

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
BIOKÉMIAI ÉS MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI INTÉZET

Bálint Bálint László

Epigenetic Regulation of Hormon Response
A hormonválasz epigenetikai szabályozása

-Doktori értekezés tézisei-



DEBRECEN
2005

Témavezető:

Dr. Nagy László D.Sc.

A szigorlati bizottság elnöke:

Prof. Dr. Muszbek László akadémikus.

Vizsgáztatók:

Prof. Dr. Dombrádi Viktor

Dr. Váradi András

A védési bizottság elnöke:

Prof. Dr. Muszbek László akadémikus

Opponensek:

Prof. Dr. Roland Schule

Prof. Dr. Szabó Gábor

Tagok:

Dr. Váradi András

Prof. Viktor Dombrádi, D.Sc.

BEVEZETÉS

1. A magreceptorok által szabályozott transzkripció epigenetikai háttere

A magreceptorok ligandfüggő transzkripciós faktorok, zsíroldékony molekulák, hormonok és anyagcseretermékek szenzorai. Munkacsoportunk fő érdeklődési területét a magreceptoroknak azon alcsoportja képezi, mely heterodimert alkot az RXR molekulával, a 9 cisz retinsav receptorával. E magreceptorok kulcsszerepet játszanak a fejlődésben és különböző patofiziológiás állapotok kialakulásában, mint az ateroszklerózis és a diabétesz. Ezen magreceptorok közös jellemzője, hogy DNS kötött szenzorai az intra és extracelluláris lipideknek. A magreceptorok genomi szintre fordítják a sejt zsíroldékony környezetének változásait. Ezen jellegzetességük alapján nano-kapcsolókként értelmezhetjük őket, melyek megváltoztatják a kromatin állapotát, és genomi szkripteket indítanak be a sejt lipidkörnyezetében bekövetkezett változásokra adott válaszként.

A HL-60 sejtvonal egy kiterjedten vizsgált mieloid leukémia sejtvonal, mely fiziológiás és farmakológias behatásokra különböző irányokba differenciálódhat. A differenciáció során két különálló szakaszt különböztetünk meg. Az első egy átmeneti állapot vagy alapozási lépés, a második kései folyamatok sorozata, melyeknek vége a differenciációs útvonalbéli elköteleződés és a terminális differenciáció. E lépésre jellemző a magstruktúra átalakulása és néhány sejtciklusra kiterjedő fenotípus memória. Az alapozási lépés során lejátszódó molekuláris folyamatokról és ezek szerepéről a későbbi génexpresszió szabályozásában igen keveset tudunk.

A differenciációt meghatározó molekuláris mechanizmusokat részben a kromatin állapota határozza meg. A kromatin struktúra döntő szerepet játszik a génexpresszió szabályozásában, mivel meghatározza a transzkripciós faktorok hozzáférését a DNS-hez. Magát a kromatin szerkezetét két enzimes csoport határozza meg: egyrészt az ATP függő kromatin mintázó enzimek (remodelling), másrészt a kromatin módosító enzimek csoportja. Ez utóbbiak felelősek a hisztonvégek poszttranszlációs módosításáért. A „hiszton-kód“ elmélet szerint a hisztonvégeken létrejövő kovalens módosítások fenntartják és szabályozzák a génexpressziós mintázatokat. A kovalensen módosított hisztonvégekről korábban leírták, hogy chromo- és bromodomén tartalmú fehérjék kötőhelyei lehetnek. Feltételezések szerint

ezek a hisztonkötő fehérjék biztosítják a funkcionális kapcsolatot a módosított hisztonvégek és a transzkripció iniciáció effektorai között.

A kromatin immunprecipitációs technika segítségével (angolul: Chromatin immunoprecipitation: ChIP) *in vivo* fehérje-DNS kölcsönhatásokat vizsgálhatunk kromatin szinten. Adott fehérje elleni antitestek használatával a fehérje által kötött DNS darabok könyvtárát hozhatjuk létre és vizsgálhatjuk.

A HL-60 sejt differenciációja során létrejövő alapozási lépés molekuláris mechanizmusainak vizsgálata céljából elkészítettük a szöveti tranzglutamináz promóterének hisztonvég módosítási térképét. A szöveti tranzglutamináz expressziója ezen differenciáció során nagymértékben fokozódik. A promóter térképét három különböző állapotban vettük fel kiindulási állapotban, az alapozási lépés során, melyet egy rövid DMSO vagy D vitamin kezeléssel hoztunk létre, és differenciált állapotban, melyet az alapozásban résztvevő sejtek retinoid kezelésével hoztunk létre.

Az alapozás és a transzkripció során különálló kromatin szintű folyamatokat sikerült beazonosítanunk. Az alapozás nagymértékű oldallánc metilációs változásokat okoz. A H3 oldallánc K4 csoportjának metilációja csökken a promóteren, illetve a H4 oldallánc R3 csoportjának metilációja fokozódik az enhanszeren. A hiszton arginin metilációja különös jelentőségű az alapozási állapot létrehozásában, mivel farmakológiai gátlása magát az alapozást is megszüntette.

Vizsgálati eredményeink szerint a H4R3 és H3K4 metilációja modulálja a hormonális válaszkésztséget.

2. Teljes genomi lokalizációs analízis

Munkám második részeként vizsgálati rendszeremet kiterjesztettem egy zárt rendszerből (egyedi promóterek vizsgálata) egy nyitott rendszerré (klónozás és szekvenálás). A módszer segítségével H4R3 metilációs helyeket térképeztünk a genomban. A módszert sikeresen alkalmazták eddigiekben transzkripciós faktor kötőhelyek beazonosítására (Weinmann et al, Mol Cell Biol. 2001 Oct.).

A genomi lokalizációs analízis egyesíti a kromatin immunprecipitációs módszert a microarray technikával (Weinmann et al, Genes Dev. 2002 Jan.). A módszer segítségével teljes genomi kontextusban vizsgálható, miként befolyásolja az epigenetikai környezet egy gén transzkripcióját.

Vizsgálatainkhoz egy 12000 CpG szigetet tartalmazó DNS chipet használtunk, és magreceptor kötődést valamint H4 acetilációs státuszt vizsgáltunk. Az eredmények feldolgozását megkönnyítendő létrehoztunk egy bioinformatikai webfelületet, melynek segítségével a 12k CpG platformon begyűjtött adatokat tükrözhethetjük Affymetrix platformon szerzett globális expressziós adatokra.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtek

HL-60/CDM-1, MonoMac6 és Ht29 és 293T sejteket standard sejt kultúrák körülmények között tartottunk fenn.

Ligand kezelések, anyagok

HL60/CDM1 sejteket 1 μ M koncentrációjú 9 cisz retinsavval kezeltünk. MonoMac6 és Ht29 sejteket 1 μ M koncentrációjú Roziglitazonnal kezeltünk. Az alapozás vagy előkezelés 1,25% DMSO vagy 10nM D Vitamin 16 órás kezelése jelentette. Metiltranszferázok gátlása 10 μ M Adenozin dialdehid kezeléssel történt.

Ha másképp nem jelöltük, minden laboratóriumi vegyszert a Sigma Aldrich kft-től szereztünk be. Az antitesteket a flow citométeres mérésekhez ha másképp nem jelöltük a DAKO A/S- től szereztük be.

Plazmidok

A PRMT1 és PRMT1 katalitikus mutáns kifejező emlős expressziós vektorokat Uta Maria Bauertől állította elő (University of Marburg). A PAD4 és PAD4 katalitikus mutáns kifejező emlős expressziós vektorokat Yanming Wangtól kértük (Allis Laboratory, Rockefeller). A munkánkhoz használt többi plazmidot munkacsoportunk korábban publikálta vagy eredetüket idézte.

Transzfekció

HL-60 sejteket AMAXA Electroporator System segítségével elektroporáltuk. A 293T sejteket Polyethylene-imine reagens segítségével transzfektáltuk.

Teljes RNS kinyerése

A sejtek teljes RNS-ét TRISOL reagens (Invitrogen) segítségével nyertük ki a gyártó útmutatásai szerint.

Valós idejű kvantitatív PCR (RT-QPCR)

A valós idejű kvantitatív PCR-t egy ABI7900 Real Time Sequence Detection System műszere végeztük. A PCR reakciókat triplikában a megfelelő kontrolokká kiegészítve mértük le. Analízishez a komparatív Ct módszert alkalmaztuk.

Kromatin immunprecipitáció (ChIP)

A kromatin immunprecipitációt a Kuo és Allis által leírt módszer szerint végeztük, módosításokkal. A következő antitesteket használtuk: Upstate: #06–866 Anti Acetyl H4, #07–213 Anti dimethyl H4 Arg3, #07–030 Anti dimethyl H3 Lys 4, #07 212 Anti dimethyl H3 Lys9, Abcam: #ab5823 H4 methyl R3 antibody, #413–200 Pan dimethyl arginine. A komplexeket protein A Agarose golyócskákkal gyűjtöttük be (Upstate #16–157).

Ligálás és plazmid preparálás

A kromatin immunprecipitációnál begyűjtött DNS darabok túlnyúló végeit Klenow enzimmel (Fermentas) töltöttük fel és T4 DNS ligázzal (Fermentas) klónoztuk be egy alacsony háttérű plazmidba (Zero Blunt® PCR cloning vector/ Invitrogen). A ligálás után *E. coli* DH5 α ultrakompetens baktériumba transzformáltuk majd egyedi kolóniák izolálása után Miniprep Wizard (Promega) kit segítségével izoláltuk. A fragmentek méreteit kettős restrikciós enzimhasítással illetve standard PCR technikával ellenőriztük vektor specifikus primereket használva.

Szekvenálás

A szekvenálást M13+ szekvenáló primerrel végeztük ABI Big Dye Terminator 2.1 kit felhasználásával.

In Silico Analízis

A szekvenciákat először az NCBI Blast program segítségével azonosítottuk be. A találatokat a BLAT programmal (UCSC Human Genome Browser) lokalizáltuk a genomban ahol konzervált régiókat, ismert géneket, konzervált transzkripciós faktor kötőhelyeket kerestünk. A beazonosított gének annotálásához a PANTHER Adatbázist használtuk melynek segítségével komplex gén és fehérje annotáció végezhető el.

Sejt ciklus analízis

A sejtciklus analízist propidium jodid festéssel és flow citométeres méréssel végeztük amint az Current Protocols in Cell Biology (1999) szerkesztette: Juan S. Bonifacio (et al.) 8.4.1. Fejezetben leírva található.

Intracelluláris festés és flow citométeres analízis

Intracelluláris festés és flow citométeres analízist 0,5 %-os szaponint tartalmazó pufferben végeztük egy TGM2 ellenes egér monoklonális antitest és fluorescens másodlagos antitest segítségével.

Microarray analízis

Az Affymetrix platformon elvégzett génexpressziós vizsgálatokhoz teljes RNS-t izoláltunk RNeasy kit (Qiagen) segítségével. A cRNS-t teljes RNS-ből SuperScript kit (Invitrogen) és High Yield RNA transcription labeling kit (Enzo Diagnostics) segítségével állítottuk elő. A fragmentált cRNS-t Affymetrix HG_U133_plus2.0 chipre (Santa Clara, CA) hibridizálták az EMBL Microarray Core Facilityban, Heidelbergben.

A genomi lokalizációs analízishez a kromatin immunprecipitált terméket primer extenzióval és PCR technikával felamplifikáltuk (DeRisi Lab Protocol, UC San Francisco) és a CpG chip előállítója által javasolt protokollal jelöltük (UHN, Toronto, Canada). Analízishez a GeneSpring 7.0 (Agilent) programot használtuk.

Dnáz hiperszenzitivitás mérése

A Dnáz hiperszenzitivitás mérését kvantitatív PCR technikával végeztük. Röviden: a sejtekből magokat izoláltunk, ezeket növekvő koncentrációjú Dnázzal kezeltük, majd DNS-t izoláltunk. Az így izolált DNS-t EcoR1 restrikciós enzimmal újra emesztettük és a specifikus promóter primer szettekkel kvantitatív PCR technikával lemértük.

EREDMÉNYEK

1. A szöveti transzglutamináz retinoid függő expressziója kiindulási és előkezelt mieloid leukémiás sejtekben.

A 2-es típusú szöveti transzglutamináz expressziója igen szorosan szabályozott a mieloid leukémia sejtekben. A sejtek előkezelése differenciációt előidéző anyagokkal, mint például D vitamin vagy DMSO, nagymértékben fokozza a TGM2 retinoidok általi indukcióját. Ez a kísérleti rendszer lehetővé tette az alapozási fázis során bekövetkező molekuláris mechanizmusok vizsgálatát. Az előkezelés által a retinoid válasz két nagyságrenddel nő, miközben dinamikája nem változik. Kulcskérdés annak tisztázása, hogy e fokozódás során az egyedi sejtek válasza fokozódik, vagy több sejtben jön létre azonos mértékű válasz. E kérdés tisztázására immunhisztokémiai/flow citométeres vizsgálattal mértük meg az egyedi sejtek retinoid függő TGM2 expresszióját előkezeléssel vagy anélkül. Eredményeink szerint alapállapotban ezek a sejtek nem expresszálnak TGM2-t, és az előkezelés sem indukálja ezt a fehérjét. 9cisz retinsav kezelés hatására a sejteknek 19,7%-a expresszálta a TGM2-t, míg DMSO előkezelés és 9cisz retinsav hatására a TGM2-t expresszáló sejtek száma 63,7%-ra nőtt.

A fokozott retinsav válasz két kézenfekvő magyarázata a receptorszintek változása illetve a sejtciklusbeli átrendeződés lehet. Vizsgálataink során kimutattuk, hogy sem a receptor szintekben, sem a sejtciklus eloszlásban a DMSO előkezelés nem okoz markáns változásokat.

2. Kromatin szintű változások a kiindulási és előkezelt sejtekben.

A kromatin szintű elváltozások tisztázása céljából megvizsgáltuk TGM2 promóterének DNáz hiperszenzitivitását negatív kontrollként a RAR β gént használva, mely annak ellenére, hogy bizonyos szövetekben retinoid szabályozás alatt áll, ebben a sejtvonalban sem alapállapotban, sem DMSO kezelt állapotban retinoidok által nem indukálható. Míg a TGM2 promótere már DMSO előkezelés hatására DNáz hiperszenzitivitás fokozódást mutatott, a RAR β gén promóterében ilyen változást nem

tapasztaltunk. Ezen eredményeink alapján megbizonyosodtunk, hogy az előkezelés során a promóteren kromatin szintű változások történnek.

3. A TGM2 promóterének epigenetikai térképe

Vizsgálataink következő lépéseként elvégeztük a TGM2 promóterének különböző régióinak hisztonvég-módosítási térképezését. Munkánk során a kromatin immunprecipitációt ötvöztük az igen érzékeny valósídejű kvantitatív PCR technikával, melynek során kettősen jelölt fluoreszcens TaqMan® próbákat használtunk. A TGM2 promóterének öt különböző régiójára terveztünk TaqMan® próbákat, melyek felölelték a HR1 enhanszer és a promóter közötti 1800 bázispár hosszúságú szakaszt.

Első lépésként a H4 acetilációt vizsgáltuk előkezeletlen és DMSO előkezelt sejtekben a retinoid indukció hatására. Míg az előkezeletlen sejtekben a retinoid indukció hatására a H4 acetiláció csak kis mértékben nőtt, addig a DMSO előkezelt sejtekben a retinsav markáns H4 acetilációt eredményezett a HR1 enhanszeren. Ezután elvégeztük a TGM2 promóterének hiszton metilációs vizsgálatát. A H3 acetiláció és H3S10 foszforiláció mellett a H3K4, H3K9 és H4R3 metilációs szinteket mértük a különböző állapotokban. A H4 acetilációs szintje előkezelt sejtekben két órával a retinsav kezelés után növekedésnek indul, és hat-nyolc óráig folyamatosan növekszik mind az öt vizsgált promóter régióban. Ezzel szemben a H3K4 metilációs szintje már az előkezelés során drasztikusan lecsökken a transzkripciós starthely körül. H3K9 metilációban nem láttunk változást a vizsgált állapotokban. Míg a DMSO előkezelés H3K4 metilációs szint csökkenését okozta, addig a H4R3 metilációs szintje az előkezelés során fokozódott.

4. A H4R3 metiláció és H3K4 demetiláció szerepe a génexpresszió szabályozásában

Annak tisztázására, hogy van-e funkcionális kapcsolat a H4R3 metiláció fokozódás és fokozott retinoid válaszkészség között, a sejteket egy ADOX nevű általános metiltranszferáz gátlóval kezeltük. A HL60 sejtek DMSO és ADOXszal való együttes kezelése gátolta a H4R3 metilációt, és az általános arginin metilációt is a gén

enhanszerén. Ezzel ellentétben az ADOX előkezelés nem tudta megakadályozni a DMSO által kiváltott H3K4 metiláció csökkenést jelezve, hogy a demetilációért nem a metiltranszferázok felelősek. Ugyanakkor megjegyezzük, hogy az ADOX gátolta a retinoidok által kiváltott promóter acetilációt jelezne, hogy a fokozott acetilációhoz szükséges a metiltranszferázok aktivitása. E gátlás nem volt teljes mértékű, de visszavitte az acetilációs szintet az előkezeletlen sejtek szintjére.

Összességükben ezek az adatok azt mutatják, hogy a metiltranszferázok gátlása megakadályozza a H4R3 metilációt és a fokozott retinoid válaszkészséget. Annak eldöntésére, hogy az ADOX által bekövetkezett génexpresszió gátlás mennyire tekinthető általános jelenségnek, globális génexpressziós vizsgálatokat végeztünk. Ennek során kimutattuk, hogy az ADOX specifikusan gátolta azokat a géneket, amelyek retinoid válaszkészsége DMSO előkezelés hatására fokozódott (75 génből 62 esetben megfigyelhető volt ez a gátlás.)

5. A transzkripció szabályozása az epigenetikai környezet megváltoztatása által

A jelenség mechanizmusának reprodukálása céljából megvizsgáltuk a H4R3 metilációjáért felelős enzimek szerepét ebben a folyamatban. Ezek az enzimek a PRMT1 metiltranszferáz és a PAD4 peptidilarginin deimináz, ez utóbbi a metilált arginincsoportok citrullinná történő átalakítását végzi. Megvizsgáltuk e két enzim expreszióját előkezelés és retinsav kezelés során. Kvantitatív PCR vizsgálataink eredményeként leszögezhetjük, hogy a PRMT1 enzim jelen van a vizsgált sejttípusban és a PAD4 szintje DMSO előkezelés során fokozódik, sőt a retinsav kezelés során a szintje tovább növekszik.

Feltételezve, hogy a H4R3 metiláció fokozódása oka a retinoid válaszkészség fokozódásának, a következő munkahipotéziseket vizsgáltuk meg:

A. A korábban publikált in vitro adatok alapján (Wang et al, Science. 2001 Aug 3;293(5531) 853-7) hisztonok preacetilációja meggátolja a H4R3 PRMT1 általi metilációját. Ennek vizsgálatára Trichostatin A (TSA)-val kezeltük elő a sejteinket. A TSA hiszton deacetiláz aktivitása révén fokozza a hisztonok acetilációját. Ennek során azt tapasztaltuk, hogy a TSA előkezelés teljes mértékben megakadályozta a H4R3 metiláció fokozódását. Mi több, a H4 acetiláció és H4R3 metiláció vizsgálata

során azt tapasztaltuk, hogy a TSA kezelés fokozta az acetilációt, de gátolta a H4R3 metilációt.

B. A második megvizsgált munkahipotézis szerint a PAD4 aktiválása gátolni fogja a retinoid válaszkészséget (Wang et al, Science. 2004 Oct 8;306(5694) 279-83). E célból A23187-tel egy kalcium ionofór ágenssel kezeltük elő a sejtjeinket, ezáltal aktiválva a PAD4 enzimet. A PAD4 aktiválása teljes mértékben gátolta a retinoid válaszkészséget.

C. A harmadik munkahipotézis, amelyet megvizsgáltunk, a PRMT1 szintjének növekedése fokozza-e a válaszkészséget. PRMT1 transzfekciója nem indukálta a TGM2 gént, de fokozta a DMSO előkezelt sejtekben a retinoid válaszkészséget.

D. Végezetül megvizsgáltuk a PRMT1 és PAD4 együttes szerepét a retinoid függő génexpresszió szabályozásában. Eredményeink alapján a PRMT1 enzimatisz aktivitása szükséges a koaktivátor aktivitásához, míg a PAD4 nem korepresszor, és az enzimatisz inaktív formája fokozza a PRMT1 hatását.

6. H4R3 metiláció által módosított genomi lókuszok klónozása

PRMT1 által metilált hisztonok jobb szubsztrátjai a hiszton-acetiltranszferázoknak, és ez egy mechanikus kapocs az arginin metiláció és génexpresszió szabályozás között. Vizsgálataink során kísérletet tettünk H4R3 metilált genomi lókuszok beazonosítására kromatin immunprecipitáció és klónozás kombinálásával.

A módosított genomi lókuszokat egy metilált H4R3 specifikus antitesttel halásztuk ki, és az így létrehozott könyvtárat egy alacsony háttérrel biztosító vektorba klónoztuk. Egyedi kolóniákat izolálva a plazmidokat kipucoltuk, az inzerteket beazonosítottuk standard PCR technikával. További analízishez a plazmidokat megszekvenáltuk.

7. A beazonosított klónok analízise

Munkánk során 111 kolóniát szekvenáltunk meg, melyek közül 57 fragment volt 150 bázispárnál hosszabb. Az ennél rövidebb fragmenteket, mivel kisebbek egy mononukleoszómánál, nem vettük figyelembe az analízis során.

Első lépésként szekvenciák BLAST analízisét végeztük el, melynek során 48 bizonyult humán eredetűnek, 7 bakteriális eredetűnek, 2 lazac eredetűnek. A

bakteriális eredet valószínűleg klónozási melléktermék, a lazac eredetű pedig a protein A golyócskák blokkolásához használt lazac DNS-ből származtak. A 48 humán eredetű szekvencia közül 38-nál sikerült beazonosítanunk egy-egy tökéletes találatot, melyek közül 26 volt egyedi szekvencia, 12 ezeknek ismétlődései és 10 repetitív szekvencia. Az így beazonosított genomi lokalizációkat tovább vizsgáltuk, a UCSC Genome Browser program segítségével. A 26 beazonosított humán szekvencia közül 14 génközelinek bizonyult (10 kilobázisnál kisebb távolságra ismert gén található).

A PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) adatbázis segítségével fehérjék komplex annotációjára van lehetőség. Az adatbázisnak a segítségével megvizsgáltuk, milyen folyamatokban játszanak szerepet a beazonosított gének. Szignalizáció, sejtdifferenciáció, fejlődés és immunválasz voltak a leggyakoribb beazonosított folyamatok.

A továbbiakban a beazonosított gének 5 kilobázisos régiójában kerestünk konzervált transzkripciós faktor kötőhelyeket. Vizsgálataink során 30 ilyen transzkripciós faktor kötőhelyet találtunk, 12 ezek közül több, mint egyszer, és 6 közülük legalább háromszor volt jelen. Ezek közül 2 korábban publikált adatok szerint összefüggésbe hozható arginin metilációval, úgy mint MEF2 a PRMT4-gyel (vagy CARM1-gyel) és FOXO a PRMT1-gyel.

8. Genomi lokalizációs analízis

A vizsgálataim további kiszélesítése céljából genomi lokalizációs analízis technikát alkalmaztunk, mely kromatin immunprecipitációt kombinálja a microarray analízissel (ChIP on Chip). Ezen megközelítés segítségével globális génexpressziós adatokat értelmezhetünk a kromatin pillanatnyi állapotának függvényében. Az általunk használt microarray 12000 CpG szigetet tartalmaz.

Eddigi adataink alapján a ChIP on Chip alkalmas PPAR γ célgénnek szabályozó régióinak beazonosítására. Két független módszert használtunk ezen vizsgálatokhoz: először PPAR γ kötőhelyeket azonosítottunk be PPAR γ specifikus antitest használatával. Ezzel a módszerrel a CpG chipen levő lókuszok kb. 1%-a mutatott feldúsulást, és sikerült új alacsony expressziós szintű, potenciális PPAR γ célgéneket beazonosítanunk. Egy független módszerrel megvizsgáltuk, hogy PPAR γ specifikus

ligand kezelésével mely CpG szigeteken következik be H4 acetilációs szint fokozódás. Ezzel a módszerrel a CpG chipen lévő lókuszok 0,6%-a mutatott pozitív jelet.

A ChIP on Chip adatok és az Affymetrix platformon szerzett génexpressziós adatok korrelálására létrehoztunk egy web-alapú bioinformatikai interfészt a Magyar Bioinformatikai Intézettel közösen. A CpG annotációs kereső címe:

<http://genomics.dote.hu/jetspeed/air/cpg.jsp>

ÖSSZEFOGLALÁS

Eredményeink alapján új modelljét javasoljuk a retinoid válasz készség szabályozásának mieloid leukémia sejtekben. A szöveti transzglutamináz retinoid függő indukciója során sikerült egy új szerepét beazonosítani a korábban leírt, de kevésbé karakterizált H4R3 metilációnak.

A H4R3 metiláció a differenciáció alapozási fázisára jellemző, és megelőzi a gén aktiválódását. E módosítás egy transzkripcionálisan kikapcsolt, de „érzékenyített” állapotot jelöl, melynek következtében a módosított hisztonok jobb szubsztrátjaivá válnak a hiszton acetiltranszferázoknak. E mechanizmus felelős a fokozott retinoid válasz készségért. A hisztonok preacetilációja meggátolja ennek a módosulásnak a kialakulását.

A javasolt modell egybeesik a hisztonkód elmélettel, mely szerint a módosított hisztonvégek fizikai hordozói a sejtmemóriának. Transzkripció faktorok bekötődését biztosítva ezek a hisztonvég módosulások génexpressziós kapcsolókként is felfoghatóak. Adataink a H4R3 metilációnak egy új szerepet tulajdonítanak, mely potenciálisan farmakológiailag módosítható.

H4R3 metiláció további vizsgálata céljából beklónoztuk a módosítást tartalmazó kromatin darabokat, szekvenálás és in silico analízis után megállapítottuk, hogy az érvényes találatok mindegyike introni vagy 5' végi lokalizációjú volt. Ezen lokalizációk feldúsulást mutattak a következő konzervált transzkripció faktor kötőhelyekben: POU2F1, MEF-2 és FOXL1. Az így beazonosított genomi lókuszok, szignalizációs útvonalak és fejlődési folyamatokban szerepet játszó gének közelében voltak. Ezen lókuszok további vizsgálata új szerepeit tisztázhatja a H4R3 metilációnak.