

A humán sztearil-KoA-deszaturáz 1 transzkripciós kontrolljának és genetikai polimorfizmusainak vizsgálata

Tézisfüzet

Tibori Kinga

Molekuláris Orvostudományok Doktori Tagozat
Semmelweis Egyetem



Témavezetők:

Dr. Kereszturi Éva, Ph.D

Dr. Csala Miklós, MD, D.Sc

Hivatalos bírálók:

Dr. Fekete Ferenc, Ph.D

Dr. Molnár-Érsek Barbara, Ph.D

Komplex vizsga szakmai bizottság

elnöke:

Dr. Tretter László, D.Sc

tagjai:

Dr. Törőcsik Beáta, Ph.D

Dr. Hajdinák Péter, Ph.D

Budapest

2025

1. Bevezetés

A zsírsavak számos fiziológias funkciót látnak el, és patológias szerepük is jelentős. Az emberi szervezet legnagyobb mennyiségben 16 és 18 szénatomszámú, hosszúláncú zsírsavakat – ezek közül is palmitátot (16:0), palmitoleátot (16:1 *cisz* Δ 9), sztearátot (18:0), oleátot (18:1 *cisz* Δ 9) és linoleátot (18:2 *cisz* Δ 9, Δ 12) tartalmaz, de jelentős a táplálék összetételétől függően változó mennyiségű elaidát (18:1 *transz* Δ 9) és vakcenát (18:1 *transz* Δ 11) is. Sejtjeink és egész szervezetünk működése szempontjából kiemelkedően fontos, hogy megfelelő mennyiségű és minőségű zsírokat és olajokat fogyasszunk.

Membránjaink felépítéséhez, az energia tárolásához, egyes vitaminok és hormonok előállításához, a sejtek közötti kommunikációhoz szükségünk van zsírsavakra. A tartós zsírsavtúlkínálat azonban káros a sejtekre, és ezt lipotoxicitásnak nevezzük. Oka leggyakrabban a metabolikus szindróma, amelyet az elhízás és mozgásszegény életmód válthat ki a meglévő genetikai hajlam esetén. Metabolikus szindrómában a hipertrófiás zsírszövetben kialakuló gyulladás az egész szervezetben inzulinrezisztenciához, hiperglikémiához és diszlipidémiához vezet, ami végül akár 2-es típusú diabéteszt (T2DM) is okozhat.

A megfelelő mennyiség mellett az optimális zsírsavösszetétel is alapvető fontosságú. A trigliceridek, foszfo-, és glikolipidek hatékony szintéziséhez és megfelelő tulajdonságaihoz

elengedhetetlenek a telítetlen zsírsavak. A telített zsírsavak tehát a telítetleneknél erősebben váltanak ki lipotoxicitást, túlsúlyuk lipidintermedierek felhalmozódásával, ER-, illetve oxidatív stresszel és következményes sejtkárosodással járhat. Ráadásul citokin- és Toll-like receptorokon keresztül erősítik a gyulladást, és ez is súlyosbítja az inzulinrezisztenciát. A telítetlen zsírsavak csökkentik e sejtkárosító hatásokat egyrészt gyulladáscsökkentő hatásaiknak köszönhetően, másrészt azért, hogy gördülékennyé teszik a lipidszintézist, így megelőzik lipidintermedierek felhalmozódását és elősegítik a felesleges zsírsavak zsírcseppekben történő raktározását.

Az optimális telített/telítetlen zsírsavarány kialakításáért a táplálék összetétele mellett az ER membránjához kötött sztearil-KoA-deszaturázok (SCD) felelősek, melyek az első, *cisz* Δ^9 helyzetű kettős kötés létrejöttét katalizálják a zsírsavakban. Két humán izoformája közül az értekezés az SCD1-re fókuszál. Bár az SCD1 – a toxikusabb telített zsírsavak védő hatású telítetlen zsírsavakká alakításával – a lipotoxicitással szembeni védekezés kulcsenzime, emellett a zsírraktározásnak is kedvez, így túlzott expressziója vagy megnövekedett aktivitása hozzájárulhat az elhízás, a metabolikus szindróma és az ezekkel összefüggő további anyagcserebetegségek kialakulásához. A deszaturáz enzim mennyisége transzkripciós és transzlációs szinten egyaránt szabályozódik, melyet a fehérje genetikai variációi is

befolyásolnak, akár drasztikusan változtatva a fehérje mennyiségét.

Az endogén zsírsavszintézis telített vagy *cisz*-telítetlen zsírsavakat eredményez, így transzzsírsavakat csak bizonyos ételek fogyasztásával juttatunk a szervezetünkbe. A kérődző állatok húzában és tejében természetes úton keletkezett transzzsírsavak (rTFA) találhatók, melyek fő képviselője a vakcenát. Emellett az élelmiszeriparban az eltarthatóság növelése, kellemetlen szagok vagy ízek eltávolítása érdekében alkalmazott egyes eljárások ipari eredetű transzzsírsavak (iTFA) megjelenését eredményezhetik, melyek fő képviselője az elaidát.

A transzzsírsavak egészségügyi vonatkozásai mai napig tisztázatlanok. Míg eleinte úgy gondolták, egyöntetűen károsak, kiderült, hogy különbséget kell tenni az rTFA-k és iTFA-k egészségre gyakorolt hatásai között. Számos tanulmány jótékony hatást tulajdonít az rTFA-knak. Kimutatták például a vakcenát direkt antikarcinogén hatását MCF-7 humán emlő adenokarcinóma sejteken, vagy például a transz-palmitoleát (16:1 *transz* Δ 9) pozitív befolyását szisztémás inzulinérzékenységre és T2DM-re.

2. Célkitűzések

Az SCD1 enzim pontosabb működésének, illetve betegségekben betöltött szerepének jobb megértése érdekében célul tűztük ki egyrészt különböző típusú zsírsavak, másrészt a gén ismert polimorfizmusai SCD1-expresszióra gyakorolt hatásának *in vitro* vizsgálatát két humán eredetű sejtvonalban.

1. Célul tűztük ki a telített, *cisz*- és *transz*- egyszeresen, illetve többszörösen telítetlen zsírsavak hatásainak elemzését az SCD1-expresszió különböző szintjein.
2. Célunk volt továbbá feltérképezni az SCD1 egy nukleotidpárra kiterjedő polimorfizmusainak (SNP) hatásait. Ennek értelmében vizsgálni terveztük
 - a. a leggyakoribb promóterpolimorfizmusok (i) génexpressziót moduláló szerepét önmagukban, illetve zsírsavak jelenlétében, valamint (ii) transzkripciós faktor- (TF-) kötőhelyekre gyakorolt hatását.
 - b. az M224L missense SNP (i) intracelluláris fehérje- és mRNS-szintekre, (ii) fehérjestabilitásra, (iii) az SCD1 mennyiségének zsírsavak általi szabályozására, valamint (iv) enzimaktivitásra gyakorolt hatását.

3. Módszerek

***In silico* eszközök**

Adatbázisok: SSCprofiler, PBD protein Data Bank, NCBI és Ensembl. SNP-k hatásait prediktáló programok: RNAfold, I-TASSER, JASPAR, Variant Effect Predictor.

Plazmid konstrukciók és mutagenézis

Az *SCD1* kódoló régióját pcDNA3.1(–) expressziós vektorba, promóterét pGL3-Basic vektorba klónoztuk. A vizsgált variánsokat és ezek Glu-Glu címkével ellátott konstrukcióit irányított mutagenézissel hoztuk létre.

Sejtkultúra és transzfekció

Kísérleteinket humán embrionális vese eredetű (HEK293T) és hepatocelluláris karcinóma (HepG2) sejtvonalakon végeztük. A mintákat 24–30 órával a Lipofectamine 3000-rel végzett tranziens transzfekciót követően gyűjtöttük be.

Kezelések

A különböző *SCD1* variánsok fehérjestabilitását a tranziens transzfekciót követő cikloheximides kezelés során vizsgáltuk. A missense SNP alléljainak mRNS-stabilitását hasonló módon, de aktinomicin D hozzáadása mellett követtük. A zsírsavak hatását BSA-val konjugált oleát-, palmitát-, palmitoleát-, linoleát-, sztearát-, elaidát- vagy vakcenát-kezelést követően mértük.

Immunoblot

A begyűjtést követően a sejteket feltártuk, majd a sejtörmelék eltávolítása után meghatároztuk a felülúszó fehérjekoncentrációját. A sejtízátumok azonos koncentrációjú alikvotjait 12%-os Tris-glicin poliakrilamid minigélben elválasztottuk, majd Immobilon-P membránokra transzferáltuk. A fehérje szinteket SCD1-re, Glu-Glu címkére, ETS1-re és a kontrollként használt β -aktinra specifikus ellenanyagokkal detektáltuk.

Luciferáz assay

A riporter konstrukciókkal transzfektált mintákat Riporter Lízis Pufferben gyűjtöttük be, majd a luciferáz enzimaktivitásokat Luciferase Assay System kit segítségével a Varioskan multi-well plate-leolvasóval detektáltuk. A transzfekciós kontrollként használt pCMV- β -gal expressziós plazmidról képződő β -galaktozidáz aktivitását az ONPG hasítási sebességének meghatározásával mértük. A luciferáz aktivitás értékeit a β -galaktozidáz aktivitásra normalizáltuk.

RNS-izolálás, cDNS-szintézis, qPCR

A tranziensen transzfektált HEK293T és HepG2 sejtekből RNeasy Plus Mini Kit-tel RNS-t izoláltunk. A mintákat minőségellenőrzést követően cDNS-be írtuk át. A mennyiségi méréseket Sybr Green alapú qPCR-rel, a célgénekre specifikus primerek jelenlétében végeztük. Endogén kontrollként *GAPDH*

cDNS-t amplifikáltunk. A relatív expressziós szinteket $2^{-\Delta C_T}$ összefüggés alapján számoltuk.

Zsírsvaprofil meghatározása GC-FID-del

A PBS-ben begyűjtött mintákat centrifugáltuk, majd a sejtpelleteket felszuszpendáltuk és NaOH-t tartalmazó metanol hozzáadását követően GC-FID analízisre küldtük. A további mintaelőkészítési lépéseket és a gázkromatográfiás vizsgálatot a BME Vegyészmérnöki és Biomérnöki Karán, egy Shimadzu GC-2014 gázkromatográfval végezték.

Genotipizálás

Az rs1054411 promóterpolimorfizmus vizsgálata 282 T2DM-mel diagnosztizált beteg és 370 kontroll, míg az M224L polimorfizmus genotipizálása 425 T2DM-mel diagnosztizált személy és 463 kontroll mintán történt. Mindkét polimorfizmus TaqMan próba alapú qPCR-rel került meghatározásra.

Statisztika

Az immunoblotokat denzitometrálassal kvantifikáltuk. A relatív denzitások, a luciferáz aktivitások és az mRNS-szintek statisztikai összehasonlítását a GraphPad Prism 6.0 szoftver segítségével végeztük. A genotípus-fenotípus összefüggést χ^2 -próbával vizsgáltuk.

4. Eredmények

4.1 Zsírsavak hatása az SCD1 expressziójára

A 24 órás, 100 μ M-os zsírsavas kezeléseket követően az SCD1 fehérje-, illetve mRNS mennyiségét immunoblottal, illetve qPCR-rel követtük, a promóteraktivitást pedig luciferáz riporter rendszerben mértük. A többszörösen telítetlen linoleát mindhárom szinten, mindkét sejtvonalon szignifikánsan csökkentette az SCD1 expresszióját. Az egyszeresen telítetlen oleát mind mRNS-, mind fehérjeszinten csökkentette az SCD1 kifejeződését HEK293T sejtekben, azonban HepG2 sejtekben, valamint promóter szinten nem okozott jelentős változást. A két telített zsírsav, a palmitát és a sztearát mindkét sejtvonalban jelentősen növelte a promóteraktivitást, és HEK293T sejtekben a fehérjemennyiséget is. Jelentős különbség mutatkozott az rTFA vakcenát és az iTFA elaidát hatása között. Míg az elaidát mindhárom vizsgált szinten jelentősen indukálta az SCD1-et, addig a vakcenát inkább csökkentette vagy nem változtatta az enzim expresszióját. A két transzzsírsav hatása közti különbség mindhárom szinten, mindkét sejtvonalon szignifikánsnak bizonyult.

4.2 Az SCD1 polimorfizmusai

4.2.1. Promóterpolimorfizmusok

Az online adatbázisok segítségével kiválasztott négy SCD1 promóterpolimorfizmus hatását *in vitro* luciferáz riporter

rendszerben vizsgáltuk HEK293T, illetve HepG2 sejtvonalakon. Bár önmagában egyik SNP sem módosított a promóteraktivitáson, zsírsavak jelenlétében az rs1054411 SNP funkcionálisnak bizonyult. Elaidátkezelés mellett az rs1054411 G allélja szignifikáns mértékben növelte a luciferáz aktivitást a vad típusú allélhoz képest HEK293T és HepG2 sejtekben egyaránt.

Az *SCD1* promóterén számos TF-kötőhely és kiterjedt szabályozási régió felelős az enzim génexpressziójának finomhangolásáért. Megvizsgáltuk, hogy az SNP-k befolyásolják-e ezek bármelyikét. *In silico* predikció alapján az rs1054411 G alléljának jelenlétében jelentősen csökken az ETS1 TF kötődési affinitása az *SCD1* promóterhez. Ezt a hatást *in vitro* sejtes rendszerben is alátámasztottuk. Az rs1054411 vad típusú alléljának jelenlétében az *SCD1* promóter konstrukcióval, valamint az ETS1 expressziós vektorral kotranszfektált mintákban a növekvő mennyiségű ETS1 növekvő mértékű promóteraktivitást eredményezett. Bár az rs1054411 polimorf, G alléja szintén fokozta a mérhető luciferáz aktivitást, ennek mértéke jelentősen elmaradt a vad típusú allélnál tapasztaltakhoz képest gyakorlatilag minden alkalmazott ETS1-plazmidmennyiség mellett.

Végül elaidátkezelést kombinálva a vad típusú, illetve az rs1054411_G riporter vektor, valamint 100 ng ETS1 expressziós vektor kotranszfekciójával, luciferáz riporter rendszerben kimutattuk, hogy van kölcsönhatás a zsírsavak és az ETS1 *SCD1*

promóteraktivitásra gyakorolt hatása között. Az ETS1 jelenléte alapvetően fokozta az elaidát indukáló hatását, azonban csaknem felére csökkentette annak rs1054411_G allélspecifikus promóteraktivitást fokozó hatását.

4.2.2. A kódoló régió polimorfizmusa

Az *SCD1* gén kódoló régiójában található missense SNP (rs2234970) egy A>C báziscsere révén a fehérje 224-es pozíciójában metionin-leucin cserét eredményez (M224L). Bár felvetették ezen SNP összefüggését kedvezőtlen metabolikus változásokkal, funkcionálisan még nem jellemezték. Munkánk során létrehoztuk az SCD1 expressziós vektor Met224 és Leu224 változatát, valamint ezek Glu-Glu jelölt verzióját is, melyek hatását tranziensen transzfektált HEK293T és HepG2 sejtekben vizsgáltunk. Azt találtuk, hogy a Leu224 variáns mindkét sejtvonalban duplájára növelte az SCD1 mennyiségét mind fehérje-, mind mRNS-szinten. A fehérjeszerkezetek *in silico* modellezése során a Leu224 entrópiacsökkentő hatását figyeltük meg, melyet *in vitro* sejtes rendszerben is alátámasztottunk. Cikloheximidkezelést követően a Leu224 tartalmú SCD1 fehérje szignifikánsan lassabban bomlott le a Met224 változathoz képest. A polimorfizmus következtében létrejövő A→C báziscsere az mRNS szerkezetében egy stabilizáló, extra hurok kialakulását eredményezte *in silico*, mely stabilitásfokozódás aktinomicinD-kezelést követően *in vitro* sejtes rendszerben is mérhetővé vált. Így

igazoltuk, hogy a Leu224 variáns megnövekedett mRNS-stabilitása és csökkent fehérjedegradációja egyaránt hozzájárul a magasabb intracelluláris SCD1-szintekhez.

Megvizsgáltuk, hogy a polimorfizmus jelenléte változtat-e a zsírsavak (palmitát, oleát, linoleát, palmitoleát, sztearát) SCD1-mennyiségre gyakorolt hatásán. A Met224 allél esetén egyik zsírsav sem befolyásolta a fehérje- és az mRNS-szinteket. A Leu224 variáns mennyisége azonban az összes általunk használt zsírsav hatására megemelkedett, különösen a palmitoleátra, a linoleátra és a sztearátra, melyek esetében a fehérjemennyiség a kontrollhoz képest rendre 3-szoros, 4-szeres, illetve 6-szoros növekedést mutatott.

Az SCD1 missense variáns deszaturáz aktivitását transzfektált HEK293T sejtek zsírsavtartalmának GC-FID módszerrel történő mérésével követtük. Amint az a magasabb fehérjeszintekből várható volt, a Leu224 SCD1 expressziós konstrukcióval történő transzfekció szignifikánsan növelte a telítetlen : telített zsírsavarányt a Met224 SCD1-hez képest, ami a sejtek deszaturáz aktivitásának növekedését jelzi.

Annak kiderítése érdekében, hogy a megfigyelt különbségek a 224. pozícióban található metionin eltűnésének, vagy a leucin megjelenésének eredménye, létrehoztunk egy mesterséges Ala224 variánst. Mivel az Ala224 variáns intracelluláris fehérje- és mRNS-szintjei a Met224-ével azonosnak adódtak, arra

következtettünk, hogy a megnövekedett mRNS-stabilitás a Leu-kódoló allélban a citozin bázis megjelenésének tudható be. Azonban a mesterséges Ala224 variáns esetében lassabb fehérjedegradációt mutattunk ki, így vélhetően a fehérjestabilizáló hatás a metionin oldallánc eliminációjának köszönhető. Mindezeket figyelembe véve valószínű, hogy a fehérje természetes Met224 és mesterséges Ala224 variánsainak hasonló intracelluláris mennyisége két ellentétes hatásnak köszönhető: az alacsonyabb mRNS-szintet kompenzálja az Ala224 fehérjevariáns hosszabb felezési ideje. Kimutattuk továbbá, hogy a zsírsavak fehérjeszintre gyakorolt hatása a leucin jelenlététől függ, mivel az Ala224 variáns fehérjeszintje nem mutatott szignifikáns változást a zsírsavak jelenlétében.

Bár – vélhetően az alacsony mintaszám miatt – egyik vizsgált polimorfizmus sem mutatott szignifikáns asszociációt a T2DM-mel, szerepük a kedvezőtlen metabolikus állapotok kialakulásában ennek alapján nem zárható ki. Eredményeink alapján az rs1054411 promóterpolimorfizmus és az M224L missense variáns a sejtekben elérhető SCD1-szint változtatásán keresztül befolyással lehet anyagcserebetegségek kialakulására, illetve az ezekre irányuló kezelések hatékonyságára.

5. Következtetések

A telített zsírsavak telítetlenné alakításának sebességmeghatározó lépését a humán sztearil-KoA-deszaturáz 1 enzim végzi. Munkánk során ezen SCD1 enzim transzkripció szabályozását és genetikai polimorfizmusainak hatását vizsgáltuk. Főbb megállapításaink a következők:

1. Vizsgáltuk a különböző típusú zsírsavak hatását az SCD1 expressziójára HEK293T és HepG2 sejtekben. Amellett, hogy a korábbi irodalmi adatokat alátámasztottuk, szignifikáns különbséget találtunk a két transzzsírsav hatása között. Míg a vakcenát inkább csökkenti, addig az elaidát jelentősen növeli az SCD1 mennyiséget mind fehérje-, mind mRNS-mennyiség, mind a promóter aktivitásának szintjén.
2. Az *SCD1* promóter leggyakoribb polimorfizmusainak (rs1054411, rs670213, rs2275657 és rs2275656) funkcionális elemzéséhez riporter konstrukciókat hoztunk létre.
 - a. Bár önmagában a négy promóterpolimorfizmus nem módosította a promóter alap aktivitását, változásokat észleltünk egyes zsírsavak jelenlétében. Míg a többi SNP-nek változatosabb hatásai voltak, az rs1054411 az összes vizsgált zsírsav jelenlétében jelentősen fokozta a promóter aktivitását.

- b. Igazoltuk *in silico* és *in vitro* is, hogy a vad típushoz képest az rs1054411_G allél szignifikánsan (több mint 20%-kal) csökkenti az ETS1 TF kötődését a promóterhez. Továbbá megfigyeltük, hogy az elaidát növeli az ETS1 kötődését az SNP-t tartalmazó SCD1 variánshoz, bár maga az SNP ellentétes hatása mérsékli ezt a növekedést.
3. Az SCD1 kódoló régiójában található M224L (rs2234970) missense SNP jellemzésére expressziós vektor konstrukciókat hoztunk létre, és a következő eredményeket kaptuk:
- i. A Leu224 allél esetén az mRNA stabilitása fokozódott és csökkent a fehérje proteasomális degradációjának mértéke. Ezen felül a Leu224 variáns intracelluláris fehérjeszintje zsírsavak jelenlétében a többszörösére emelkedett.
 - ii. Azt is kimutattuk, hogy a Leu224 allél jelenlétében a deszaturáz aktivitás is növekedett a sejtben.
4. Bár egyik vizsgált polimorfizmus sem mutatott szignifikáns összefüggést a T2DM-mel, nem zárható ki e polimorfizmusok szerepe egyes metabolikus betegségek kialakulásában.

6. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó saját közlemények listája:

1. **Tibori, K.** *et al.* (2022). Molecular Mechanisms Underlying the Elevated Expression of a Potentially Type 2 Diabetes Mellitus Associated SCD1 Variant. International journal of molecular sciences, 23(11), 6221. <https://doi.org/10.3390/ijms23116221>. **IF: 5,6**
2. **Tibori, K., Zámbó, V.** *et al.* (2024). Allele-specific effect of various dietary fatty acids and ETS1 transcription factor on SCD1 expression. Scientific reports, 14(1), 177. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-50700-5>. **IF: 3,8**

A disszertációtól független saját közlemények listája:

1. Sarnyai, F., **Tibori, K.** *et al.* (2022). Different Metabolism and Toxicity of TRANS Fatty Acids, Elaidate and Vaccenate Compared to *Cis*-Oleate in HepG2 Cells. International journal of molecular sciences, 23(13), 7298. <https://doi.org/10.3390/ijms23137298>. **IF: 5.6**
2. Zámbó, V., **Tibori, K.** *et al.* (2022). A Single Nucleotide Polymorphism (rs3811792) Affecting Human SCD5 Promoter Activity Is Associated with Diabetes Mellitus. Genes, 13(10), 1784. <https://doi.org/10.3390/genes13101784>. **IF: 3.5**

Σ IF: 18,5