

Epigenetikus szabályozó faktorok azonosítása és jellemzése

***Drosophila melanogaster*-ben**

Ph.D. értekezés tézisei

Honti Viktor

Témavezető: Dr. Gyurkovics Henrik

Magyar Tudományos Akadémia

Szegedi Biológiai Központ

Genetikai Intézet

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar, Genetikai Tanszék

Szeged, 2009.

ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A magasabbrendű eukarióta szervezetek minden egyes sejtje ugyanazt a genetikai információt hordozza, ám ez a különböző sejtekben különféle módon használódik fel. A különböző sejtek fejlődési programjuknak megfelelően epigenetikus faktorok segítségével különböző géneket expresszálnak, vagy kapcsolnak ki. Ha ez a specifikus génexpressziós mintázat időben vagy térben nem megfelelően jön létre, a morfológiai fejlődés hibákat szenvedhet. A fejlődésbiológia, azon belül is a fejlődésgenetika fő feladata azon genetikai szabályzási utak feltérképezése, amelyek a különböző sejtvonalak génexpressziós mintázatát időben és térben kialakítják, illetve fenntartják, így biztosítva a sejtek determinációját, illetve a későbbi feladatukra való specializációját.

A génexpresszió epigenetikus determinációjának létrejöttéhez elengedhetetlen a korai morfogén faktorok megfelelő eloszlása, ez azonban nem elegendő a zavartalan biokémiai és morfológiai differenciálódáshoz, a korai faktorok által kialakított génexpressziós mintázatot időben és térben fenn kell tartani az egyedfejlődés során.

Az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) nagyon hasznos modellnek bizonyult ahhoz, hogy megérthessük a sejtek korai determinációjának, illetve a létrejött génexpressziós mintázat fenntartásának mechanizmusait. Az is bebizonyosodott, hogy az ecetmuslica egyedfejlődéséről szerzett ismeretek hatékonyan hozzájárulnak az emlősök egyedfejlődésének genetikai szempontból való vizsgálatához, mert nem csupán a génexpressziós mintázat fenntartásának mechanizmusa hasonló az ecetmuslicában és az emlősökben, de ezen mintázat konzerválását biztosító epigenetikus faktorok is homológiát mutatnak.

A homeotikus gének olyan konzervált mestergének (transzkripció regulátorok), melyek az egyedfejlődés során korán bekapcsolnak, és mindvégig aktívak maradnak.

Expressziójuk szelvény-specifikus, szerepük az, hogy az általuk szabályozott végrehajtó géneken keresztül kialakítsák az adott szelvény identitását.

A *Drosophila melanogaster* homeotikus génjei két nagy homeotikus génkomplexet alkotnak. Az *Antennapedia*-komplex (ANT-C) a fejtől a középtorig, a *bithorax*-komplex (BX-C) a középtortól hátrafelé elhelyezkedő szelvények identitásának kialakításáért felelős.

A BX-C három homeotikus gént kódol (*Ultrabithorax*, *abdominal-A*, *Abdominal-B*), melyek a komplex hatása alatt álló szelvények identitását nagy kiterjedésű, szelvény-specifikus *cis*-regulátor elemek segítségével képesek meghatározni. Minden egyes szelvényben egy újabb *cis*-regulátor elem kapcsol be (válíkat nyitottá a kromatinszerkezete), és ennek hatására vagy egy újabb homeotikus gén aktiválódik, vagy az előző szelvényben is aktív homeotikus gén expressziós szintje emelkedik meg.

Ahhoz, hogy a homeotikus gének korán kialakult expressziós szintje változatlan maradjon a teljes egyedfejlődés során, két nagy géncsoport által kódolt fehérjék járulnak hozzá. A POLYCOMB-csoportba (PCG) tartozó fehérjék represszáló multimer komplexeket létrehozva a *cis*-regulátorok inaktív állapotának (zárt kromatinkonformációjának) fenntartásáért felelősek, míg a TRITHORAX-csoport (TRXG) tagjai az aktív *cis*-regulátorok (nyílt kromatinkonformációjú) állapotát tartják fenn. A POLYCOMB, illetve TRITHORAX-csoportba tartozó fehérjék támadáspontjai a homeotikus gének *cis*-regulátoraiban található PRE- (Polycomb Response Element), illetve TRE-szakaszok (TRE: Trithorax Response Element).

A transzgenikus konstrukciókba épített (eredeti genomikus környezetétől izolált) PRE-szakaszok segítségével lehetővé válik a PRE-kon felépülő fehérjekomplexek tagjainak megismerése és működésének genetikai vizsgálata. A konstrukcióba épített riportergén expressziója párosodás-függő módon érzékeny a *Polycomb*-, illetve a *trithorax*-csoportba tartozó gének dózisára: a *Polycomb*-csoport mutációi sötétítik, míg a *trithorax*-csoport

mutációi világosítják a transzgenikus konstrukcióra nézve homozigóta állatok szemszínét. Kísérleteink során olyan transzgenikus konstrukciókat használtunk, melyek a *miniwhite* riportergén és annak enhanszere között az *iab-7* PRE (az *infraabdominal-7* *cisz*-regulátorban, a *Fab-7* boundary közelében található PRE) egy hosszabb, illetve egy rövidebb, a PRE funkcióhoz minimálisan elengedhetetlen szakaszát tartalmazták beépítve.

Munkánk egyik fő célja az volt, hogy mutagenézis kísérletek végzésével a *Polycomb*- és a *trithorax*-csoport eddig ismeretlen tagjait azonosítsuk, illetve az újonnan azonosított allélok segítségével további ismereteket szerezzünk a homeotikus gének *cisz*-regulátorainak szerkezetéről és a rajtuk felépülő fehérjekomplexek működéséről. Emellett létre kívántunk hozni egy olyan eszközzrendszert, mely lehetővé teszi az *iab-7* PRE és TRE eddigiekénél finomabb felbontású vizsgálatát.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

Klasszikus genetikai módszerek:

- EMS mutagenézis, reverzió röntgensugárzással, mutagenézis röntgensugárzással
- mutációs analízis: letálfázis meghatározás, komplementáció, fenotípusos interakciók vizsgálata
- rekombináció, térképezés
- P-elem mobilizáció
- lárvális nyálmirigy óriáskromoszómák vizsgálata

Molekuláris módszerek:

- *in situ* hibridizáció
- transzgenikus konstrukciók klónozása és injektálása *ecetmuslica* embrióba (DNS tisztítás, restriktív emésztés, PCR, gél elektroforézis, fragment izolálás, ligálás, transzformálás, kompetens sejt készítése)

AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Az *iab-7* PRE tágabb környezetét tartalmazó *18.73.1* és a minimál PRE funkciót mutató DNS szakaszt tartalmazó *102.103.2* vonalak háttérében nagyszabású EMS-, illetve röntgensugárzás-indukált mutagenézis kísérletet végeztünk.

A *18.73.1* transzgenikus vonal háttérében végzett kísérletben 35 új komplementációs csoportot azonosítottunk, míg a *102.103.2* vonal háttérében 50 olyan mutációt izoláltunk, melyek mind komplementálják a *Polycomb*-, illetve a *trithorax*-csoport eddig ismert tagjainak vizsgált mutációit. A két mutagenézis kísérlet során a következő, korábban is ismert gének alléljait azonosítottuk: *Suppressor of Polycomb at 37D* (1 allél), *wingless* (3 allél), *Polycomblike* (13 allél), *Suppressor of zeste 12* (1 allél), *Posterior sex combs* (3 allél), *Sex comb on midleg* (15 allél), *verthandi* (1 allél), *Suppressor of zeste 2* (1 allél) és *male-specific lethal*-típusú allélok (2 allél). Nem azonosítottunk egyetlen *Polycomb*, *Enhancer of zeste*, vagy *trithorax* allélt sem, izoláltunk azonban a *Df(3L)kto2* deléción belül egy eddig ismeretlen komplementációs csoportot, melynek a *kohtalo2* (*kto2*) nevet adtuk (3 allél).

Sikerült azonosítanunk két eddig ismeretlen komplementációs csoportot, amelyeket - a konstrukcióban található riportergén expressziójára gyakorolt hatásuk alapján - *Fehér szem*-nek (*Fes*; 3 allél) és *Piros szem*-nek (*Pis*; 8 allél) neveztünk el.

A *Fes* allélok hatása specifikus az *iab-7* PRE szakaszra (nem hatnak az *Mcp* PRE-t tartalmazó transzgenikus konstrukcióra). A *Fes* gén a második kromoszóma bal karjára, a *black* és *purple* markergének közé térképezhető. Mivel *Fes* allélokat a csupán minimál PRE-t tartalmazó *102.103.2* vonal háttérében is sikerült azonosítanunk, lehetségesnek látszik, hogy az *iab-7* PRE közvetlen közelében, vagy azzal átfedve egy TRE-jellegű, de attól sok szempontból különböző FRE (Fes Response Element) szakasz helyezkedik el. A *Fes* genetikai interakciói is arra utalnak, hogy a FES fehérje a TRITHORAX-csoport egy eddig ismeretlen tagja.

A *Pis* gén allélikusnak bizonyult az egyik POLYCOMB-fehérjék által alkotott komplex, a PHORC (PHO Repressive Complex) hiszton-kötő tagjának, a DSFMBT fehérjének génjével. Megfigyeléseink, melyek szerint a *Pis* alléljai a *Polycomb*-csoport tagjaihoz hasonló genetikai interakciókat mutatnak, alátámasztják a biokémiai adatokat.

Az ellentmondásos fenotípusuk alapján funkciónyerésesnek tűnő allélokat röntgensugárzással revertálni próbáltuk. A reverzió több esetben is sikerrel járt. Meghatároztuk a revertánsok kromoszómáinak közös töréspontjait, majd komplementációs analízis segítségével megállapítottuk, hogy a *18.73.1* transzgenikus vonal háttérében azonosított *94A* a *grappa*, míg a *117A* a *bonus* gén mutáns allélja. A *bon*^{117A} revertánsainak segítségével az is kiderült, hogy a harmadik kromoszómán azonosított 4 tagú világosító komplementációs csoport azonos a *bonus* génnel. A reverziós kísérletek során azonosítottunk több világosító mutációt is, melyek közül 3 a *Fes* gén mutáns alléljának bizonyult, míg további 3 mutáció egy korábban ismeretlen komplementációs csoportot alkot.

A *grappa* gént korábban laboratóriumunkban már azonosították, a *grappa*^{94A} revertánsainak kromoszómális töréspontjai azonban segítettek a gén klónozásában. Az együttműködő laboratóriummal közös eredményeink alapján a GRAPPA fehérje az élesztő DOT1 fehérjével homológ, és ennek megfelelően a *Drosophila* H3 hisztonjának K79 metiltranszferáza.

A *bonus*^{117A} allél revertánsai, valamint a *bonus* génben található egyik P-elem mobilizálásával nyert allélok a transzgenikus konstrukciók háttérében trithorax-jellegű (szemszín világosító) fenotípust mutattak. Az általunk tett felismerést - miszerint a BONUS fehérje valóban a TRITHORAX-csoport tagja -, a *bonus* alléloknak a *trithorax* gén deléciójával adott interakciói is alátámasztják.

Mutagenézis kísérleteink eredményesnek bizonyultak, hiszen nem csupán a *Polycomb*- és a *trithorax*-csoport új tagjait sikerült azonosítanunk, hanem információt nyertünk az *iab-7*

PRE szakaszon megvalósuló gátlás természetéről is. Megtudtuk, hogy nincs szükség minden POLYCOMB-fehérjére a gátlás létrejöttéhez. Felvetettük annak lehetőségét, hogy az *iab-7* PRE közvetlen közelében található egy TRE-jellegű szekvencia (FRE), melyre az általunk azonosított *Fes* gén által kódolt fehérje hatása specifikusnak bizonyult. Az a felismerés, hogy számos gén (*Psc*, *Su(Pc)37D*, *vtd*) funkcióvesztéses mutációi a várttal ellentétes módon változtatják meg a transzgenikus szemszint, arra utal, hogy a POLYCOMB- és TRITHORAX-fehérjék bonyolult szabályozási hálózatot alkotva saját génjük, illetve más *Polycomb*- vagy *trithorax*-gének transzkripciós regulátoraiként működhetnek.

Mivel laboratóriumunk korábbi eredményei valószínűsítik, hogy az *iab-7* PRE szakasztól távolabb, a *Fab-7-iab-7* PRE régió MvaI-HindIII (~1200 bp) fragmentjében egy TRE is található, új transzgenikus konstrukciókat terveztünk. Az általunk tervezett négy átfedő konstrukció segítségével a jövőben szeretnénk megállapítani az említett valószínűsíthető TRE pozícióját. Mivel konstrukcióinkban a PRE-szakasz FRT (Flip Recombinase Target) szekvenciák közé klónozva helyezkedik el, lehetőség nyílik arra is, hogy a beépülések közül kiválaszthassuk azokat, amelyek esetében a bennük található PRE-szakasz nem lép kölcsönhatásba genomikus PRE-szakaszokkal, tehát valóban izoláltan működik.

Reményeink szerint a jövőben az általunk izolált mutációk és az elkészített konstrukciók segítségével lehetővé válik a *Fab-7-iab-7* PRE régió PRE- és TRE-jellegű DNS szakaszainak finomtérképezése.

KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Shanower GA, Muller M, Blanton JL, Honti V, Gyurkovics H, Schedl P. Characterization of the grappa gene, the *Drosophila* histone H3 lysine 79 methyltransferase. *Genetics*. 2005 Jan; 169(1): 173-84. IF=4,002

Honti V. Higher order chromatin structure and gene regulation in *Drosophila melanogaster*. (dissertation summary) *Acta Biologica Szegediensis*. 2003; 47 (1-4): 61.

Egyéb közlemények

Honti V, Kurucz É, Csordás G, Laurinyecz B, Márkus R, Andó I. *In vivo* detection of lamellocytes in *Drosophila melanogaster*. *Immunol Lett*. 2009 Sep 22; 126(1-2): 83-4. IF=2,858

Márkus R, Laurinyecz B, Kurucz E, Honti V, Bajusz I, Sipos B, Somogyi K, Kronhamn J, Hultmark D, Andó I. Sessile hemocytes as a hematopoietic compartment in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 24; 106(12): 4805-9. IF=9,38

Losonczy E, Bencsik K, Nagy ZF, Honti V, Szalczner E, Rajda C, Illés Z, Mátyás K, Rózsa C, Csépany T, Füvesi J, Vécsei L. Tumour necrosis factor alpha gene (TNF-alpha) -376 polymorphism in Hungarian patients with primary progressive multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2009 Mar 31; 208(1-2): 115-8. IF=3,159

Fricska-Nagy Z, Bencsik K, Rajda C, Füvesi J, Honti V, Csépany T, Dobos E, Mátyás K, Rózsa C, Komoly S, Vécsei L. Epidemiology of familial multiple sclerosis in Hungary. *Mult Scler.* 2007 Mar; 13(2): 260-1. IF=3,312

Nagy ZF, Bencsik K, Rajda C, Morvay M, Husz S, Vörös E, Rolfs A, Honti V, Dobozy A, Vécsei L. A rare manifestation of Fabry's disease. *Swiss Med Wkly.* 2007 Feb 24; 137(7-8): 130. IF=1,436

Honti V, Vécsei L. Genetic and molecular aspects of spinocerebellar ataxias. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2005 Jun; 1(2): 125-33.

Honti V, Vécsei L. A molekulák illata. Élettani-orvosi Nobel-díj. *Természet Világa* 2005 Jan; 1: 10-13.