overexpresszált SF-1 fehérje szubcelluláris lokalizációját immuncitokémia segítségével vizsgáltuk U2Os és HeLa sejtekben. Négy well-t tartalmazó „Chamber Slide” tenyésztőedényekbe well-enként 1×10^5 sejtet osztottunk, majd mintánként 1 μ g DNS-t transzfektáltunk, a transzfekciós reagensek (Tubofect, ExGene) gyártóinak

utasítása szerint. A transzfektálást követő 24 óra múlva TSA illetve HATi IV kezelést alkalmaztunk. A 24 órás kezelés után a tápoldatot eltávolítottuk és a PBS-sel mosott sejteket 4%-os paraformaldehid oldattal (4% paraformaldehid-PBS, 2 mM NaOH) ringatón inkubáltuk, így azokat fixáltuk. A mintákat 10 percig PBS-sel mostuk, majd 20 percig 0,3%-os, PBS-ben hígított Triton-X-100 oldattal kezeltük, így a sejteket permeabilizáltuk. 5 perces PBS-es mosást követően az aspecifikus fehérjekötő helyeket 5%-os, PBS-ben feloldott BSA oldattal blokkoltuk. 20 perc blokkolás után 5 percig mostuk a mintákat PBS-sel, majd ráértük a mintákra az ellenanyagot tartalmazó oldatokat.

Az M2 FLAG-peptid-specifikus elsődleges ellenanyagot 1%-os BSA-PBS oldatban hígítva 1:1000 koncentrációban alkalmaztuk. Az elsődleges ellenanyaggal a mintákat másfél óráig ringatón inkubáltuk, majd kétszer 10 percig PBS-sel mostuk. A másodlagos ellenanyag szintén 1%-os BSA-PBS oldatban volt hígítva. A másodlagos ellenanyagok (Alexa-anti mouse) zöld, illetve piros fluorofórral voltak jelölve, és 1:2000 hígításban alkalmaztuk. Az immunreakciók után háromszor 10 percig tartó PBST-s mosást végeztünk. Az utolsó PBST-s mosóoldat 1:1000 hígításban tartalmazott a sejtmag megfestésére szolgáló DAPI fluoreszcens DNS festéket (*Sigma*). A sejtmagok festését követően, a felesleges DAPI festéket 5 percig tartó PBST-s mosással távolítottuk el. Végül a mintákra 20-20 µl fluoromount-ot (*Sigma*) mértünk, majd, fedőlemezzel lefedtük azokat. Az SF-1 fehérje szubcelluláris lokalizációját ezt követően fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltuk.

6.11. RNS izolálás Y1 sejtekből és reverz transzkripció

A kezelések után a sejteket PBS-sel mostuk. Ezt követően a sejtekből RNS-t izoláltunk *RNeasy Plus Mini Kittel* (*Qiagen*) a gyártó utasítása szerint. A tisztított RNS koncentrációját Nano Droppal mértük le.

Az izolált RNS-ek cDNS-re történő átírásához reverz transzkripciót végeztünk. Egy reakció során mintánként összesen 2 µg RNS-t írtunk át. A reverz transzkripció során *ABI Reverse Transcription Kit*-et használtunk a gyártó utasítása szerint.

6.12 Real-time PCR

A *Cyp11a1* és *Sf-1* génekről átíródó mRNS mennyiségét ABI 7500 real-time PCR készülék segítségével határoztuk meg. A real-time PCR során a következő expressziós primereket használtuk:

Cyp11a1 Fwd: 5' CTGCCTCCAGACTTCTTTTCG 3'
 Rev: 5' TTCTTGAAGGGCAGCTTGTT 3'

Sf-1 Fwd: 5' TGAGAGCTGCAAGGGCTTC 3'
 Rev: 5' CTTGTACATCGGCCCAAAC 3'

18S RNS Fwd: 5' AAACGGCTACCACATCCAAG 3'
 Rev: 5' CGCTCCCAAGATCCAAC 3'

A képződött dsDNS termék detektálását SyberGreen interkalálódó festékkel végeztük (*Applied Biosystems SYBR Green PCR Master Mix*). A PCR reakciók belső kontrolljaként a *18S RNS* gén expresszióját vizsgáltuk. A reakció lefutása után az mRNS-ek mennyiségét $\Delta\Delta C_t$ analízis segítségével számoltuk ki. Az mRNS-ek mennyiségét a primerek hatékonysága alapján úgy számoltuk ki, hogy a kapott $\Delta\Delta C_t$ érték -1-szeresét 2 hatványára emeltük (expresszió = $2^{-\Delta\Delta C_t}$)

7. A kísérletek során használt konstrukciók elkészítése

7.1 A patkány SF-1 klónozása pCDNA3-FLAG vektorba

Munkánk során szükség volt arra, hogy létrehozzunk egy olyan konstrukciót, amely segítségével az SF-1-et tudjuk termeltetni olyan sejtekben is, melyekben alapvetően nem expresszálódik. A pCDNA3-FLAG vektor emlős sejtekben működő vektor, és tartalmaz egy N-terminális FLAG-peptid szekvenciát, amivel ha fúzionáltatjuk a SF-1 génjét, a későbbiekben vizsgálni tudjuk M2-FLAG antitest segítségével is a vektorról termelődő fehérjét.

Az SF-1 kódoló szekvenciáját PCR segítségével patkány heréből izolált RNS-ről átírt cDNS templárról amplifikáltuk. A forward primer egy EcoRV (**GATATC**), a reverse primer egy XhoI (**CTCGAG**) restrikciós enzim hasítóhelyet tartalmazott. Ezekkel a restrikciós enzimekkel tudtuk a SF-1 kódoló szekvenciáját beépíteni a vektorba úgy, hogy a leolvasási keret ne tolódjon el. A PCR során használt, restrikciós hasítóhelyeket tartalmazó primerek szekvenciái a következők voltak:

Fwd: 5' TCG**GATATC**TGGACTATTCGTACCGACGA 3'

Rev: 5' TAC**CTCGAG**TCAAGTCTGCTTGGCCT 3'

Az SF-1 amplifikálásához *Pfu* polimeráz enzimet használtunk, így nagyobb pontossággal tudtuk átírni a szekvenciát a cDNS templárról, elkerültük a pontmutációk kialakulását. A PCR reakció komponenseit és lépéseit a **2. táblázat** foglalja össze:

1 reakció összetétele 25 µl végtérfogatban	
0,8 mM dNTP	400 nM fwd primer
2 mM MgSO ₄	400 nM rev primer
1x <i>Pfu</i> puffer	0,5 µl DNS templát
0,03 U/µl <i>Pfu</i> enzim	13,7 µl dH ₂ O
A PCR reakció lépései	
Elődenaturáció	95°C - 5 perc
Denaturáció	95°C - 30 mp
Hibridizáció	54°C - 40 mp
Polimerizáció	72°C - 165 mp
Utópolimerizáció	72°C 10 perc

2. táblázat Az SF-1 kódoló szekvenciájának amplifikálásához használt PCR reakció komponensei és lépései.

A PCR reakció termékét 1%-os agaróz gélen megfutattuk, a termék a várt mérettartományban adott jelet (~1500 bp). A PCR terméket először pJET 1.2 blunt végű klónozó vektorba ligáltuk a gyártó (*Fermentas*) utasítása szerint. A ligált vektort, ami tartalmazta a SF-1 kódoló szekvenciáját, DH5α *E. coli* kompetens sejtekbe transzformáltuk. A sejteket ampicillines lemezre szélesztettük, majd a másnapra felnőtt telepekből 3 ml LB tápoldatba oltottunk át, ami 3 µl ampicillinnel volt kiegészítve. A sejtekből a következő napon miniprepet készítettünk.

A tisztított plazmidot és az üres pCDNA3-FLAG vektort EcoRV és XhoI enzimekkel emésztettük, majd az emésztési reakciókat 1%-os agaróz gélen megfuttattuk. A pJET vektorból kivágott SF-1 fragmentet és a linearizált pCDNA3-FLAG vektort a gélből *Qiagen gélextrakciós kit* segítségével visszaizoláltuk, majd összemértük a ligálási reakciót. A ligálást 4°C-on két napon keresztül inkubáltuk, majd *E. coli* DH5α kompetens sejtekbe transzformáltuk. A felnőtt telepekből miniprepet készítettünk, és a plazmidokat teszteltük a klónozásnál használt restriktációs enzimekkel. Mivel az eredmény a vártak megfelelő volt, a sejtekből midiprepet készítettünk *Qiagen Midiprep Kit* segítségével. A midiprepet megszekvenáltattuk, így ellenőriztük, hogy a leolvasási keret nem tolódott el, és a szekvencia nem tartalmaz pontmutációt.

Az elkészült vektort U2Os sejtekbe transzfektáltuk, és a termelődött SF-1 fehérjét western blot segítségével mutattuk ki FLAG peptidet felismerő elsődleges ellenanyaggal. A fehérje a vártak megfelelő mérettartományban adott jelet.

7.2 A patkány *Cyp11a1* promóterének klónozása pGL3 luciferáz riporter gént tartalmazó vektorba

Annak érdekében, hogy a *Cyp11a1* gén szabályozását *in vitro* körülmények között vizsgálni tudjuk, a gén promóter szekvenciáját luciferáz riporter gént tartalmazó klónozó vektorba építettük be. A vektor multiklónozó régiója mögött egy luciferáz riportergén van, amit a vektorba beépített promóter tud meghajtani, így a luciferáz enzimaktivitásának mérésével közvetve vizsgálható a beépített promóter aktivitása is.

A *Cyp11a1* promóter régióját PCR segítségével amplifikáltuk patkány genomi DNS templárról. A primereket úgy terveztük, hogy a kapott termék a *Cyp11a1* gén transzkripció start pontjától upstream 1046 bázispárnyi szakaszt tartalmazott. Az amplifikált szakasz három SF-1 kötőhelyet is tartalmazott. Az amplifikáció során használt forward primer egy

SacI (**GAGCTC**), a reverse primer pedig egy NheI (**GCTAGC**) restrikciós hasítóhelyet tartalmazott. Ezekkel a restrikciós enzimekkel emésztve a vektort, illetve a PCR terméket ragadós, kompatibilis végeket kapunk. A hasítóhelyeket tartalmazó primerek szekvenciái a következők voltak:

Fwd: 5' TCG**AGCT**CGGCAAGGGGATCTTAAAAG 3'

Rev: 5' TAG**CTAGC**ACTGTCCCCACGACT 3'

A szekvencia amplifikálásához használt PCR reakció komponenseit és lépéseit a **3. táblázat** foglalja össze.

1 reakció összetétele 25 µl végtérfogatban	
0,8 mM dNTP	400 nM fwd primer
2 mM MgCl ₂	400 nM rev primer
1x Taq puffer	3 µl DNS templát
0,05 U/µl Taq enzim	11,25 µl dH ₂ O
A PCR reakció lépései	
Elődenaturáció	95°C - 5 perc
Denaturáció	95°C - 30 mp
Hibridizáció	56°C - 40 mp
Polimerizáció	72°C - 70 mp
Utópolimerizáció	72°C 10 perc

3. táblázat A *Cyp11a1* promóter szekvenciájának amplifikálásához használt PCR reakció komponensei és lépései.

A PCR reakció termékét 1%-os agaróz gélen megfuttattuk, a termék a várt mérettartományban (~1000 bp) adott jelet. A PCR terméket először pJET 1.2 blunt végű klónozó vektorba ligáltuk a gyártó (*Fermentas*) utasítása szerint. A ligált vektort, ami tartalmazta a *Cyp11a1* promóter szekvenciáját, DH5α *E. coli* kompetens sejtekbe transzformáltuk. A sejteket ampicillines lemezre szélesztettük, majd a másnapra felnőtt telepekből 3 ml LB tápoldatba oltottunk át, ami 3 µl ampicillinnel volt kiegészítve. A sejtekből a következő napon miniprepet készítettünk.

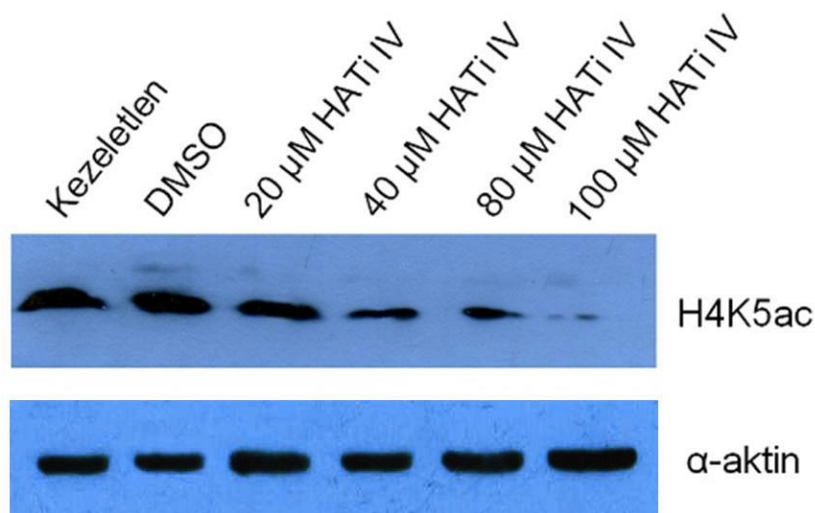
A miniprepet és az üres pGL3 vektort NheI és SacI enzimekkel emésztettük, majd az emésztési reakciót 1%-os agaróz gélen megfuttattuk. A pJET-ből kiemésztett fragmentet, és a linearizálódott pGL3 vektort *Qiagen gélextrakciós kit* segítségével visszaizoláltuk az agaróz

gélből. A visszaizolált fragmenttel és az emésztett pGL3 vektorral ligálási reakciót mértünk össze. A T4 ligázt tartalmazó ligálási reakciót 4°C-on inkubáltuk egy hétvégén keresztül. A ligátumot *E. coli* kompetens sejtekbe transzformáltuk, majd a felnőtt telepekből miniprepet készítettünk. A miniprepek tesztelésztése a vártnak megfelelő volt, így a sejtekből *Qiagen Midiprep Kit* segítségével tisztítottuk a plazmid DNS-t. A midiprepet tesztelésztettük, az eredmény a vártnak megfelelő volt.

8. Eredmények

8.1. A HATi IV megfelelő koncentrációjának beállítása Y1 sejteken

Munkánk során többször használtuk az egér mellékvesekéreg tumor eredetű Y1 sejtvonalat. Az Y1 szteroid hormonokat termelő szövetből származó sejtvonal, ezért expresszálják a szteroid hormonok bioszintéziséhez szükséges enzimeket kódoló géneket és szabályozó faktorokat. Mivel ezek a faktorok jelen vannak az Y1 sejtekben, ez a sejtvonal jó *in vitro* modell az SF-1 és a gerincesek szteroid konverzió-szabályozásának vizsgálatára.



6. ábra A HATi IV 80 – 100 μM koncentrációban jelentősen csökkenti a H4K5 specifikus acetiláció mértékét Y1 sejtekben. A DMSO-t (dimetil-szulfoxid) oldószeres kontrollként alkalmaztuk. A western blot loading kontrolljaként α-aktin ellenanyaggal hívtunk a membránra.

Az SF-1 regulátor partnere a GCN5 hiszton acetil-transzferáz aktivitású fehérje, melynek működését a HATi IV gátolja. A HATi IV hiszton acetil-transzferáz inhibitor alkalmazásról nem jelent meg publikáció, ezért a megfelelő koncentrációban való alkalmazását vizsgáltuk Y1 sejtekben.

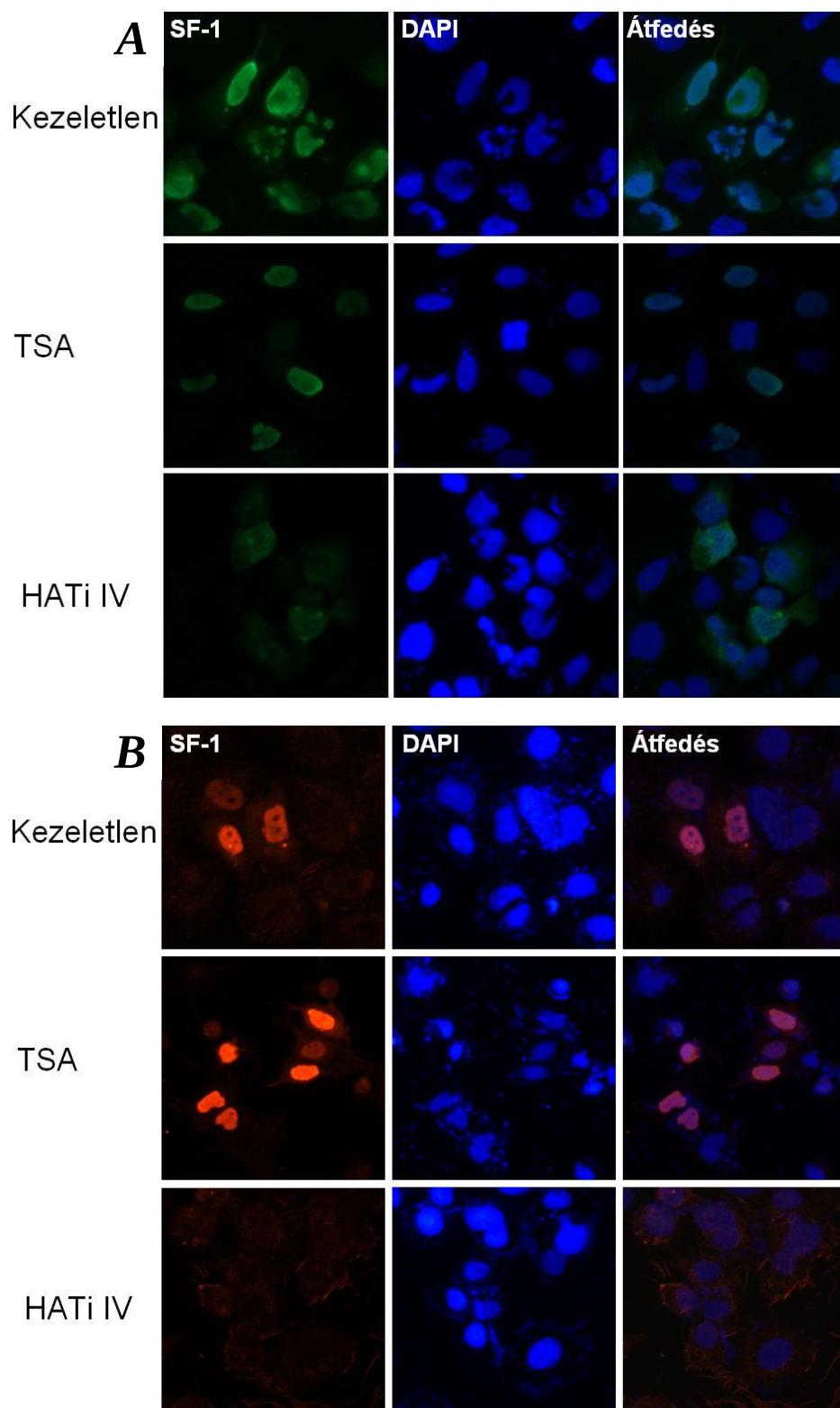
Ennek kivitelezéséhez Y1 sejteket 20 – 100 μ M koncentrációban kezeltünk HATi IV-gyel, majd western blot segítségével vizsgáltuk a H4K5 - ATAC specifikus acetiláció mértékét. A kezelések során a HATi IV oldószerével – DMSO-val (dimetil-szulfoxid) – végeztünk oldószeres kontroll kísérletet is. A DMSO-val kezelt minták esetén a 100 μ M koncentrációban használt inhibitor térfogatával megegyező mennyiségű oldószert adtunk a sejtek médiumához.

A western blot eredményeként megállapíthatjuk, hogy a 20 μ M-os HATi IV kezelés nem befolyásolta jelentősen a H4K5 acetiláció mértékét. Magasabb koncentráció esetén, 80 – 100 μ M tartományban, a kezeletlen mintákhoz képest már lényegesebb csökkenés látszik a H4K5 specifikus acetiláció mértékében. Mivel a sejtekre a magasabb koncentrációban alkalmazott HATi IV sem volt toxikus hatással, ezért a későbbi munkák során 80 μ M és ennél nagyobb koncentrációban alkalmaztuk a gátlószert. A western blot során loading kontrollként α -aktin ellenanyaggal hívtunk a membránra (6. ábra)

8.2. Az SF-1 szubcelluláris lokalizációjának vizsgálata TSA és HATi IV kezelés hatására

A sejtmagi receptor fehérjékre általánosan jellemző, hogy inaktív állapotban a citoplazmában vannak jelen, majd aktiválódások során – melyet okozhat például ligand kötése, kölcsönhatás más fehérjékkel vagy poszttranszlációs módosítás – a sejtmagba jutnak, ahol részt vesznek célgénjeik szabályozásában. Ezért a sejtmagi receptorok sejten belüli elhelyezkedése fontos tényező működésük szempontjából.

A kísérlet során HeLa és U2Os sejtekbe transzfektáltuk a korábban létrehozott pCDNA3-SF-1-FLAG vektort. Ezek a sejtvonalak nem expresszálják sem a szteroid szintézishez szükséges enzimeket, sem az SF-1-et, viszont jelen van bennük az SF-1 szabályozásában is szerepet játszó GCN5. A transzfekció után 24 órával a sejteket 30 mM TSA-val és 80 μ M HAT IV-gyel kezeltük, így befolyásoltuk az acetiláció mértékét. A TSA HDAC inhibitorként működik, így a sejtekben „hiperacetilált állapot” lesz jelen a kezelés hatására. A kezelések után 24 órával immuncitokémia segítségével vizsgáltuk a transzfektált fehérje szubcelluláris lokalizációját. Az SF-1-et a fúziós FLAG-peptid ellen előállított elsődleges ellenanyag (M2-FLAG) segítségével mutattuk ki. U2Os sejtek esetén a használt másodlagos antitest zöld, HeLa sejteknél piros fluorofór festékkel volt jelölve. A sejtmagokat DAPI DNS festékkel tettük láthatóvá (7. ábra).



7. ábra A kezeletlen sejtekben az SF-1 mind a sejtmagban, mind a citoplazmában megtalálható. 30 mM TSA kezelés hatására a fehérje a sejtmagban detektálható, 80 μ M HATi IV kezelés hatására az SF-1 citoplazmatikus lokalizációja figyelhető meg. A kapott eredmény mind U2Os (**A**), mind HeLa (**B**) sejtekben megegyezik.

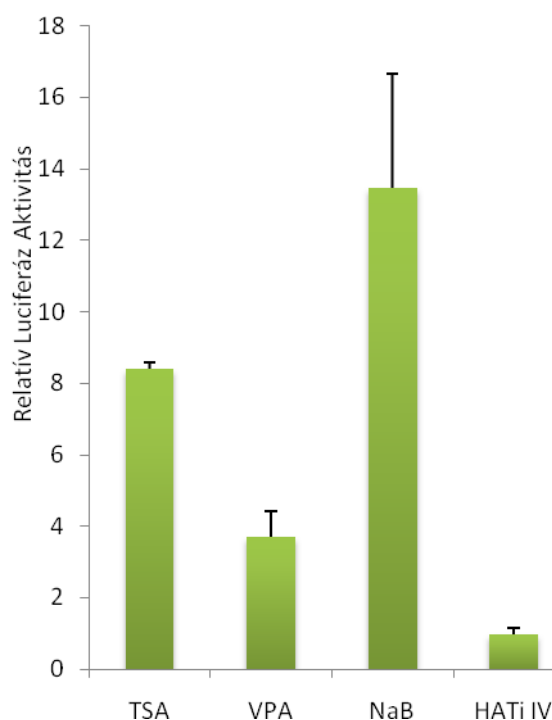
Az SF-1 a transzfekciót követően a citoplazmában transzlálódik, viszont hordoz egy sejtmagi lokalizációs szignált is, ami a fehérjét a nukleuszba irányítja. A vártnak megfelelően a kezeletlen sejtekben a fehérje mind a sejtmagban, mint a citoplazmában jelen volt. TSA kezelést követően megfigyelhető, hogy az SF-1 a sejtmagban lokalizálódik, ezzel ellentétben HATi IV kezelést követően pedig az SF-1 csak a citoplazmában volt detektálható.

A kísérlet eredménye mind HeLa, mind U2Os sejtek esetén megegyezett. Mivel két különböző sejtben belüli környezetben is ugyanazt a hatást kaptuk, következtethetünk arra, hogy a kezelések után megfigyelt változás az SF-1 fehérje tulajdonságából adódik, nem a sejtvonalként eltérő specifikus faktorok jelenlététől. Mivel a sejtmagi receptorok aktivált állapotban a sejtmagban találhatóak és a TSA kezelést követően szinte kizárólag a sejtmagban volt jelen a fehérje, arra következtethetünk, hogy az acetiláció szerepet játszik az SF-1 aktiválásában, és így a szteroid szintézis szabályozásában is. A HATi IV kezelés során a GCN5 aktivitása gátolva volt, az SF-1 kizárólag a citoplazmában volt jelen.

8.3. Az acetiláció szerepének vizsgálata a *Cyp11a1* gén promóterének működésében

A hisztonok acetilációja fontos szerepet játszik a kromatin szerkezetének befolyásolásában, így hatással van specifikus gének expressziójára. Munkánk során célunk volt vizsgálni, hogy a *Cyp11a1* gén promóterének működését hogyan befolyásolja az acetiláció mértéke. Ennek érdekében a *Cyp11a1* promóterét tartalmazó luciferáz riporter gént tartalmazó vektort HeLa sejtekbe transzfektáltuk, majd a sejteket kezeltük HDAC inhibitorokkal (30 mM TSA, 1 mM VPA, 1 mM NaB) és 80 μ M HATi IV hiszton acetiltranszferáz inhibitorral. Az alkalmazott HDAC inhibitorok koncentrációit irodalmi eredmények alapján határoztuk meg (Wei-Yi Chen és mts., 2007). A kezelések után 24 órával a sejtekben mértük a luciferáz riporter gén aktivitását. A mért enzimaktivitásokat a minták fehérjetartalmával korrigáltuk és a kezeletlen sejtek esetén mért értékekre normalizáltuk. A kísérletet kétszer ismételtük, az eredményekből számolt átlagot és szórást a **8. ábra** mutatja.

A kísérlet során azt tapasztaltuk, hogy az HDAC inhibitorok hatására a mért promóteraktivitás jelentősen megemelkedett. A HATi IV kezelés során a mért enzimaktivitás nem tért el jelentősen a kezeletlen minták esetén mért aktivitástól.



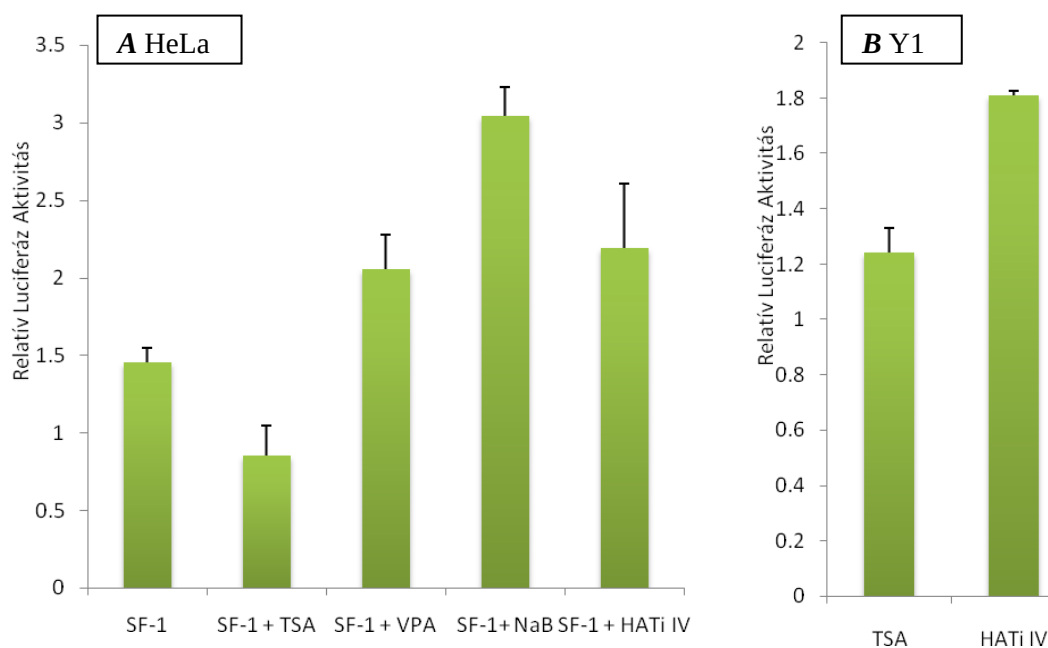
8. ábra A 30 mM TSA, 1 mM VPA és 1 mM NaB inhibitor kezelések hatására a mért luciferáz aktivitás jelentősen megemelkedett a kezeletlen mintánál mért aktivitáshoz képest. A HATi IV kezelés nem módosította a promóter aktivitását.

8.4. HDAC inhibitor és HATi IV kezelések hatása az SF-1 transzaktivációs képességére

Az acetiláció képes befolyásolni a transzkripciós faktorok transzaktivációs képességét is. Munkánk során vizsgáltuk, hogyan változik az SF-1 transzaktiváló képessége a különböző kezelések során. A kísérlet során HeLa sejteket kotranszfektáltunk az SF-1-et termelő és a *Cyp11a1* promóter szekvenciáját tartalmazó riportervektorral. A kotranszfekció során mindkét vektorból 1 µg DNS-t juttatunk a sejtekbe. A transzfekció után 24 órával a sejteket kezeltük HDAC inhibitorokkal (30 mM TSA, 1 mM VPA, 1 mM NaB) és 80 µM HATi IV hiszton acetil-transzferáz inhibitorral. A kísérlet során az egyes kezelésekhez készítettünk kontrollméréseket is. Ezekben a mintákban a riporter vektorral együtt üres pH624 vektor volt kotranszfektálva a sejtekbe. A transzfektálás után 24 órával a sejteket HDAC inhibitorokkal és HATi IV-gyel kezeltük. A kezeléseket követően

24 óra múlva mértük a luciferáz enzim aktivitását. A relatív luciferáz aktivitást úgy számoltuk, hogy az SF-1-gyel kotranszfektált, kezelt mintáknál mért értékeket, az SF-1-et nem tartalmazó, kezelt kontroll mintáknál mért aktivitásokra normalizáltuk, így meg tudtuk határozni, hogy a kezelések hogyan befolyásolták a transzfektált SF-1 működését. A kísérletet kétszer ismételtük, az eredményekből átlagot és szórást számoltunk. (9/A. ábra).

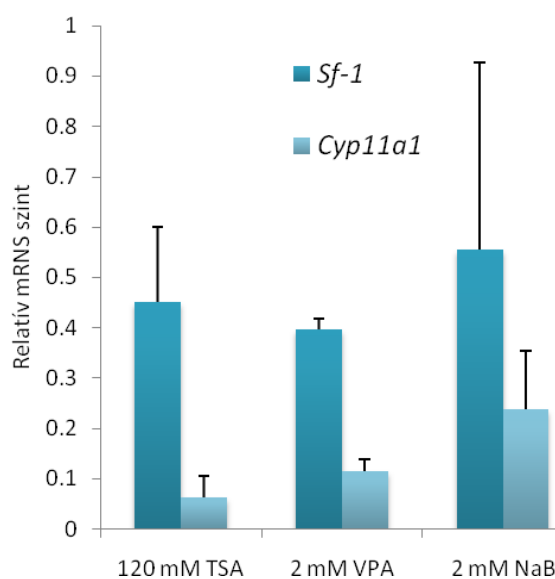
A kísérletet megismételtük Y1 sejtvonalonban is. Mivel ebben a sejtvonalon expresszálódik az SF-1, a transzfektálások során nem kotranszfektáltunk az SF-1-et expresszáló vektorral, csak a *Cyp11a1* promóterét tartalmazó riporter vektort jutattuk be a sejtekbe. A transzfektáció után a sejteket kezeltük 30 mM TSA-val és 80 μ M HATi IV-gyel, majd 24 óra múlva mértük a luciferáz aktivitást. Ebben a kísérletben a kezeletlen minták esetén mért aktivitásra normalizáltunk. A kísérletet kétszer ismételtük meg. A kapott eredményekből számolt átlagot és szórást a 9/B. ábra mutatja.



9. ábra A, Az SF-1 transzaktivációs képessége a különböző kezelések segítségével befolyásolható. HeLa sejtekben HDAC inhibitorok (VPA és NaB) és HATi IV jelenlétében megnő, TSA kezelést követően nem változik jelentősen a mért aktivitás. **B,** Y1 sejtekben a TSA kezelés nem befolyásolja jelentősen, a HATi IV kezelés megemeli a *Cyp11a1* gén promóterének aktivitását.

HeLa sejtekben a mért luciferáz aktivitás magasabb volt, ahol az SF-1 is kotranszfektálva volt, mint azokban a sejtekben ahol a *Cyp11a1* riporter vektor mellett üres pHC624 vektor volt bejuttatva a sejtekbe, tehát az SF-1 részt vesz a riporter vektorba épített promóter szabályozásában. Amikor a kotranszfektálás után a sejteket VPA-val és NaB-tal kezeltük, a mért aktivitás megemelkedett a kezeletlen mintákhoz képest. Érdekes, hogy az HDAC inhibitor TSA hatására a mért aktivitás nem változott jelentősen, míg a HATi IV hiszton acetiltranszferáz inhibitor jelenlétében a mért aktivitás megemelkedett a kezeletlen mintákhoz képest. Y1 sejtekben a mért aktivitás hasonló dinamikát mutat, mint a kotranszfektált HeLa sejtekben: TSA kezelést követően a mért luciferáz aktivitás nem tér el jelentősen a kezeletlen minták esetén mért értékektől, viszont a HATi IV kezelés megemelte a mért aktivitást.

8.5. Az HDAC inhibitorok hatása a *Cyp11a1* és *Sf-1* gének expressziójára Y1 sejtekben



10. ábra Az *Sf-1* és *Cyp11a1* génekről képződő mRNS szintje HDAC inhibitor kezelések hatására. A kezelések során az *Sf-1* és a *Cyp11a1* gének expressziója is lecsökken a kezeletlen sejtekben mért értékekhez képest.

Munkánk során vizsgáltuk, hogy az alkalmazott HDAC inhibitor kezelések során hogyan változik magának az SF-1-nek és célgénjének a *Cyp11a1*-nek az expressziója. A kísérlethez Y1 sejtvonalat használtunk, ahol az *Sf-1* és *Cyp11a1* gének kifejeződnek. A sejteket 120 mM TSA-val, 2 mM VPA-val és 2 mM NaB-al kezeltük 24 óráig, majd a sejtekből RNS-t izoláltunk. A kapott RNS mintákból 2 µg-ot átírtunk reverz transzkripcióval cDNS-re. Az *Sf-1* és *Cyp11a1* génekről átíródó mRNS mennyiségét, specifikus expressziós primereket használva, real-time PCR segítségével kvantifikáltuk. A relatív mRNS-szintet a kapott Ct értékekből $\Delta\Delta C_t$ analízissel határoztuk meg. A kísérletet kétszer ismételtük meg, majd a kapott értékeket átlagoltuk és szórást számoltunk (10. ábra).

A kísérlet során azt tapasztaltuk, hogy az HDAC inhibitor kezelések hatására mind a *Cyp11a1*, mind az *Sf-1* génről átíródó mRNS mennyisége lecsökken a kezeletlen, kontroll mintákhoz képest.

9. Összefoglalás

Laborunkban végzett korábbi kísérletekből azt feltételezzük, hogy az ATAC hiszton acetil transzferáz komplexnek szerepe lehet a szteroid hormonok bioszintézisében. Ennek következtében, munkánk során fő célunk volt vizsgálni, hogy milyen hatása van az acetilációnak a szteroid konverzió egyik fő szabályozó faktorának, az SF-1-nek a működésére. Ennek kivitelezésére létrehoztunk egy FLAG-peptiddel fuzionált SF-1 fehérjét expresszáló vektort és egy olyan riporter konstrukciót, ahol a luciferáz riporter gén elé a *Cyp11a1* gén promóter szekvenciáját építettük be. Kísérleteink során optimalizáltuk a HATi IV sejtenyészeteken történő alkalmazását. Megállapítottuk, hogy HeLa és U2Os sejtekben a transzfektált SF-1 fehérje sejten belüli elhelyezkedése különböző kezelésekkel módosítható. TSA kezelés hatására, amikor a sejtekben a hiszton deacetiláz enzimek működése gátolva van, az SF-1 a sejtmagban lokalizálódott, míg HATi IV - GCN5 acetil-transzferáz inhibitor — kezelés hatására a fehérje csak a citoplazmában volt jelen. Korábban már kimutatták, hogy a GCN5 és az SF-1 fehérjék kölcsönható partnerek, és *in vitro* a GCN5 képes acetilálni az SF-1-et (Anne. L. Jacob és mts., 2001). A GCN5 több hiszton acetil-transzferáz komplexnek alegysége, köztük a csoportunkban részletesen kutatott ATAC HAT komplexnek is. Mivel TSA kezelést követően az SF-1 a sejtmagban lokalizálódott, feltételezhetjük, hogy az acetiláció hatására aktiválódik az SF-1 sejtmagi receptor funkciója.

Munkánk során vizsgáltuk a *Cyp11a1* gén promóterének működését különböző kezelések hatására. Ennek érdekében HeLa sejtekbe transzfektáltuk a *Cyp11a1* gén promóterét tartalmazó riporter vektort, majd a sejteket HDAC inhibitorokkal (TSA, VPA, NaB) és HATi IV-gyel kezeltük. Azt az eredményt kaptuk, hogy a HDAC inhibitoroként működő TSA, VPA és NaB is lényegesen megemelte a promóter aktivitását a kezeletlen mintákhoz képest, míg a HATi IV kezelés nem változtatta jelentősen. Utóbbiból arra következtethetünk, hogy a GCN5 acetil-transzferázt tartalmazó komplexek – mint az ATAC komplex – feltehetőleg nem játszanak jelentős szerepet közvetlenül a promóter szabályozásában.

Annak érdekében, hogy vizsgáljuk, az SF-1 transzaktivációs képessége függ-e az acetiláció mértékétől, HeLa sejteket kotranszfektáltunk a *Cyp11a1* promóter régióját tartalmazó riporter vektorral és az SF-1-et expresszáló vektorral, majd különböző HDAC inhibitorokkal (TSA, VPA, NaB) és HATi IV-gyel kezeltük a sejteket. Azt az eredményt

kaptuk, hogy a túltermeltetett SF-1 megemelte a *Cyp11a1* gén promóter aktivitását, tehát az SF-1 transzkripció faktoraként valóban részt vesz a beépített szekvencia szabályozásában. A II típusú HDAC enzimeket gátló VPA és NaB kezelést követően a promóter aktivitása tovább emelkedett, míg az I és II típusú HDAC enzimek gátlását végző TSA kezelés nem változtatta meg jelentősen az SF-1 transzaktivációs képességét. Azt tapasztaltuk, hogy a HATi IV kezelés szintén tovább emelte a *Cyp11a1* gén promóterének aktivitását. Y1 sejtekben mivel jelen van az endogén SF-1 fehérje, itt nem transzfektáltuk az SF-1-et expresszáló vektort, csak a *Cyp11a1* gén promóterét tartalmazó riporter vektort. A kezelések eredménye ebben az esetben is ugyanaz volt, mint amit a HeLa sejtek esetében tapasztaltunk: a TSA kezelés nem befolyásolta a promóter működését, míg a HATi IV kezelés megemelte az aktivitást. A HDAC inhibitorok hatása promóterenként eltérő lehet (Wei-Yi Chen és mts., 2007). Azt feltételezzük, hogy az acetiláció aktiválja az SF-1 transzaktiváló képességét, viszont lehetséges, hogy TSA kezelés során egy olyan faktor működését is befolyásoltuk, ami acetilálódva represszálja a *Cyp11a1* promóter működését. A HATi IV kezelés során tapasztalt aktivitásemelkedés következhet abból, hogy egy endogén, szabályozó faktor a kezelés során aktiválódott, így megemelte a mért luciferáz aktivitást.

A kísérletek során real-time PCR-rel vizsgáltuk, hogy a HDAC inhibitorok jelenlétében hogyan változik az *Sf-1* és a *Cyp11a1* gének expressziója a kezeletlen mintákhoz képest. Azt az eredményt kaptuk, hogy a kezelések hatására az *Sf-1* és a *Cyp11a1* génekről átíródó mRNS-ek mennyisége kevesebb volt. Az eredmény magyarázza azt a megfigyelést, hogy miért csökken a HDAC inhibitorokkal kezelt betegekben a szteroid hormonok szintje (Gregoraszcuk és mts., 2000). Az mRNS szint következhet abból, hogy valószínűleg az SF-1 fehérje HDAC inhibitorok hatására ubikvitinálódik, majd degradálódik, ezáltal nem képes a *Cyp11a1* mRNS átíródását indukálni (Wei-Yi Chen és mts., 2007).

További célunk közé tartozik, hogy vizsgáljuk az *Sf-1* és *Cyp11a1* gének expressziójának változását különböző ideig tartó HDAC inhibitor kezelések hatására, hogy tisztázzuk, miért csökken az általunk vizsgált géneknek az expresziója ilyen körülmények között. Ezen kívül célul tűztük ki, hogy részletesebben vizsgáljuk, az ATAC komplex milyen szerepet játszik ezeknek a géneknek a szabályozásában. Ennek érdekében siRNS segítségével szeretnénk csendesíteni a különböző ATAC-specifikus alegységek expresszióját, és vizsgálni, hogy ilyen körülmények között hogyan változik a szteroid konverzió működése.

10. Felhasznált irodalom és hivatkozások

ALTINCICEK, B., TENBAUM, S.P., DRESSEL, U., THORMEYER, D., RENKAWITZ, R., BANIAHMAD, A., Interaction of the corepressor Alien with DAX-1 is abrogated by mutations f AX-1 involved in adrenal hypoplasia congenita. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 7662–7667.

ANNE L. JACOB, JOHAN LUND, PEDRO MARTINEZ AND LARS HEDIN
Acetylation of Steroidogenic Factor 1 Protein Regulates Its Transcriptional Activity and Recruits the Coactivator GCN5 (2001) *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 37659-37664.

BALASUBRAMANYAM, K., M. ALTAF, R. A. VARIER, V. SWAMINATHAN, A. RAVINDRAN, P. P. SADHALE, AND T. K. KUNDU. Polyisoprenylated benzophenone, garcinol, a natural histone acetyltransferase inhibitor, represses chromatin transcription and alters global gene expression. (2004) *J. Biol. Chem.* 279:33716

BALASUBRAMANYAM, K., V. SWAMINATHAN, A. RANGANATHAN, AND T. K. KUNDU. Small molecule modulators of histone acetyltransferase p300. (2003) *J. Biol. Chem.* 278:19134-40.

BOLDEN JE, PEART MJ, JOHNSTONE RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. (2006) *Nat Rev. Drug. Discov.* 5:769–784. [PubMed: 16955068]

BROWN RC, CASCIO C, PAPADOPOULOS V. Pathways of neurosteroid biosynthesis in cell lines from human brain: regulation of dehydroepiandrosterone formation by oxidative stress and beta-amyloid peptide. (2000) *J. Neurochem.* 74:847–859. [PubMed: 10646538]

CARLONE, D.L., RICHARDS, J.S. Evidence that functional interactions of CREB and SF-1 mediate hormone regulated expression of the aromatase gene in granulosa cells and constitutive expression in R2C cells. (1997) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 61, 223–231.

CARON, K.M., IKEDA, Y., SOO, S.C., STOCCO, D.M., PARKER, K.L., CLARK, B.J., Characterization of the promoter region of the mouse gene encoding the steroidogenic acute regulatory protein. (1997) *Mol. Endocrinol.* 11, 138–147.

CHEN, W.Y., JUAN, L.J., CHUNG, B.C. SF-1 (nuclear receptor 5A1) activity is activated by cyclic AMP via p300-mediated recruitment to active foci, acetylation, and increased DNA binding. (2005) *Mol. Cell Biol.* 25, 10442–10453.

CHENGUANG WANG, LIFENG TIAN, VLADIMIR M. POPOV, RICHARD G. PESTELL J STEROID BIOCHEM Acetylation and Nuclear Receptor Action (2012) *J Steroid Biochem Mol Biol.* 123(3-5): 91–100.

CHIMENTI F, BIZZARRI B, MACCIONI E, SECCI D, BOLASCO A, CHIMENTI P, FIORAVANTI R, GRANESE A, CARRADORI S, TOSI F, BALLARIO P, VERNARECCI S, FILETICI P. A novel histone acetyltransferase inhibitor modulating Gcn5 network: cyclopentylidene-[4-(4'-chlorophenyl)thiazol-2-yl]hydrazone. (2009) *J. Med. Chem.* Jan 22;52(2):530-6.

DANIEL B. MARTINEZ-ARGUELLES AND VASSILIOS PAPADOPOULOS Epigenetic regulation of the expression of genes involved in steroid hormone biosynthesis and action (2010) *Steroids.* 2010 July; 75(7): 467–476.

DAMMER, E.B., LEON, A., SEWER, M.B. Coregulator exchange and sphingosinesensitive cooperativity of steroidogenic factor-1, general control nonderepressed 5, p54, and p160 coactivators regulate cyclic adenosine 3,5-monophosphate-dependent cytochrome P450c17 transcription rate. (2007) *Mol. Endocrinol.* 21, 415–438.

DE SANTA BARBARA, P., BONNEAUD, N., BOIZET, B., DESCLOZEAUX, M., MONIOT, B., SUDBECK, P., SCHERER, G., POULAT, F., BERTA, P. Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene. (1998) *Mol. Cell. Biol.* 18, 6653–6665.

DE SANTA BARBARA, P., MEJEAN, C., MONIOT, B., MALCLES, M.H., BERTA, P., BOIZET- ONHOURE, B. Steroidogenic factor-1 contributes to the cyclic-adenosine monophosphate down-regulation of human SRY gene expression. (2001) *Biol. Reprod.* 64, 775–783.

DESCLOZEAUX, M., KRYLOVA, I.N., HORN, F., FLETTERICK, R.J., INGRAHAM, H.A., Phosphorylation and intramolecular stabilization of the ligand binding domain in the nuclear receptor steroidogenic factor 1. (2002) *Mol. Cell. Biol.* 22, 7193–7203.

ERLING A. HOIVIK, AURÉLIA E. LEWIS, LINDA AUMO, MARIT BAKKE
Molecular aspects of steroidogenic factor 1 (SF-1) (2010) *Molecular and Cellular Endocrinology Volume 315, Issues 1–2*

GALLO-PAYET, N., PAYET, M.D. Mechanism of action of ACTH: beyond cAMP. (2003) *Microsc. Res. Tech.* 61, 275–287.

GREGORASZCZUK E, WOJTOWICZ AK, TAUBOLL E, ROPSTAD E. Valproate-induced alterations in testosterone, estradiol and progesterone secretion from porcine follicular cells isolated from small and medium-sized ovarian follicles. (2000) *Seizure* 9:480–485. [PubMed: 11034872]

GUO, I.C., SHIH, M.C., LAN, H.C., HSU, N.C., HU, M.C., CHUNG, B.C., Transcriptional regulation of human CYP11A1 in gonads and adrenals. (2007) *J. Biomed. Sci.*.

HAMMER, G.D., KRYLOVA, I., ZHANG, Y., DARIMONT, B.D., SIMPSON, K., WEIGEL, N.L., INGRAHAM, H.A. Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: integration of hormone signaling in reproduction and stress. (1999) *Mol. Cell* 3, 521–526.

HOLLY A. LAVOIE AND STEVEN R. KING Transcriptional Regulation of Steroidogenic Genes: STARD1, CYP11A1 and HSD3B (2009) *Experimental Biology and Medicine* 2009, 234:880-907.

ITO, M., YU, R., JAMESON, J.L. DAX-1 inhibits SF-1-mediated transactivation via a carboxy-terminal domain that is deleted in adrenal hypoplasia congenita. (1997) *Mol. Cell Biol.* 17, 1476–1483.

JENUWEIN T. Re-SET-ting heterochromatin by histone methyltransferases. (2001) *Trends Cell Biol* 11:266–273. [PubMed: 11356363]

KANG HC, HU Q, LIU XY, XU F, LI X, LIU ZG, ZENG Z, WANG M, ZHU SQ. ZHONGHUA YI XUE ZA ZHI. Efficacy and safety of the combined therapy of valproic acid and lamotrigine for epileptics (2012) May 8;92(17):1174-8. *Chinese*. PMID: 22883004 [PubMed - in process]

KAYES-WANDOVER KM, WHITE PC. Steroidogenic enzyme gene expression in the human heart. (2000) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85:2519–2525. [PubMed: 10902803]

KELLY, S.N., MCKENNA, T.J., YOUNG, L.S. Coregulatory protein-orphan nuclear receptor interactions in the human adrenal cortex. (2005) *J. Endocrinol.* 186, 33–42.

KIM, J.W., HAVELOCK, J.C., CARR, B.R., ATTIA, G.R. The orphan nuclear receptor, liver receptor homolog-1, regulates cholesterol side-chain cleavage cytochrome p450 enzyme in human granulosa cells. (2005) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 1678–1685.

KRYLOVA, I.N., SABLIN, E.P., MOORE, J., XU, R.X., WAITT, G.M., MACKAY, J.A., JUZUMIENE, D., BYNUM, J.M., MADAUSS, K., MONTANA, V., LEBEDEVA, L., SUZAWA, M., WILLIAMS, J.D., WILLIAMS, S.P., GUY, R.K., THORNTON, J.W., FLETTERICK, R.J., WILLSON, T.M., INGRAHAM, H.A. Structural analyses reveal phosphatidyl inositols as ligands for the NR5 orphan receptors SF-1 and LRH-1. (2005) *Cell* 120, 343–355.

LUO, X., IKEDA, Y., PARKER, K.L. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. (1994) *Cell* 77, 481–490.

MAJDIC, G., YOUNG, M., GOMEZ-SANCHEZ, E., ANDERSON, P., SZCZEPANIAK, L.S., DOBBINS, R.L., MCGARRY, J.D., PARKER, K.L. Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. (2002) *Endocrinology* 143, 607–614.

MASCARO, C., NADAL, A., HEGARDT, F.G., MARRERO, P.F., HARO, D. Contribution of steroidogenic factor 1 to the regulation of cholesterol synthesis. (2000) *Biochem. J.* 350 (Pt 3), 785–790.

MELLGREN, G., BORUD, B., HOANG, T., YRI, O.E., FLADEBY, C., LIEN, E.A., LUND, J. Characterization of receptor-interacting protein RIP140 in the regulation of SF-1 responsive target genes. (2003) *Mol. Cell Endocrinol.* 203, 91–103.

OHNO, C.K., PETKOVICH, M. FTZ-F1 beta, a novel member of the Drosophila nuclear receptor family. (1993) *Mech. Dev.* 40, 13–24.

PARKER, K.L., SCHIMMER, B.P. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. (1997) *Endocr. Rev.* 18, 361–377.

PARKER, K.L., ET AL. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. (1999) *Cell* 97, 161–163. ONE MB, FAN J, PAPADOPOULOS V. Cholesterol transport in steroid biosynthesis: Role of proteinprotein interactions and implications in disease states. (2009) *Biochim Biophys Acta*;1791:646–658. [PubMed: 19286473]

SADOVSKY, Y., CRAWFORD, P.A., WOODSON, K.G., POLISH, J.A., CLEMENTS, M.A., TOURTELLOTT, L.M., SIMBURGER, K., MILBRANDT, J. Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 sidechain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 10939–10943.

SAITO, S., ITO, K., SUZUKI, T., UTSUNOMIYA, H., AKAHIRA, J., SUGIHASHI, Y., NIIKURA, H., OKAMURA, K., YAEHASHI, N., SASANO, H. Orphan nuclear receptor DAX-1 in human endometrium and its disorders. (2005) *Cancer Sci.* 96, 645–652.

SEWER, M.B., WATERMAN, M.R. Adrenocorticotropin/cyclic adenosine 3,5-monophosphate-mediated transcription of the human CYP17 gene in the adrenal cortex is dependent on phosphatase activity. (2002) *Endocrinology* 143, 1769–1777.

SEWER, M.B., WATERMAN, M.R.. ACTH modulation of transcription factors responsible for steroid hydroxylase gene expression in the adrenal cortex. (2003) *Microsc. Res. Tech.* 61, 300–307.

SHIIO Y, EISENMAN RN. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A*;100:13225–13230. [PubMed: 14578449]

SHILATIFARD A. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. (2006) *Annu Rev Biochem*;75:243–269. [PubMed: 16756492]

SHINODA, K., LEI, H., YOSHII, H., NOMURA, M., NAGANO, M., SHIBA, H., SASAKI, H., OSAWA, Y., NINOMIYA, Y., NIWA, O., ET AL. Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the Ftz-F1 disrupted mice. (1995) *Dev. Dyn.* 204, 22–29.

SUZUKI, T., KASAHARA, M., YOSHIOKA, H., MOROHASHI, K., UMESONO, K. LXXLL related motifs in Dax-1 have target specificity for the orphan nuclear receptors Ad4BP/SF-1 and LRH-1. (2003) *Mol. Cell Biol.* 23, 238–249.

UEDA, H., HIROSE, S. Defining the sequence recognized with BmFTZ-F1, a sequence specific DNA binding factor in the silkworm, *Bombyx mori*, as revealed by direct sequencing of bound oligonucleotides and gel mobility shift competition analysis. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19, 3689–3693.

WADE PA, PRUSS D, WOLFFE AP. Histone acetylation: chromatin in action. (1997) *Trends Biochem Sci*;22:128–132. [PubMed: 9149532]

WANG, W., ZHANG, C., MARIMUTHU, A., KRUPKA, H.I., TABRIZIZAD, M., SHELLOE, R., MEHRA, U., ENG, K., NGUYEN, H., SETTACHATGUL, C., POWELL, B., MILBURN, M.V., WEST, B.L. The crystal structures of human steroidogenic factor-1 and liver receptor homologue-1. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 7505–7510.

WEI-YI CHEN, JUI-HSIA WENG, CHEN-CHE HUANG, BON-CHU CHUNG. Histone Deacetylase Inhibitors Reduce Steroidogenesis through SCF-Mediated Ubiquitination and Degradation of Steroidogenic Factor 1 (NR5A1) (2007) *Mol Cell Biol.* 2007 October; 27(20): 7284–7290.

WINNAY, J.N., HAMMER, G.D. Adrenocorticotrophic hormone-mediated signaling cascades coordinate a cyclic pattern of steroidogenic factor 1-dependent transcriptional activation. (2006) *Mol. Endocrinol.* 20, 147–166.

YANG, W.H., HEATON, J.H., BREVIG, H., MUKHERJEE, S., INIGUEZ-LLUHI, J.A., HAMMER, G.D. SUMOylation inhibits SF-1 activity by reducing CDK7-mediated serine 203 phosphorylation. (2009) *Mol. Cell Biol.* 29, 613–625.

YU, R.N., ITO, M., JAMESON, J.L. The murine Dax-1 promoter is stimulated by SF-1 (steroidogenic factor-1) and inhibited by COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor) via a composite nuclear receptor-regulatory element. (1998) *Mol. Endocrinol.* 12, 1010–1022.

YU, C.C., LI, P.H. In vivo inhibition of steroidogenic acute regulatory protein expression by dexamethasone parallels induction of the negative transcription factor DAX-1. (2006) *Endocrine* 30, 313–324.

ZHOU, D., QUACH, K.M., YANG, C., LEE, S.Y., POHAJDAK, B., CHEN, S. PNRC: a proline-rich nuclear receptor coregulatory protein that modulates transcriptional activation of multiple nuclear receptors including orphan receptors SF1 (steroidogenic factor 1) and ERRalpha1 (estrogen related receptor alpha-1). (2000) *Mol. Endocrinol.* 14, 986–998

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondok témavezetőimnek, **Borsos Barbarának** és **Prof. Dr. Boros Imrének**, akik hasznos szakmai tanácsokkal, segítőkész támogatásukkal hozzájárultak eredményes kísérleti munkámhoz és a dolgozatom elkészítéséhez.

Köszönettel tartozom **Huliák Ildikónak** értékes szakmai tanácsaiért és állandó segítőkészségéért.

Megköszönöm **Pataki Edinának** segítőkészségét, akihez bátran fordulhattam kérésemmel, amikor munkám folyamán valamire szükségem volt.

Külön szeretném megköszönni **Ökrösné Katalinnak** a sejtenyészetek fenntartásában nyújtott segítségét és tanácsait, melyekkel nagyban hozzájárult munkám előrehaladásához.

12. Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

Alulírott **Kovács Dávid, Biológus MSc** szakos hallgató, a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- Agaróz gélelektroforézis
- Baktérium transzformáció
- DNS visszaizolálása agaróz gélből
- Plazmid DNS tisztítás baktérium sejtekből
- Plazmid DNS tisztítás *Midiprep Qiagen Kittel*
- Emlős sejtvonalak fenntartása és transzfektálása
- Emlős sejtek kezelése HDAC inhibitorokkal és HATi IV-el
- Luciferáz aktivitás mérés
- Western blot analízis
- Immuncitokémia
- Real-time PCR
- RNS izolálás Y1 sejtekből és reverz transzkripció

végeztem el.

.....

aláírás

Szeged, 2012 november 2.