

A WFS1 gén polimorf miRNS kötőhelyének funkcionális vizsgálata

Elek Zsuzsanna ELTE TTK V. – Brauswetter Diána SE ÁOK V.
el.zsuzsa@gmail.com; bdius@freemail.hu

Bevezetés: A mikro-RNS-ek (miRNS) olyan 20-22 bázis hosszú nukleinsavak, melyek döntően hozzájárulnak a fehérjeszintézis szabályozásához: a mRNS 3' UTR régiójához kapcsolódva legtöbb esetben gátolják a transzlációt. Kötőhelyükben számos esetben polimorfizmusok helyezkednek el (miR SNP), melyek a miRNS-mRNS kölcsönhatás megváltoztatása révén hatással lehetnek a képződő fehérje mennyiségére. A legtöbb miRNS célpontját azonban még csupán in silico technikákkal feltételezik, de kísérletesen nem bizonyították. Laboratóriumunk közelmúltban végzett kutatása asszociációt mutatott ki a WFS1 gén rs1046322 A/G miR SNP-je valamint az impulzivitás jelleg között, ennek alapján célul tűztük ki ezen polimorf miRNS-kötőhely funkcionális elemzését in vitro rendszerben.

Módszerek: A WFS1 gén 3' UTR régióját luciferáz repórter gén mögé klónoztuk. A különböző allélvariánsokat valamint a kontrollként használt, elrontott felismerő hellyel rendelkező ún. seed mutáns Quick Change irányított mutagenézissel hoztuk létre. A megfelelő konstrukciókkal illetve miRNS 668-cal HEK293 sejteket transzfektáltunk, és meghatároztuk a képződött luciferáz mennyiségét. A miRNS 668 hatásmechanizmusát a transzkripció gátló actinomycin-D alkalmazásával elemeztük.

Eredmények: A kidolgozott sejt rendszerrel végzett kísérleteink alátámasztották az in silico szekvencia-analízis eredményét. Igazoltuk, hogy a miRNS 668 kötődik a WFS1 gén 3' UTR régiójához, és befolyásolja a képződő fehérje mennyiségét. Kimutattuk továbbá, hogy az rs1046322 A/G polimorfizmus moduláló hatást gyakorol a miRNS 668 bekötődésére: a tökéletes kötőhelyet létrehozó G allél esetében az in vitro rendszerben szignifikánsan alacsonyabb luciferáz szint mérhető. A miRNS 668 hatásmechanizmusát elemző előkísérletek alapján feltételezhető, hogy a szabályozás részben a WFS1 mRNS stabilitásának befolyásolása révén valósul meg.

Következtetések: Régóta ismert a WFS1 gén mutációinak szerepe a monogénesen öröklődő Wolfram-szindróma (diabetes insipidus, diabetes mellitus, optikus atrófia, süket-ség) kialakításában. Újabb vizsgálatok alapján ugyanakkor a gén SNP-i komplex öröklődésű kórképek rizikófaktoraként is azonosíthatók. Ezek közé tartozik a 3' UTR-ben elhelyezkedő rs1046322 A/G SNP, mely kísérleteink alapján feltételezhetően a miRNS 668 bekötődésének megváltoztatása révén fejti ki biológiai hatását.

Elek. Zs, Brauswetter D, Kovács-Nagy R, Nagy G, Székely, Á, Somogyi A, Rónai Zs, Sasvári-Székely M. Mikro-RNS-kötőhelyek genetikai variabilitása és a diabetes mellitus. Magyar Belorvosi Archivum 2010;63(2):99-103

Ez a közlemény a jelenlegi munkánk kiinduló pontjaként szolgáló asszociáció eredményeket tartalmazza, amit in silico és open array módszerekkel sikerült kimutatnunk.

Témavezető(k): Dr. Rónai Zsolt egyetemi adjunktus, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet és Dr. Sasvári Mária DSc egyetemi tanár, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet

ADAMTS13 gén genetikai polimorfizmus vizsgálata haplotipizáló technikával

Szentiványi Dorottya SE ÁOK IV.
dorkusz@gmail.com

A humán von Willebrand-faktort (vWF) hasító proteáz (ADAMTS13) működése során a vWF-multimereket hasítja érett struktúrájú formákra. Amennyiben ez nem megy végbe megfelelően, a vWF-multimerek kitapadnak az endothel-sejtek felszínére, amely a thrombocyták folyamatos aktiválódását, aggregálódását és elfogyását eredményezi, ami klinikailag a trombotikus thrombocytopeniás purpura (TTP) megjelenésével jár. A csökkent ADAMTS13 enzimaktivitás multifaktoriális betegségekre, úgymint a HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets) szindrómában vagy a krónikus szívelégtelenségben (CHF), szintén jellemző, kialakulásukban szerepet játszhat. Az ADAMTS13 gyakori genetikai polimorfizmusai okozhatják a multifaktoriális betegségeknél tapasztalható enzimaktivitás csökkenést. Az ADAMTS13 több SNP-jét (single nucleotide polymorphism) haplotipizáltuk azzal a céllal, hogy az SNP-k és a proteolitikus aktivitás kapcsolatát feltárjuk.

A publikus SNP adatbázisok eredményeit egyesítettük és in silico kapcsoltsági térképet készítettünk. A kapcsoltsági térkép alapján 112 egészséges, magyar alany ADAMTS13 génjére kétirányú allél-specifikus amplifikációt (ASA) és restriktions fragmentum hossz analízist (RFLP) állítottunk be. Az ADAMTS13 enzim aktivitást a FRET-S-VWF73 fluorogénikus szubsztáttal határoztuk meg a gyári protokoll apróbb módosításai mellett.

Az in silico vizsgálat szerint az ADAMTS13 gén három, átfedő kapcsoltsági csoportot tartalmaz kaukázusiakban. A kétirányú ASA-RFLP alapú haplotipizálás nagyobb optimalizációs erőfeszítéseket igényelt, mint a genotipizáló technikák, de alapvetően érzékenyebbnek és alkalmazhatónak bizonyult. A vizsgált SNP-k allélgyakorisága és a kapcsoltsági csoportok jelenléte nem tér el lényegesen az általános kaukázusi és a magyar populáció között, tehát az in silico nyert eredmények interpretálhatók a magyar populációra. Az rs2301612 számú SNP reprezentálja a középső kapcsoltsági csoportot. Az SNP genotípusai lineáris összefüggést mutattak enzim aktivitásokkal összevetve, az átlagos aktivitás $89 \pm 4,3$, $92 \pm 3,5$ és $105 \pm 4,5\%$ (SEM) a CC, CG és GG genotípus csoportokban ($p=0,029$ for trend).

Módszereinkkel a jövőben tanulmányozni szeretnénk a haplotípusok és az ADAMTS13 proteolitikus aktivitás közötti összefüggést, amivel a TTP és más multifaktoriális betegségek (HELLP szindróma és CHF) patogenezisének eddig ismeretlen aspektusait vizsgálhatjuk.

Gombos T, Mako V, Cervenak L, Papassotiriou J, Kunde J, Harsfalvi J, Forhecz Z, Pozsonyi Z, Borgulya G, Janoskuti L, Prohaszka Z: Levels of von Willebrand factor antigen and von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) activity predict clinical events in chronic heart failure. Thromb Haemost 2009; 102(3):573-80.

A cikk az ADAMTS13 enzimaktivitás szintek és a CHF súlyosságának összefüggéseit tárgyalja, nem tartalmaz genetikai adatokat.

Témavezető(k): Dr. Doleschall Márton tudományos munkatárs, SE-MTA, Gyulladásbiológiai és Immungenomikai Kutatócsoport és Dr. Prohaszka Zoltán tudományos főmunkatárs, III. Sz. Belgyógyászati Klinika