

Összefoglalás

A C57BL/6J egértörzsben spontán mutációval keletkezett, ún. rough coat (*rc*) egereket 1966-ban a Main állambeli JAX laboratóriumban azonosították, majd a mutációt 1977-ben a 9-es kromoszómára térképezték közel az *Mpi1*-es génhez. Az ezt követő évtizedekben a mutáns törzs tudományos érdeklődés perifériájára került egészen 2004-ig, amikor is Prof. Dr. Csiszár Katalin a lysyl oxidase (*lox*) vizsgálata során célul tűzte ki, hogy azonosítja a rough coat fenotípus kóroki génjét, ami allélikus lehet a *lox*-al. Bár a két gén között allélizmus nem volt kimutatható, a tudományos kíváncsiság a rough coat törzssel kapcsolatban továbbra is fennmaradt. E disszertációban olvasható tanulmánynak a célja, hogy azonosítsa a rough coat egerek megjelenésének genotipikus hátterét, valamint, hogy a mutáción keresztül ment gén molekuláris funkciójára fényt derítsen.

A tanulmány 2. fejezetének az elején azokat a fenotipikus jegyeket határoztuk meg, melyeket a pozicionális klónozás során követni kívántunk, majd a fejezet további részében a mutáció azonosításának lépéseit tárgyaltuk. A mutáns egerekre autoszómális recesszív öröklésment jellemző. Születéskor a mutáns egyedeket alomtársaiktól megkülönböztetni nem lehet, de az elválasztási korban már jól megmutatkozik a nevet is adó, borzolt szőrzettel jellemzhető szőrhullásos fenotípus, mely az idő múlásával progresszivitást mutat. Ultrastrukturális vizsgálatok megmutatták, hogy a szőrhullás hátterében nem a szőrszál megváltozott struktúrája áll, hanem feltételezhetően a szőr növekedési ciklusában bekövetkezett molekuláris változás. A bőr szerkezetének hisztopatológus analízise során hypertrophikus faggyúmirigy sejteket azonosítottunk, melyekre a vad típusú alomtársaikkal összehasonlítva erőteljes faggyútermelés volt a jellemző. Mindemellett az egerek szignifikáns hányadánál (63%) egy éves kor után spontán seb megjelenését tapasztaltuk a ventrális nyaki oldalon. A seb szövettani metszetén epidermális hiperpláziát, alatta a dermiszben pedig krónikus aktív inflaminációt figyelhetünk meg. Előzetes vizsgálatok az *rc* lókuszt pozícióját a *D9Mit162* marker (49.954 Mb) és a *D9Mit104* (65.953 Mb) között azonosították. Két különböző egértörzs, már leírt és újonnan felfedezett mikroszatelita markerek, valamint szekvencia analízis segítségével egy pontmutációt azonosítottunk egy eddig ismeretlen génen belül (ENSMUSG00000070305) 44.989~45.009 Mb között, mely feltételezhetően felelőssé tehető a mutáns fenotípus kialakításáért. A mutáció a gén 3- as exonjában egy G→A tranzíciót okoz, mely fehérjeszinten egy Arg₁₀₀→Gln cserét eredményez. A gén EST analízise rávilágított, hogy a gén legalább 2 db transzkripttel rendelkezik egerben. Egy 6 exonból álló hosszabb transzkripttel, ami mintegy 237 aminosav hosszúságú polipeptid láncot kódol, valamint egy rövidebb, 2 exonból álló transzkripttel, ami 96 aminosavból álló láncolatot kódol. A fehérje aminosav sorrendje alapján a Myelin Po fehérje család Myelin Protein Zero (MPZ) és Myelin Protein Zero-like 2 (MPZL2, Epithelial V-like Antigen) fehérjéivel mutatott nagyfokú homológiát, ezért mi a rough coat egerekben azonosított új, mindidáig ismeretlen gént *Mpzl3* (Myelin Protein Zero-like 3) génnek neveztük el. A

gén expressziós vizsgálata kimutatta, hogy a géntermék számos helyen kifejeződik az egerben, úgymint az agyban, a belekben, a bőrben, az izomban, a lépben, a májban, a nyelőcsőben, a szívben, a tüdőben és a vesében. A bőr és függelékeinek közelebbi tanulmányozása poliklonális antitesttel kimutatta, hogy az MPZL3 a keratinociták, a szőrtüsző, és a faggyúmirigy sejtjeinek a palzmamembránjában lokalizálható.

Azért, hogy az *Mpzl3* természetét és funkcióját minél jobban megismerjük a 3. fejezetben *in silico* vizsgálatokat végeztünk el az *Mpzl3* nukleotid és fehérje szekvenciáját alapul véve. Kiváncsiak voltunk, vajon a fehérje csak az emlősökben található-e meg, vagy már az evolúció korábban megjelent szerkezeti formáiban is kifejeződik. Mindemellett vizsgálni kívántuk az MPZL3 domain szerkezetét a fehérje humán ortológjának az esetében, azzal a céllal, hogy esetlegesen a szekvencia, valamint szerkezeti vizsgálatok az eger fenotipikus megjelenésével kiegészítve választ nyújthatnak a gén mutációjának humán patológiás kondíciójának a kifejeződésére is. Vizsgálataink kimutatták, hogy a fehérje először a gerinces szervezetekben jelent meg. A fehérje szekvenciája emlősökben 79–99% azonosságot mutat. Mindegyik vizsgált ortológ fehérje a Myelin Po fehérjecsaládba tartozott, és rendelkezett Immunoglobulin V típusú domainnel. Az USA Biotechnológia Információs Központjának (NCBI) UniGene adatbázisának EST analízise alapján humán szervezetben a gén - eger szervezetben tapasztaltakhoz hasonlóan - számtalan helyen mutat kifejeződést. Ezenfelül munkánk során vizsgáltuk a gén expresszivitását EMBL-EBI Array Express microarray adatbázis alapján. Eredményeink azt mutatták, hogy a gén az immunrendszer felépítésében is szerepet játszó dentrikus sejtekben, valamint a CD4 és CD8 sejtekben is kifejeződik. A fehérje 3D homológián alapuló analízise kimutatta, hogy az egerben tapasztalható Arg100→Gln mutáció az immunoglobulin V típusú domén extracelluláris oldalán található, és mint ilyen a prediktált adhézions funkciót könnyen befolyásolhatja. A homológ fehérjék vizsgálata megmutatta, hogy *Mpzl3* homológ fehérjéi a Myelin Po (*Mpz*), valamint a Myelin Protein Like 2 (*Mpzl2*), vagy más néven az Epithelial-V-like antigen (*Eva1*) fehérjék szintén rendelkeznek adhézions funkcióval, valamint jelentős szerepük van az immunrendszer működésében is. Azért, hogy megvizsgáljuk vajon a humán szervezetben a fehérje hasonló megjelenést mutat-e, mint az egerben, embriónális humán fibroblaszt sejtenyészet felhasználásával Western blot analízist végeztünk, valamint az eger poliklonális antitestjének felhasználásával humán metszeten immunhisztokémiai szövetfestést csináltunk. Az emberi bőrből származó szöveti vizsgálataink kimutatták, hogy MPZL3 egy 54 kDa és egy 56 kDa nagyságú fehérjét kódol humánban, ami egy dimerizációnak, vagy posztranszlációs módosításnak lehet az eredménye. Immunhisztokémiai vizsgálatainkban egerhez hasonlóan a keratinociták és a szőrtüszők plazmamembránjában lévő kifejeződését tapasztaltuk. Az eddigi eredményeket figyelembe véve a 3. fejezetben leírt eredmények alapján azt feltételeztük, hogy a fehérje szerepet játszhat emberben az immunrendszernek hibás működésének következtében kialakuló szőrhullásos folyamatokban, mint amilyen az Alopecia számtalan formája.

Bár az *Mpzl3 in silico* analízise a gén funkcióját olyan adhézions fehérjeként predik-

tálta, aminek szerepe lehet immunmediált szőrhullásos folyamatokban, mint amilyen az alopecia, a gén funkcionális annotációja nem történt meg. A disszertáció 4. fejezetében funkcionyeréses és antiszensz morpholino knock down technikát alkalmazva kísérletet tettünk az *mpzl3* okozta komplex fenotípus hátterének a felderítésére zebrahalban. Mindenekelőtt bioinformatikai adatbázisokban szereplő adatok alapján vizsgáltuk az *mpzl3* genom szekvenciáját, majd EBI InterProScan software segítségével meghatároztuk annak doménstruktúráját, és a legközelebbi szomszéd módszerével (neighbour joining method) azonosítottuk a Myelin Po fehérjecsaldához tartozó többi fehérjéhez fűződő evolúciós kapcsolatait. Evolúciós értelemben vett legközelebbi fehérjék a *mpz*, a *mpzl1*, az *evai* és a *scn4b*. Annak érdekében, hogy az *in silico* adatokat megerősítsük, qRT-PCR és *in situ* hibridizáció segítségével meghatároztuk az *mpzl3* expresszióját a fejlődő zebrahal embriókban. Vizsgálataink magas *mpzl3* expressziós szintet mutattak már a megtermékenyítést követően, ami a gén-expresszió anyai hatásának lehetséges következménye. Későbbi időpontba vett mintákon az *mpzl3* RNS szintjének a csökkenését tapasztaltuk. *In situ* hibridizáció során a gén korai expresszióját figyeltük meg a halak oldalvonalának az érzékelősejteiben (neuromast-ban), a kloákában, a kopoltyúívekben, valamint az úszóhólyagban. Azért, hogy meghatározhassuk az *mpzl3* funkcióját, szintetikus *mpzl3* RNS-t készítettünk és 1-2 sejtet állapotban bejuttattuk a fejlődő zebrahal embriókba. A megnövekedett *mpzl3* szint hatására a halakra általános retardáció, a faroknyúlvány megrövidült mi-volta, a szívburok hypertrophiája és veleszületett, anophthalmia volt a jellemző. Az embriók egy részénél mindkét szem teljes vagy részleges hiányát figyelhettük meg, míg másoknál csak az egyik szem fejlődése volt rendellenes, míg a másik normális fejlődést mutatott. Annak érdekében, hogy az *mpzl3* funkciójáról teljes képet kaphassunk, antiszensz morfolino knockdown technika segítségével vizsgáltuk a lecsökkent *mpzl3* szint hatását a fejlődő zebrahal embriókra. A morfolinóval kezelt halakra megnövekedett letalitás, általános retardáció, az esetek 30 %-ban teljes mozgásképtelenség, valamint kardio-vaszkuláris elváltozások, úgymint hypertrophikus szívburok, és az érfal szerkezeti változásai voltak a jellemzőek. *In silico* adatok alapján feltételeztük, hogy az *mpzl3* által kódolt fehérje szerepet játszik a csecsemőmirigy és a T sejtek érésében, ezért a morphant halak csecsemőmirigy specifikus génjének, a recombination activating gene-1-nek (*rag1*) a kifejeződését vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a morphant halakban nem fejeződik ki a *rag1* gén, ami a csecsemőmirigy fejlődési és funkcionális működésének a hiányosságára utal. Annak érdekében, hogy meghatározzuk a morphant halakban megjelenő transzkriptómikai változásokat, microarray analízist végeztünk el egyedi tervezésű 4x44 k mikrochipen. Mikrochip vizsgálataink a knockdown *mpzl3* morfolino embriókban az egyedfejlődésben fontos jelátviteli útvonalak olyan elemeinek megváltozott expresszióját azonosították, mint a Notch vagy a Wnt.

Összefoglalásképpen elmondhatjuk, hogy ebben a tanulmányban mikroszatelita markerek segítségével azonosítottuk a rough coat (*rc*) egértörzsben előforduló genetikai mutációt egy eddig ismeretlen génben, amit mi a Myelin Po fehérjecsaldához,

és legfőképpen a Myelin Protein Zero Like 2 (*Mpzl2*) fűződő nagyfokú szekvencia homológia miatt, Myelin Protein Zero Like 3 (*Mpzl3*)-nak neveztünk el. Az okozott fenotípus egy Arg-Glu szubsztitúció következménye a fehérje konzervált funkcionális régiójában. *In silico* technikák alkalmazásával vizsgáltuk eme fehérjének a meglétét, és expressziós mintázatát ember esetében is. Vizsgálataink alapján azt feltételeztük, hogy az említett fehérje szerepet játszhat az immunrendszer működésének rendelleneségeivel összefüggő szőrhullásos folyamatokban is, mint amilyen az alopecia. Hogy a gén funkcionális hátterét *in vivo* módon is tanulmányozni tudjuk, azonosítottuk az egér *mpzl3* ortológját zebraháiban, és a génre specifikus szintetikus RNS molekula és antiszensz morpholino oligonukleotid felhasználásával funkcionyeréses és funkcióvesztéses kísérletet végeztünk el. Vizsgálataink megmutatták, hogy az *Mpzl3* számtalan fejlődési folyamatban szerepet játszik, aminek a hátterében mikrochip vizsgálat alapján a Wnt és a Notch szignalizációs útvonalak megváltozott működése állhat. Úgy gondoljuk, hogy a jövőben az *Mpzl3* kapcsolata a fent említett szignalizációs útvonalakkal hozzájárulhat a bőr, az immunrendszer, valamint a demyelinizációs folyamatok a pontosabb megértéséhez.