

**Egy Polycomb Response Element (PRE) *in situ*
vizsgálata *Drosophila melanogaster*-ben
génkonverzió segítségével**

Kozma Gabriella

Ph.D. tézisek

Témavezető: Dr. Sipos László

Genetikai Intézet

MTA Szegedi Biológiai Központ

Szegedi Tudományegyetem

Biológia Doktori Iskola

Szeged, 2008.

BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Az egyedfejlődés központi folyamata a szervezetet alkotó sejtek osztódása és differenciációja. A sejtek differenciálódását a tudomány leginkább annak meghatározásával tudja jellemezni, hogy a mintázatképződési folyamatok során génkészletükből pontosan mely géneket fejezik ki. A specifikus génkifejeződési konfigurációk átadását az utódsejteknek a belső “sejtmemória” biztosítja, ezáltal lehetővé válik az embriogenezis kezdetén meghatározott fejlődési programok megőrzése az egyedfejlődés végéig. A *Drosophila melanogaster* kiváló modellszervezet a “sejtmemória” molekuláris mechanizmusainak tanulmányozására, hiszen számos olyan génjét ismerjük, amely adott fejlődési állapotok meghatározásáért felelős. Ilyenek például a konzervált homeotikus gének, valamint az azok kromatin-szerkezetét szabályozó Polycomb (*PcG*) és trithorax csoportba (*trxG*) tartozó gének. Ha ezekben a génekben mutáció következik be, bizonyos testszelvények helyett másfajta szelvények alakulnak ki az élőlényekben. A PcG fehérjék negatív szabályozók: az ún. Polycomb Response Element-ekhez (PRE-k) kötődve tartják célgénjeiket transzkripcionálisan inaktív állapotban. A TrxG fehérjék pozitív szabályozók: az ún. Trithorax Response Element-eken (TRE-k) keresztül hatnak, feladatuk a célgén aktív állapotban tartása. Mindkét fehérjecsoport hatalmas fehérjekomplexekké áll össze, amelyek különböző biokémiai módosító képességeik segítségével változásokat idéznek elő a kromatin magasabbrendű szerkezetében, és ezáltal a gének szabályozásában.

Kísérleteinkben a *Drosophila melanogaster* homeotikus bithorax komplexén belül legtöbbet tanulmányozott, ún. *bithoraxoid* Polycomb Response Element (*bx*d PRE) vizsgálatával foglalkoztunk. Ismert, hogy a PRE-k nagy távolságokból is képesek egymással kölcsönhatni, ennek ellenére korábban minden esetben transzgenikus konstrukciókba építve, különböző riportergének segítségével tanulmányozták ezt a régiót, *in situ* vizsgálatokat alig végeztek. A PRE-k tesztrendszerrel függően gyakran más méretűnek adódtak, sőt az eredmények időnként egymásnak is ellentmondtak. Mivel a PRE-k egymással együttműködve fejtik ki hatásukat és különböző kromoszomális környezetekben eltérően viselkednek, elhatároztuk, hogy az eredeti helyén, *in situ* deléciók segítségével tanulmányozzuk a *bx*d PRE/TRE 3 kb nagyságú régióját. E cél megvalósításához kifejlesztettünk egy új típusú, P-elem közvetítette génkonverzió alapuló helyspecifikus mutagenézis módszert. Továbbá a *bx*d PRE-t kicseréltük más, korábban azonosított PRE-szakaszokra, és megvizsgáltuk, hogy azok képesek-e betölteni a *bx*d PRE szerepét. A *bx*d PRE esszenciális részében található fehérje-kötőhelyek szelektív elrontásával tisztáztuk ezen motívumok hozzájárulását a PRE működéséhez. Kizárólag a csoportunk által kifejlesztett technikával lehetséges egy markergén célzott beépítése a genom egy meghatározott pontjára, majd a markergén mellett elhelyezkedő, tetszőleges méretű DNS-szakasz eltávolítása. Kísérleteinkben ilyen módon a *Gal4-VP16* markergént ültettük be a *bx*d PRE/TRE

különböző módosított változataiba, majd az *UAS-eGFP* rendszerrel kombinálva felhasználtuk a *bx1* PRE magasabbrendű, lokális kromatinszerkezetének tanulmányozására.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Rekombináns DNS-technikák

- Polimeráz-láncreakció (PCR)
- Restriktív emésztés
- Agaróz gélelektroforézis
- Plazmid- és DNS-fragmentum-tisztítás
- DNS-fragmentumok ligálása
- Baktérium-transzformáció
- Restriktív hasítók helyek célzott elrontása
- Southern blotting

***Drosophila* embrió-injektálás**

***Drosophila* keresztezések**

- Konvertánsok azonosítása
- Deléciók létrehozása FRT/Flip módszerrel és *I-SceI* restriktív endonukleázzal
- Rekombináció kromoszóma-karok között FRT/Flip rekombinációval

Fenotípus-analízis

- felnőtt legyek fenotípusainak kiértékelése
- lárvális kutikula előkészítése és fényképezése

Immunfestés embriókon és lárvákon

Számítógépes szekvencia-elemzések

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

1. A *bxd* PRE *in situ* deléciós tanulmányozásához először kifejlesztettünk egy új, *Drosophila*-ban használatos, P-elem közvetítette génkonverziós módszert. Kétféle konstrukciót készítettünk, amelyek templátul szolgáltak a génkonverzióhoz. Az egyik típusú konstrukció segítségével FRT (Flip recognition target) szekvenciák közé helyeztünk az általunk kiválasztott, eltávolítandó kis genomi DNS-szakaszt, amelyet a konverziót követően Flip/FRT-rekombináció indukálásával kivágtunk a kromoszómából. A másik típusú konstrukció segítségével *I-SceI*-hasítóhelyet építettünk a *bxd* PRE egy tetszőleges pozíciójába. Ebben az esetben a hasítóhelytől kiinduló, random méretű deléciókat hoztunk létre a konverziós kromoszóma *I-SceI* enzimmel történő hasításával. Mindkét esetben – a korábban alkalmazott génkonverziós módszerhez képest – megnöveltük a technika hatékonyságát azzal, hogy markergént építettünk a konstrukciókba, amellyel követni tudtunk mind a konverzió, mind a deléció létrejöttét. A deléciós kromoszómában maradó FRT-helyeket felhasználtuk az egyes deléciók összekapcsolására és duplikációk létrehozására.

2. Korábban három, potenciális PRE-aktivitással rendelkező szakaszt azonosítottak immunoprecipitáció segítségével a *bxd* PRE/TRE 3 kb-os régiójában. Eredményeink alapján azonban csak a középső eltávolítása ($\Delta 1-2$, 665 bp) csökkenti le a *bxd* PRE működését észrevehető módon. Azok a legyek, amelyek heterozigóta formában hordozták ezt a deléciót, ~64 % -os gyakorisággal poszterior irányú transzformációkat mutattak. Jellemzően a szárny billérré és/vagy a 3. torszelvény 1. potrohszelvénnyé történő részleges transzformációját figyeltük meg rajtuk. A mutáns fenotípusok azt jelzik, hogy ezekben a legyekben az 5. paraszelvény (PS5) 6. paraszelvénnyé (PS6) transzformálódott. A fenti eredményeknek megfelelően nem tapasztaltunk növekedést a fenotípus penetranciájában akkor sem, amikor a deléció méretét kiterjesztettük a teljes 3 kb-os régióra ($\Delta 7-13$).

3. A korábbi transzgenikus kísérletek eredményei alapján a 3 kb-t kiejtő $\Delta 7-13$ deléció nemcsak a PRE-kat, hanem minden ismert TRE-t is eltávolítja a *bxd* szabályozó-régióból. Noha a TRE-k eltávolításától a szabályozott gén (*Ubx*) kifejeződésének csökkenését várnánk, a $\Delta 7-13$ homozigótákban mégsem tapasztaltuk anterior irányú transzformációk megjelenését, amely ezt jelezte volna számunkra. Ahogyan azt más csoportok eredményei is sugallták, mi is arra következtettünk, hogy a TRE-k szerepe az, hogy ellensúlyozzák a PRE-k inaktíváló hatását azokban a szelvényekben, ahol az őket tartalmazó szabályozó-régióknak aktívnak kell lennie. Megerősítjük tehát azokat a következtetéseket, melyek szerint a TRE-k – a korábbi, széleskörben elterjedt nézettel szemben – antirepresszorként, és nem koaktivátorként működnek.

4. Annak érdekében, hogy tovább szűkítsük a *bxd* PRE működéséhez szükséges szakasz méretét, létrehoztunk három olyan deléciót, amely a Δ 1-2 által lefedett DNS-fragmentum alrészeit távolítja el (Δ 10, 280 bp; Δ 17, 185 bp; Δ 12, 127 bp). A Δ 17 volt a legkisebb méretű, amely még mindig poszterior transzformációkat okozott a legyek 22 %-ában. Ha ennek a 185 bp-os szakasznak bármely részét épen hagytuk, nem tapasztaltunk transzformációkat még akkor sem, ha egyúttal a szomszédos szekvenciákat is kivágtuk. Ezért a 185 bp-os szakaszt elneveztük *bxd* PRE-magnak. Érdekes módon minden olyan törzsben, amelyben az egyik homológ kromoszómáról hiányzott a PRE-mag (heterozigóta), a fenotípus penetranciája az egymást követő generációkban fokozatosan csökkent. A homozigóta Δ 1-2 és Δ 10 legyekben a penetrancia közelített a 100 %-hoz, és nem változott a törzsek fenntartása során sem. A Δ 17 esetén azonban még a homozigóta törzsben is folyamatosan csökkent a penetrancia. A fenotípus expresszivitása csak a homozigóta Δ 1-2 esetén maradt állandó, a két kisebb delécióra homozigóta állatokban csökkent. Ezekből az adatokból arra következtettünk, hogy a *bxd* PRE moduláris szerkezetű. A PRE-mag szomszédságában elhelyezkedő szekvenciák részben helyettesíteni képesek a mag funkcióját. Sőt, maga a PRE-mag is redundáns modulokból épül fel, amelyek – valószínűleg a szomszédos szekvenciákkal együttműködve – teljes mértékben képesek kompenzálni a másik/többi modul kiesését a magból. Súlyosabb fenotípust tapasztaltunk a Δ 1-2 hemizigóta legyekben, mint a Δ 1-2 heterozigótákban, ami arra utal, hogy a *bxd* PRE más, a vad típusú homológ kromoszómán található szekvenciákkal (valószínűleg a *bxd* PRE-val) is együttműködik.

5. A *bxd* és *iab-7* PRE-k nagy hasonlóságot mutatnak a GAGA- és PHO-kötőhelyek mintázatában. Irodalmi adatok szerint ezen kötőhelyek fontos szereppel bírnak a PRE-k felépítésében, valamint több megtalálható belőlük az általunk definiált *bxd* PRE-magban is. A fentiekből kiindulva elhatároztuk, hogy a *bxd* PRE magját kicseréljük két másik PRE-magra (*iab-5* és *iab-7*), amelyek szintén a BX-C-ben találhatóak. Mindkét szekvencia – orientációra való tekintet nélkül – teljes mértékben képes volt helyettesíteni a *bxd* PRE-mag funkcióját, ezenkívül nem okozott semmilyen „furcsa” fenotípust, ami azt bizonyítja, hogy a PRE-k nem hordoznak magukban pozicionális információt; hanem inkább egyszerű csendesítő-elemekként (silencer) működnek. Kerestünk homológiával és hasonló kötőhely-mintázattal rendelkező DNS-szakaszokat a humán genomban is, ahol eddig még nem azonosítottak PRE-kat. Egyetlen ilyen szekvenciát találtunk (H1), majd megvizsgáltuk képes-e betölteni a *bxd* PRE-mag szerepét. A H1 nem viselkedett PRE-ként, azonban sikerült felállítottunk egy hatékony tesztrendszert, amellyel azonosíthatók (*Drosophila*) PRE-ként működő DNS-szekvenciák.

6. Három különböző, a *bxd* PRE-magban halmozottan előforduló kötőhely elrontásával megvizsgáltuk azt is, hogy az egyes kötőhelyek milyen mértékben járulnak hozzá a PRE-funkcióhoz. A GAGA- és a PHO-motívumok külön-külön történő mutáltatása viszonylag alacsony penetrancia-értékeket eredményezett, a két kötőhely együttes elrontása azonban a penetrancia tekintetében egyenértékű volt a mag teljes eltávolításával. Vagyis e két kötőhely esszenciális építőköve a *bxd* PRE-nak. Ezzel ellentétben a DSP fehérjével kapcsolatban – amelyről kimutatták, hogy szükséges az *Ubx* aktivációjához – *in situ* nem találtunk bizonyítékot arra, hogy szignifikáns szerepe lenne a *bxd* PRE működésében. Részben tudtuk tehát megerősíteni *in situ* az esszenciális PcG-kötőhelyekre vonatkozó korábbi, transzgenikus adatokat, kifejlesztettünk azonban egy olyan hatékony módszert, amely alkalmas lesz a PRE-k szekvencia-követelményeinek még pontosabb meghatározására.

7. A felnőtt legyeken tapasztalt fenotípusok kiértékelésén kívül a *bxd* régió által szabályozott *Ubx* gén kifejeződési mintázatát is vizsgáltuk embrionális és lárvális szövetek UBX-elenanyaggal történő festésével. Ezenkívül bizonyos konstrukciókba megfelelően beépített *Gal4-VP16* markergén segítségével – az UAS-eGFP-rendszeren keresztül – a *bxd* szabályozó-régió helyi kromatinszerkezetét is tanulmányozni tudtuk. A felnőtt állatok fenotípusainak megfelelően az *Ubx* gén a PS5-ben mutatott enyhébb ektopikus kifejeződést azokban a lárvákban, amelyekben legalább a magot eltávolítottuk a *bxd* PRE-ből. Az *Ubx*-szel ellentétben, az eGFP esetén nagymértékű ektopikus kifejeződést találtunk: a fehérje még a feji szelvényekben is jelen volt. A másik szembevetendő különbség a két gén kifejeződési szintjében mutatkozott: a deléciókra heterozigóta legyekben az eGFP intenzitása csökkent, míg az UBX szintje nőtt az egyszerű *Gal4-VP16*-inszerciókhoz képest. Nagyon valószínű, hogy a tapasztalt különbségek a két gén eltérő szabályozását tükrözik: a *Gal4-VP16* minden bizonnyal csupán egy szomszédos enhanszer által szabályozódik, míg az *Ubx* sokkal bonyolultabb reguláció alá esik, amely módosítja a *bxd* PRE-deléció hatásait. Modellünk szerint a *bxd* PRE fehérjéken keresztül kötődik az *Ubx* legalább egy enhanszeréhez és szabályozza annak aktivitását még azokban a szelvényekben is, ahol a *bxd* régió aktív. Tehát amellett, hogy eredményeink megerősítik a korábbi adatokat, melyek szerint a PRE-k fehérjéken keresztül a célgén promóteréhez kapcsolódnak, rámutatnak bizonyos specifikus enhanszerek ezekben a finoman szabályozott, hatalmas kromatin-komplexekben betöltött jelentős szerepére is azokban a szelvényekben, ahol az *Ubx* kifejeződik.

KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Megjelent publikációk

Kozma, G. (2005) *In situ* dissection of the bxd PRE in *Drosophila melanogaster*. *Acta Biol Szeged* **49(3-4)**, 47

Sipos, L., Kozma, G., Molnár, E. és Bender, W. (2007) *In situ* dissection of a Polycomb response element in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 12416-21.

Kozma, G., Bender, W. és Sipos, L. (2008) Replacement of a *Drosophila* Polycomb response element core, and *in situ* analysis of its DNA motifs. *Mol Genet Genomics* közlésre elfogadva, online megjelent

Konferencia-előadások és -poszterek

Kozma, G., Bender, W. , Sipos, L. (2005). A bxd PRE *in situ* vizsgálata *Drosophila melanogaster*-ben. **VI. Magyar Genetikai Kongresszus / XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok**: E79 (előadás)

Kozma, G., Sipos, L., Bender, W. (2005). *In situ* dissection of bxd PRE in *Drosophila melanogaster*. *European Drosophila Research Conference* **19**: CR15 (poszter).

Kozma, G., Bender, W. , Sipos, L. (2005). Gene conversion, site-directed mutagenesis: *In situ* dissection of a Polycomb Response Element (PRE) in *Drosophila melanogaster*. *Straub-napok* (előadás)

Kozma, G., Bender, W. , Sipos, L. (2006). *In situ* dissection of bxd PRE in *Drosophila melanogaster*. *Regional Drosophila Meeting* **12** (előadás)

Kozma, G., Bender, W. , Sipos, L. (2007). A bxd PRE *in situ* vizsgálata *Drosophila melanogaster*-ben. **VII. Magyar Genetikai Kongresszus / XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok**: P060 (poszter)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Sipos Lászlónak, aki helyet biztosított számomra a laboratóriumában és mindvégig különleges figyelmet fordított arra, hogy lelkiismeretesen támogassa munkámat. Türelme és hozzáértő oktató tevékenysége nagymértékben hozzásegített ahhoz, hogy elsajátíthassam a *bxd* PRE *in situ* vizsgálatához szükséges elméleti és gyakorlati ismereteket, és hogy ez a dolgozat létrejöhessen. Köszönöm asszisztenseinknek, Ördög Edinának, Csendes Tiborné Aninak és Berente Anikónak a lelkiismeretes, kitartó és precíz munkájukat, amellyel jelentősen hozzájárultak kísérleteink sikeréhez. Köszönöm továbbá Velkeyné Krausz Ildikónak és Deákné Pál Margitnak az embriók injektálásában nyújtott nélkülözhetetlen segítségüket. Hálával tartozom PhD-s társamnak, Molnár Enikőnek és Dr. Gyurkovics Henrik csoportjának a hasznos társalgásokért és vitákért, melyekben szinte mindig rendelkezésemre álltak. Molnár Enikőnek köszönöm a kísérletekben nyújtott segítségét is. Az együttműködő partnerünk, Dr. Welcome Bender által elkészített P-elem-gyűjtemény szintén előfeltétele volt e munka létrejöttének, valamint köszönet illeti a pályázati munkában történő közreműködéséért is. A Genetikai Intézet 6. emeletén dolgozó minden jelenlegi és volt munkatársam érdeme az a barátságos légkör, amely minden nehézséget könnyen leküzdhetővé tett.

Hálával tartozom édesanyámnak, aki mindvégig támogatta „őrült” ötletemet, mely szerint biológus akartam lenni. Köszönöm barátomnak és üzlettársamnak, Molnár Józsefnek a gondoskodását és hogy a nehéz időkben is mindig mellettem állt. Mély tisztelet és köszönet illeti a Flavon Group Kft.-t, aki lehetővé tette, hogy egészségesen, maximális energiával és „tiszta fejjel” tudjam a tudományos kutatómunka minden fázisát elvégezni. Végül, de nem utolsósorban köszönettel tartozom a Kőrösi Csoma Jógaegyesületnek, amely biztosította számomra azokat a tanításokat, amelyek segítségével egyre növekvő bölcsességgel tudom a világ dolgait szemlélni és megtapasztalni.