

Az SZTE Kutatóegyetemi Kiválósági Központ tudásbázisának  
kiszélesítése és hosszú távú szakmai fenntarthatóságának megalapozása  
a kiváló tudományos utánpótlás biztosításával”



# Genomikai Központ

## „PhD szakmai találkozó, munkabeszámoló”

### Constitutive Photomorphogenic Protein1 (**COP1**)

szerepének vizsgálata a humán keratinociták fényválaszában  
Fazekas Barbara

Témavezetőim:

Dr.Széll Márta (ÁOK)

Dr.Ádám Éva (SZBK)

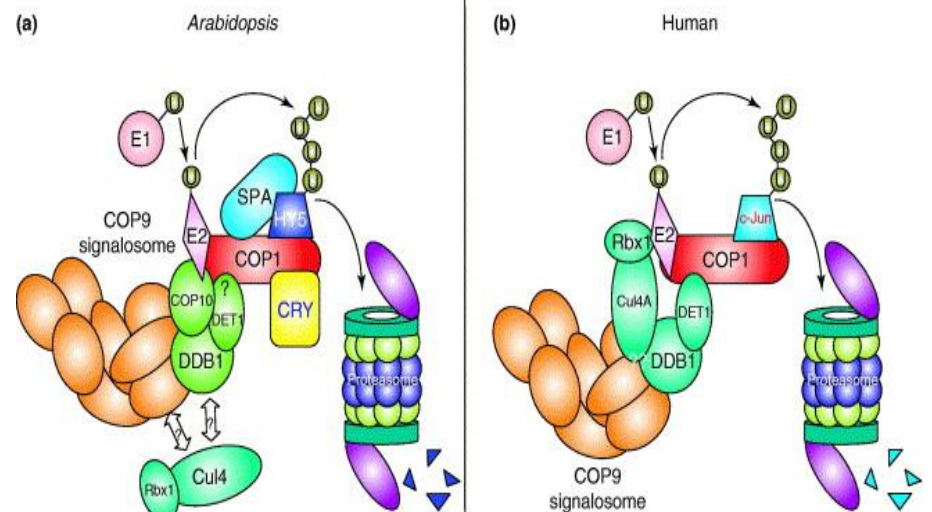
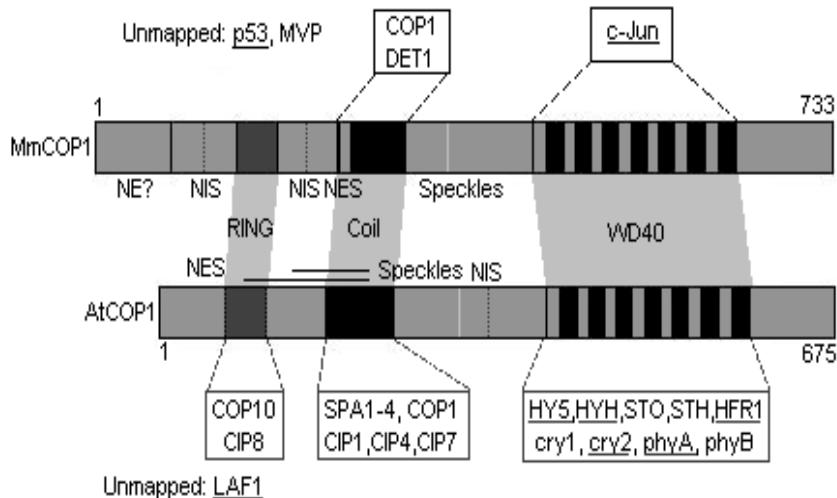
2012. 05. 25.



TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0012 projekt



- lúdfűben (*Arabidopsis thaliana*) írták le először
- E3 ubiquitin ligáz: számos transzkripciósfaktor proteoszóma-dependens degradációja
- a fotomorfogenezis, vagyis a fény-indukálta növekedés központi regulátora
- sötétben a sejtmagban helyezkedik el – negatív regulátor szerep (HY5, HYH, LAF)
- látható fény hatására kiáramlik a sejtmagból
- UVB hatására a sejtmagban akkumulálódik



# huCOP1

- Szerepe még nem teljesen tisztázott
- E3 ubiquitin ligáz (COP1, MDM2, Pirh2)
- Rákos sejteknél: huCOP1 overexpresszió
- => represszálja a p53-függő tumorgátlást
- => gátolja az apoptózist és sejtciklus leállást

# huCOP1

- Represszálja ETV1, ETV4, ETV5 (E26 transzformáció specifikus (ETS) család tagjai) transzkripciós faktorokat
- => COP1 csendesítés hatására ETV1,4,5↑
- => sejt proliferáció↑ => hiperplázia
- COP1-PTEN deficiencia => fokozott tumor progresszió
- COP1 is a tumor suppressor that causes degradation of ETS transcription factors

Alberto C. Vitari et al., Nature 2011

# Eddigi vizsgálatok

- a huCOP1 expresszió detektálása humán keratinocitákban és a humán bőrben
- az UVB huCOP1-re gyakorolt hatásának vizsgálata normál humán keratinocitákban és humán bőrben
- a huCOP1-p53 kapcsolatának vizsgálata humán keratinocitákban
- az UVB hatásának vizsgálata COP1-csendesített humán keratinocitákban
- a huCOP1 változásának detektálása a keratinocita differenciáció során

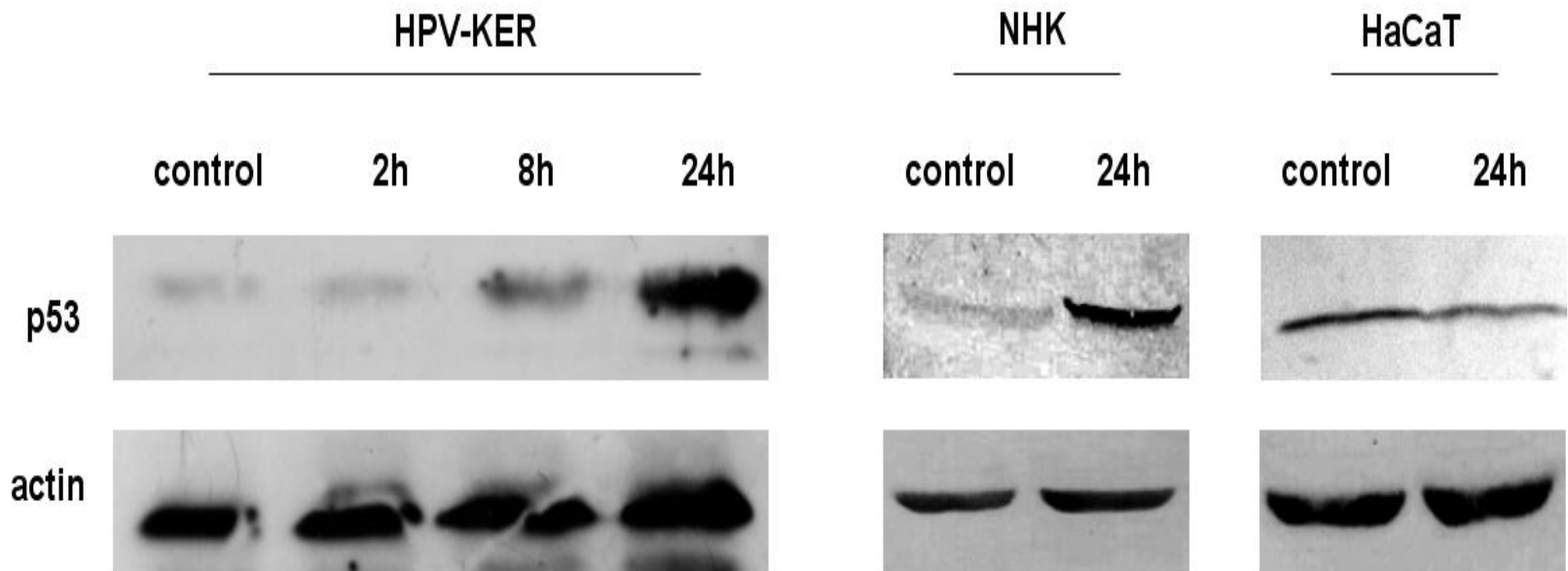
## Eddigi csendesítései kísérletek:

transziens transzfekeció és lentivirális csendesítés

**Hosszútávú terv:** COP-1 csendesítése stabil transzformációt követően

- HaCaT sejtvonala nem alkalmas
- Normál humán keratinocita (NHK) korlátozott mennyiségben elérhető, csak transziens transzfekecióra alkalmas
- Lehetséges megoldás: HPV-KER sejtvonala

UV-B irradiation



*Boros Imre és mtsi*

*Kinyó Ágnes és mtsi*

# COP1 csendesítő konstrukciók

## **pSuperior puro vektor-siRNS COP1 A:**

- Oligonukleotidok COP1 gén-Coiled-coil domén 697-716 szekvencia részletére:

5'AGCTTcttgatttggccaatgtcaTTCAAGAGAtgacattggccaatcaagttC3'  
(szensz)

5'AgaactaaaccggttacagtAAGTTCTCTactgtaaccggttagttcaaGAGCT3'  
(antiszensz)

## **pSuperior puro vektor-siRNS COP1 B:**

Oligonukleotidok COP1 gén-Coiled coil domén 801-821 szekvenciárészletére:

5'AGCTTcctcaagggtgcaagaagaTTCAAGAGAtcttcttgcaacctgaggTTG3'  
(szensz)

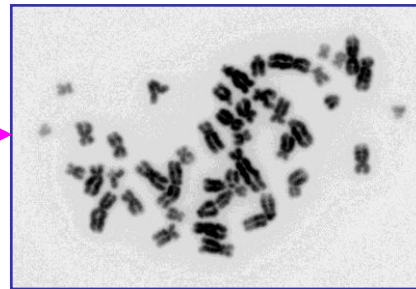
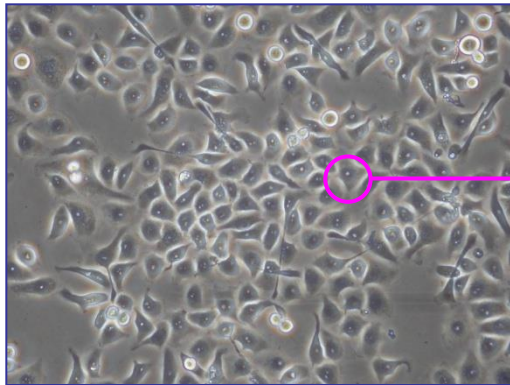
5'TCGACAACCTCAAGGTTGCAAGAAGATCTCTTGAATCTTCTTGCA  
ACCTTGAGGA3' (antiszensz)

A konstrukciók ellenőrzése Ádám Éva irányításával történt.

# COP1 stabil csendesítése HPV-K sejtvonalba

- II/15 sejtvonala

A II-15 immortalizált humán keratinocita sejtvonala kromoszóma száma (Chr#) 46. Szép, jó kariotípusú sejtvonálnak tűnik, homogén 46-os kromoszómaszámmal:





# COP1 stabil csendesítése HPV-K sejtvonalba

X-treme gene 9 DNS transzfekciós reagenssel:

- COP1 A konstrukció: kezdetben legdinamikusabban osztódó sejtek, viszont nem élnek túl
- COP1B konstrukció: 2 különböző klón
- Üres pSuperior puro vektor (kontroll): 3 különböző klón

Nukleofekció:

- Amaxa Cell line nucleofector Kit (Lonza)
- COP1A konstrukció: kezdetben legdinamikusabban osztódó sejtek, viszont nem élnek túl
- COP1B konstrukció: 1klón
- Üres pSuperior puro vektor (kontroll): 1klón

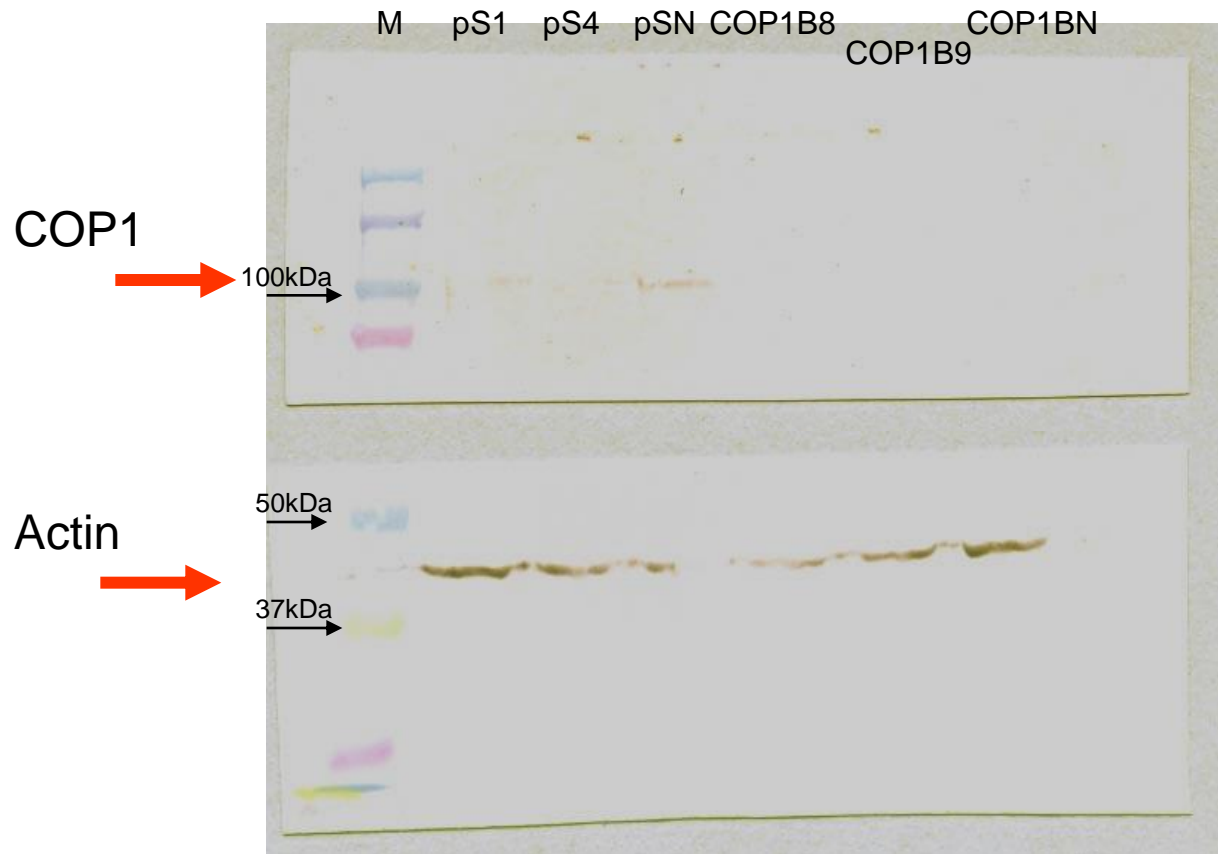
Összesítés:

- 3 független specifikus klón
- 4 független kontroll klón

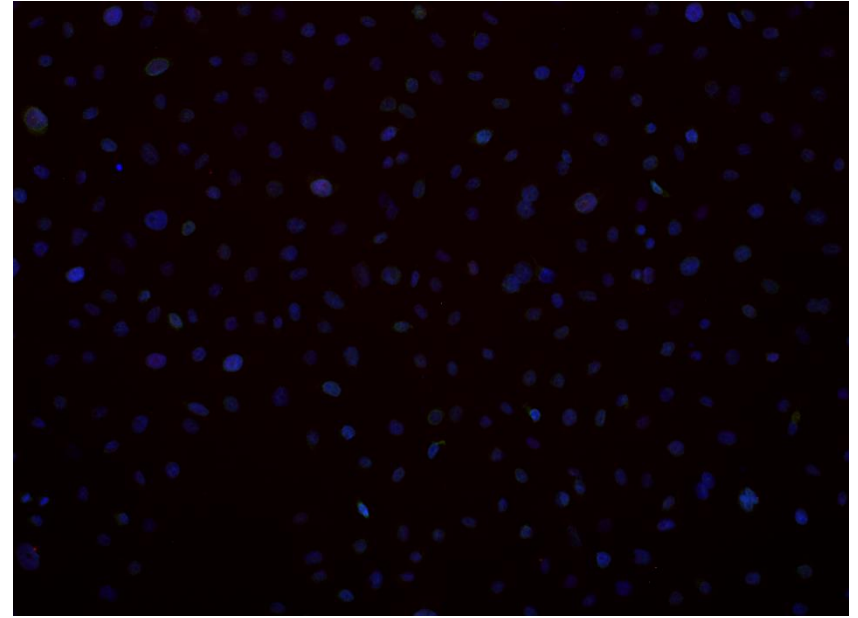
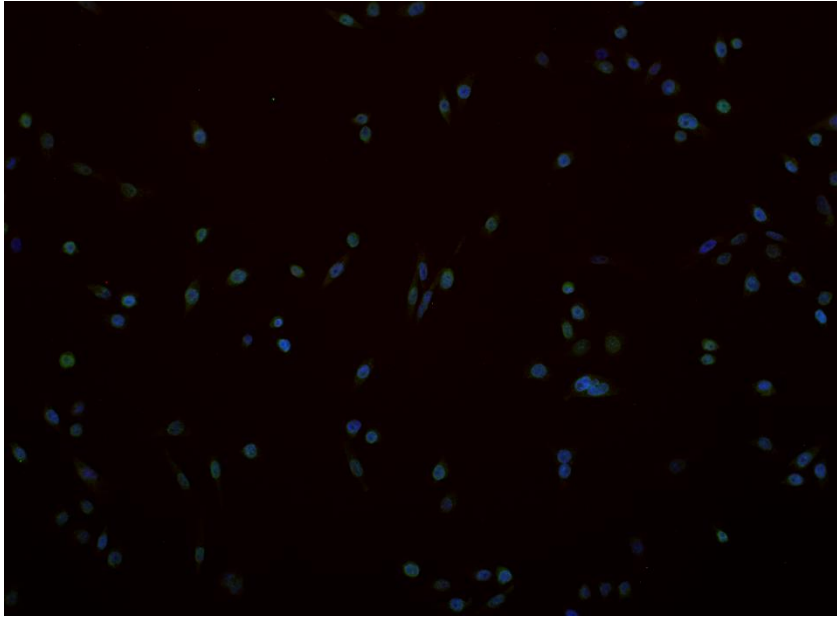
# Western blot kísérletek

- COP1
- P53
- Actin

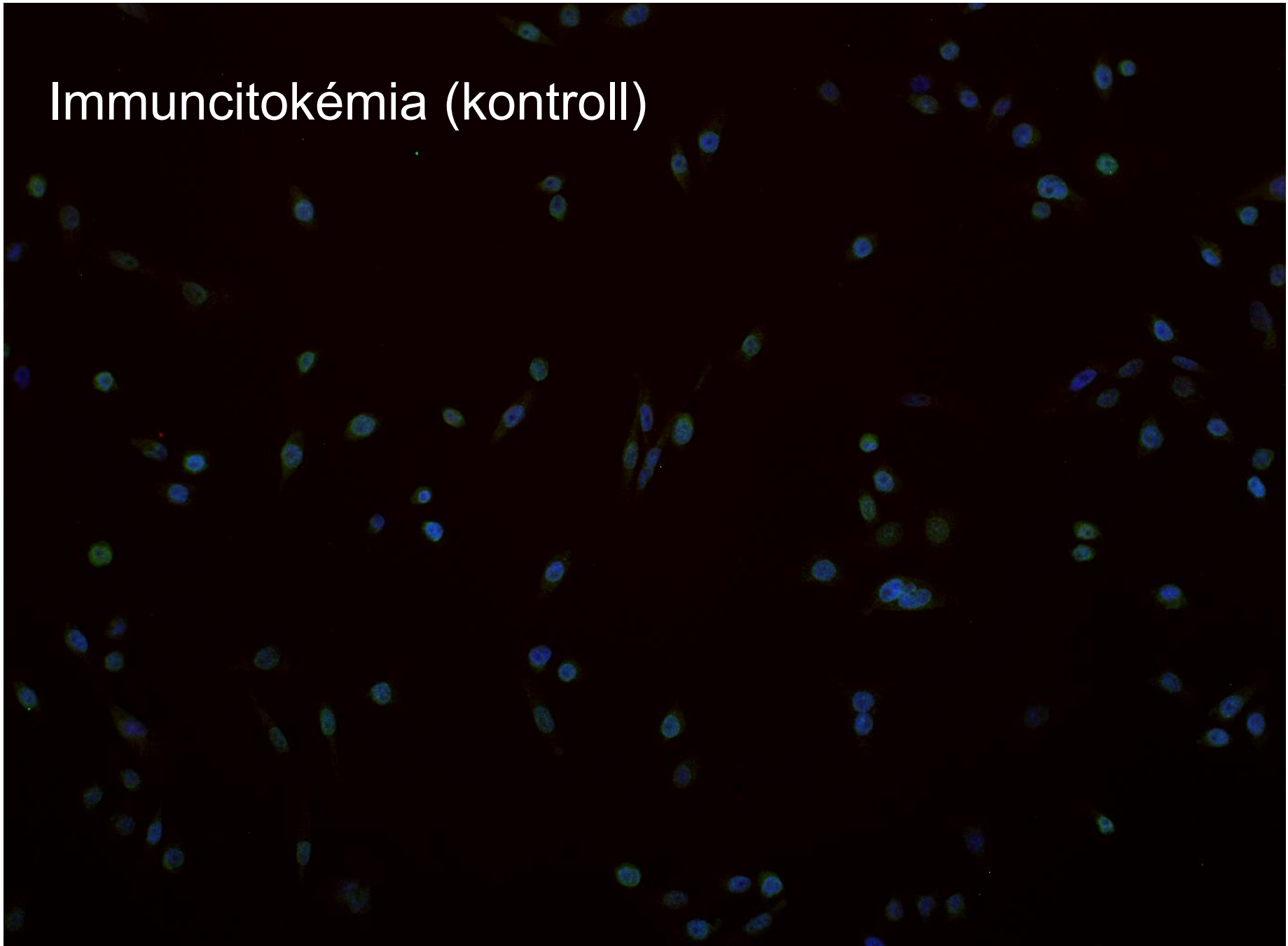
# Western blot



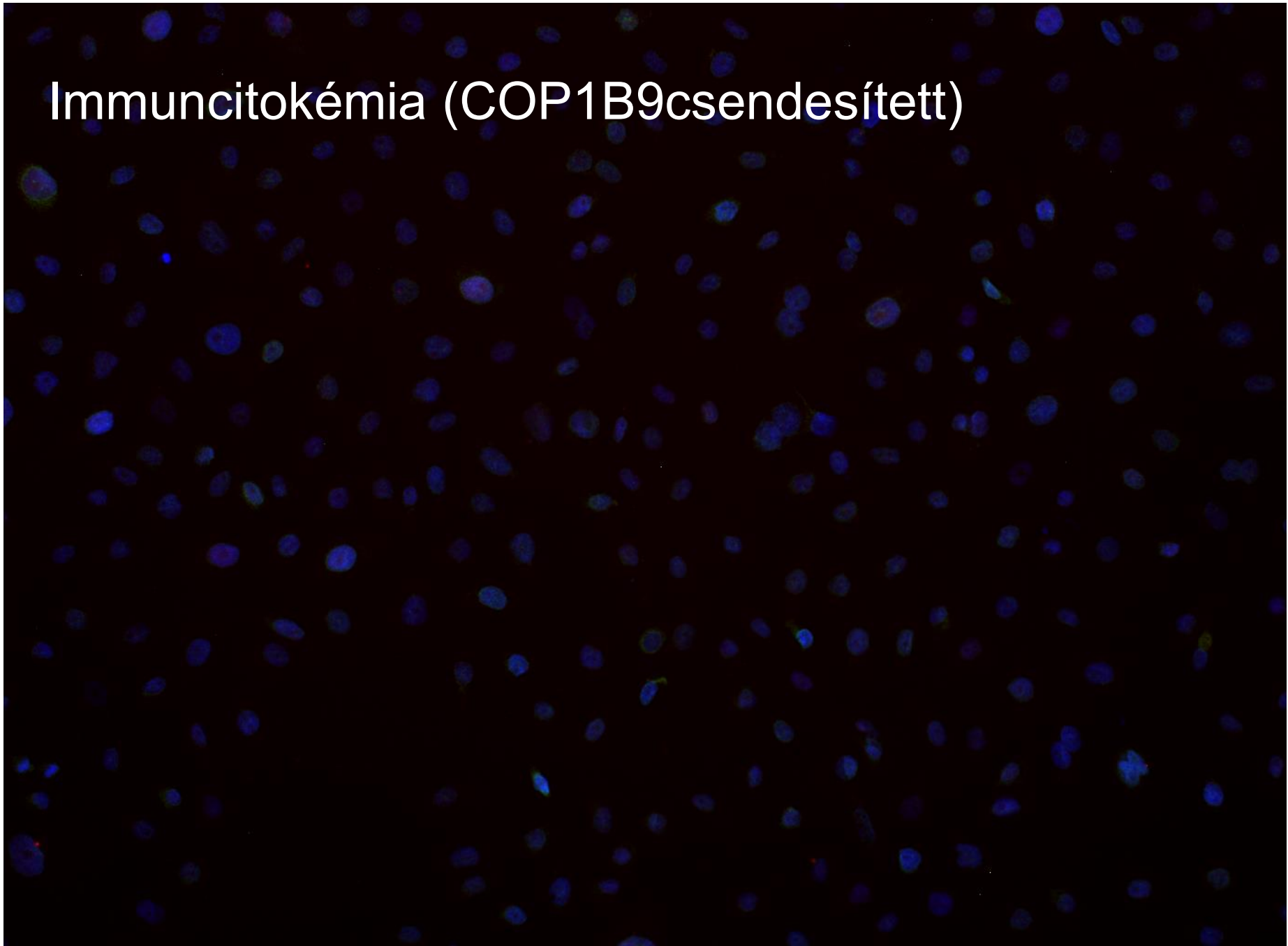
# Immuncitokémia



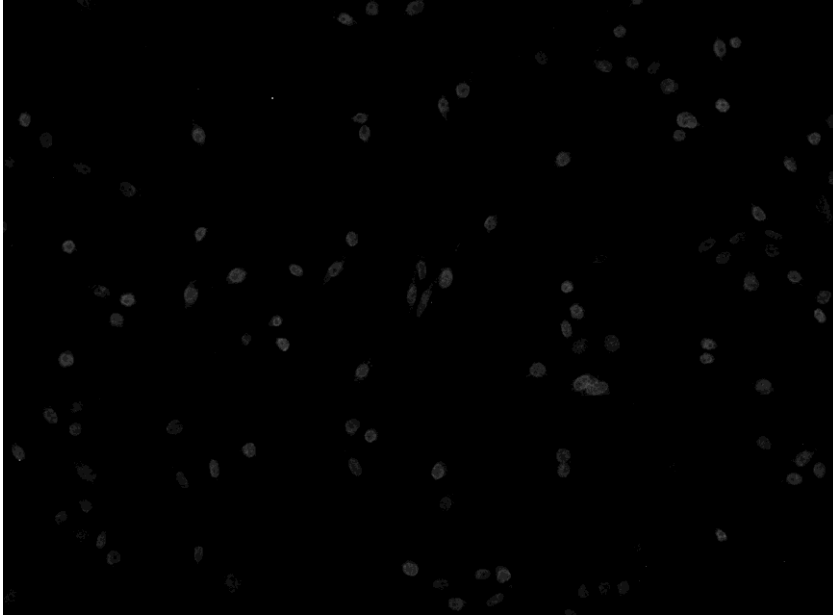
# Immuncitokémia (kontroll)



# Immuncitokémia (COP1B9csendesített)



# Immuncitokémia (COP1)



Kontroll



COP1B9 csendesített

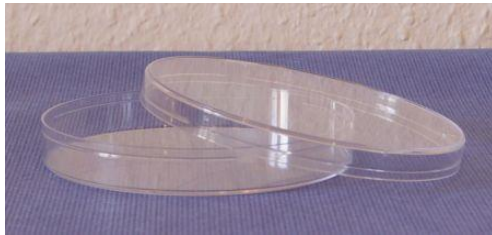
# Elért eredmények

- COP1 gén csendesítése HPV-K sejtvonalba stabil transzformációt követően
- Fehérjeszinten a COP1 mennyisége alacsonyabb a specifikus klónok esetében a kontroll klónokéhoz képest  
(western blot, immuncitokémia)



# Kutatási terv

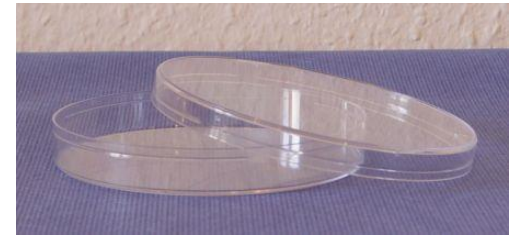
COP1(+)



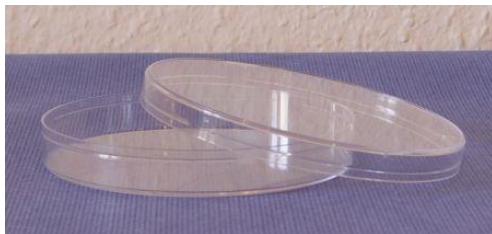
PCR alapú array és/vagy  
cDNS microarray



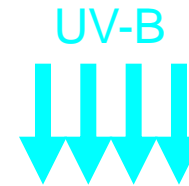
siCOP1



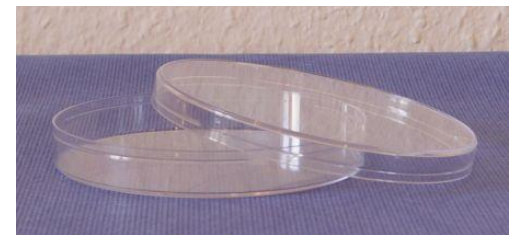
PCR alapú array és/vagy  
cDNS microarray



PCR alapú array és/vagy  
cDNS microarray



PCR alapú array és/vagy  
cDNS microarray



**Cél:** COP1 stabil csendesítését követően a megváltozott jelátviteli folyamatok azonosítása PCR alapú Superarray és cDNS microarray módszerekkel a COP1 tumorgenezisében résztvevő géneket is figyelembe véve

# Köszönöm a figyelmet!



# Köszönöm a sok segítséget!

- Dr.Széli Márta
- Dr.Ádám Éva
- Prof.Dr.Kemény Lajos
- Dr.Polyánka Hilda
- Farkas Katalin
- Dr.Bebes Attila