

**A KÍNAI HÖRCSÖG HETEROKROMATIN PROTEIN 1
(HP1) GÉNJEINEK KLÓNOZÁSA ÉS JELLEMZÉSE**

PhD értekezés tézisei

Készítette: Szakál Barnabás

Témavezető: Dr. Hadlaczky Gyula

MTA Szegedi Biológiai Központ

Genetikai Intézet

Szegedi Tudományegyetem

2004

Bevezetés

Az eukarióta sejtek örökítőanyaga a DNS, fehérjékkel alkotott komplexekben a kromatinba ágyazottan található a sejtmagban. Az örökítőanyag a sejtek osztódásakor kromoszómák formájában jelenik meg. A kromoszómákon különböző citológiai eljárások segítségével gyengén festődő (eukromatikus) és erősebben festődő (heterokromatikus) régiók különböztethetők meg. Az eukromatikus szakaszok hordozzák az átíródó gének döntő többségét, míg a heterokromatikus régiókban a DNS szorosan a kromatinba ágyazott, az expresszázó gének száma kevesebb. A heterokromatint két csoportra oszthatjuk a kromatinszerkezet molekuláris felépítése és a sejt élete folyamán mutatott megjelenése alapján: konstitutív és fakultatív heterokromatinra. A konstitutív heterokromatin a sejtek egész életciklusa során megfigyelhető, még az interfázisos magokban is, kialakításáért elsősorban az evolúciósan konzervált, három izoformával rendelkező heterokromatin protein 1 (HP1) a felelős. A fakultatív heterokromatin (pl. inaktív X kromoszóma) a sejtek élete során csak egy bizonyos fázisban alakul ki, képes a heterokromatikus állapotból visszaalakulni eukromatikus állapotba, olyan kromoszómális régió amelyben a génkifejeződés epigenetikus hatásokra lecsökken.

Konstitutív heterokromatin csaknem az összes ismert emlősfaj sejtjeiben megtalálható. A kínai hörcsög egy ritka kivétel, kromoszómáin nincsenek kiterjedt, citológiailag jól elkülöníthető konstitutív heterokromatikus régiók.

Figyelemreméltó megfigyelés azonban, hogy a CHO (kínai hörcsög ovarium) sejtekben képződött emberi szatellita DNS alapú mesterséges kromoszómák nagymértékben heterokromatikusak, továbbá CHO sejtekbe átvitt egér mesterséges kromoszómák heterokromatikusak maradnak. Ez az egyik oka annak, hogy a kínai hörcsög sejtvonalak fontos szerepet töltenek be a mesterséges kromoszóma technológiában: a hörcsög sejtekben a nagymértékben heterokromatikus szatellit DNS alapú mesterséges kromoszómák egyszerű citológia módszerekkel nyomon követhetők. Felvetődött a kérdés, hogy a heterokromatin kis mennyisége a HP1 hiányára vezethető-e vissza kínai hörcsög sejtekben? A HP1-et helyettesíti-e valamilyen speciális heterokromatin-kötő fehérje a mesterséges kromoszómákon vagy a kínai hörcsög sejtek a többi emlőssel azonos HP1-et tartalmazzak-e? Annak érdekében, hogy megválaszolhassuk ezeket a kérdéseket, megkíséreltük megklónozni a hörcsög HP1 fehérjét kódoló géneket emberi izoforma specifikus próbák segítségével.

Alkalmazott módszerek

- Rekombináns DNS technikák
- DNS izolálás tenyésztett emlőssejtekből
- DNS szekvenálás, szekvenanciaanalízis
- PCR amplifikáció
- Southern blot hibridizáció
- λ -fág könyvtár plakkehibridizációs vizsgálata
- Fehérjék elektroforetikus elválasztása denaturáló SDS gélen
- Western blotting
- Sejtvonalak tenyésztése, sejtek transzfekciója
- Fluoreszcens *in situ* hibridizáció
- C- sáv festés
- Indirekt immunfluoreszcencia

Eredmények és következtetések

A kínai hörcsög HP1 izoformái

A HP1 izoformái nem-hiszton típusú kromoszómális fehérjék, melyek alapvető szerepet játszanak a heterokromatin felépítésében. Dolgozatomban arra kerestem a választ, hogy megtalálhatók-e ezek a fehérjék a kínai hörcsög sejtjeiben is, egy olyan élőlényben, amelynek kromoszómáin csak csekély heterokromatin található. A kínai hörcsögből azonosítottuk az emberből és egérből már ismert mindhárom izoformát. cDNS-ük kódoló régióinak szekvenciája konzervatívnak bizonyult mindhárom emlősfajban, több mint 90%-os azonosságot mutattak. A cDNS-ük bázissorendje alapján származtatott aminosavszekvenciáik ugyancsak konzervatívak voltak: a HP1 γ teljesen megegyezett mindhárom fajban, a chHP1 α és chHP1 β csupán egyetlen aminosavban különböztek egér homológjaiktól, míg a chHP1 α és az emberi HP1^{H α} fehérjeszekvenciájában mindössze 5 aminosav eltérést találtunk. A konzervatív funkcionális szakaszokban csupán egyetlen különbség volt, de ez nem olyan aminosavat érintett, amelynek fontos szerepe van a „chromodomain” MetH3K9 hiszton kötésében, vagy e szerkezeti elem háromdimenziós szerkezetének kialakításában. A cDNS-ek szekvenciáinak konzerváltsága nem korlátozódott a kódoló régiókra, mindhárom izoforma esetében mind az 5' mind a 3' nem átírt régiókban (UTR) azonosítottunk konzervatív régiókat, ugyanakkor

más szekvenciárészek egyediek voltak. Az a tény, hogy bizonyos szekvenciák mindhárom fajban megtalálhatóak utalhat valamilyen funkcionális szerepre, ezeket a funkciókat azonban egyelőre nem ismerjük.

A kínai hörcsög HP1 α génje

A HP1 α génnek alapvető szerkezete megegyezik hörcsögben, emberben és egérben: a gén 5 exonból és az ezeket elválasztó 4 intronból áll. A fehérje átírása a második exonból kezdődik, az első exonnak vélhetően szabályozó szerepe lehet. Bár sem az intronok mérete, sem azok szekvenciái nem hasonlók a három emlősfajban, az első intronban két, a harmadik intronban egy olyan genomikus szakaszt azonosítottunk, amelyek nagyban hasonlítanak mindhárom emlősben és nem ismétlődő szekvenciákhoz tartoznak. Ezeknek a genomikus régióknak nem ismerjük a szerepét, a konzerváltságuk azonban arra utal, hogy valamilyen funkciójuk lehet, transzkripciós enhanszer vagy egyéb transzkripciós szabályozó szereppel bírhatnak.

A hörcsög HP1 α (*chHP1 α*) gén kromoszómális helyét fluoreszcens *in situ* hibridizációval határoztuk meg. FISH jelet csak a 2-es kromoszóma rövid karján kaptunk, amely arra utal, hogy a *chHP1 α* gén egy példányban van jelen a kínai hörcsögben, vagy ha több génje van, azok azonos citológiai helyzetűek. *In situ* hibridizációval kimutatható, eltérő lokalizáltságú pszeudogéneket nem találtunk a hörcsög genomban.

A kínai hörcsög HP1 izoformák lokalizációja

Kísérleteinkben a HP1 izoformák lokalizációjának vizsgálatához GFP és DsRed fúziós riporterfehérjéket alkalmaztunk, a kapott eredményeinket pedig ellenanyaggal végzett immunfestéssel megerősítettük.

A HP1 izoformáinak lokalizációját olyan hibrid sejtvonalakban vizsgáltuk, amelyek hörcsög-, valamint heterokromatikus egér-, és szatellita DNS alapú mesterséges kromoszómákat hordoztak (H1D3-1C2 sejtvonal) és megvizsgáltuk olyan sejtvonalban is, amely hörcsög- és szatellita DNS alapú mesterséges kromoszómákat (C23-Z41 sejtvonal) hordoz. Az HP1 fehérjék lokalizációját tehát teljesen azonos sejten belüli körülmények között, de különböző fajokból származó és különböző mértékben heterokromatinizálódott kromoszómarégiókon követtük nyomon, ami lehetővé teszi, hogy összevethessük az eu- és heterokromatikus régiók közti lokalizációs különbségeket. Mindhárom izoforma lokalizációját azonos kísérleti körülmények között, azonos riporterfehérjék segítségével, azonos sejttípusokon vizsgáltuk, így összevethetők egymással az egyes izoformákkal kapott lokalizációs mintázatok is. A kísérletekben natív kromoszóma- és sejtmagi preparátumokat használtunk, amelyben a hipotonizáló és keresztkötő oldatok nem befolyásolták a kromatin szerkezetét és a HP1 kromoszómális eloszlását. Megfigyeléseink alapján a HP1 mindhárom izoformája elsősorban a

heterokromatikus régiókban lokalizálódik és bár lényegesen kisebb mértékben, de mindhárom izoformát megfigyeltük eukromatikus kromoszómális régiókban is, a HP1 gamma izoforma esetében pedig a natív kromoszóma-preparátumokon egy egészen finom felbontású, sávozott eloszlást mutattunk ki.

Kísérleteinkben azt is megvizsgáltuk hogy befolyásolja-e a HP1 heterokromatinba történő kötődését az, hogy a fehérje melyik végére fuzionáljuk a riporterfehérjét. Mind a C-, mind pedig az N-terminális végre fuzionált riporter fehérjék összehasonlítható, azonos lokalizációt mutattak a natív kromoszóma-preparátumokon, azaz a fúziós partner HP1-hez viszonyított pozíciója nem befolyásolja a heterokromatikus lokalizációt.

Monoklonális ellenanyag segítségével ellenőriztük, hogy a virális promoterről termelődő chHP1 α izoforma lokalizációs mintázata megegyezik az endogén, szabályozott módon termelődő fehérje sejten belüli eloszlásával.

Annak ellenére, hogy a kínai hörcsög kromoszómáin nincs citológiai értelemben vett kiterjedt konstitutív heterokromatin, a HP1 mindhárom izoformája megtalálható hörcsög sejtekben. Ezek az izoformák szinte teljesen megegyeznek a már ismert emlős homológokkal. Lokalizációjuk alapján feltételezhető, hogy hasonló módon részt vesznek a kromatinszerkezet felépítésében, mint az ismert emlős ortológok. Eredményeink azt mutatják, hogy a heterokromatin hiánya a kínai hörcsögből nem a HP1 hiányának vagy specális aminosavösszetételének a következménye, a hörcsögsejtekben megtalálhatók

azok a fehérjekomponensek, amelyek képesek felépíteni a heterokromatint a szatellita DNS alapú mesterséges kromoszómákon.

Emberi és egér sejtekben a heterokromatint alkotó szatellita DNS túlnyomó része viszonylag rövid ismétlődő szakaszokból (<1 kb) épül fel, míg hörcsögben -eltekintve a centromerikus TTAGGG ismétlődésektől-, a szatellita szekvenciák jóval összetettebbek, az ismétlődő szakaszok egységeinek hossza messze meghaladja az emberi és egér szatelliták egységeinek hosszát. A rövid, tandem repetitív szekvenciákból felépülő humán és egér szatellita DNS alapú mesterséges kromoszómák hörcsögsejtekben heterokromatikusak. Mindezek alapján valószínű, hogy a hörcsög sejtekben a heterokromatin korlátozott mennyiségének az oka nem a HP1 hiánya vagy speciális aminosavösszetétele, hanem a kínai hörcsög kromoszómáinak speciális szatellita DNS tartalma.

A jelen doktori munkában felhasznált tudományos publikációk:

Szakal B, Cserpan I, Csonka E, Monostori E, Udvardy A, Hadlaczky G. Cloning, characterization and localization of Chinese hamster HP1 isoforms. *Chromosome Res.* 2004;12(5):483-93.

Csonka E, Cserpan I, Fodor K, Hollo G, Katona R, Kereso J, Praznovszky T, **Szakal B**, Telenius A, deJong G, Udvardy A, Hadlaczky G. Novel generation of human satellite DNA-based artificial chromosomes in mammalian cells. *J Cell Sci.* 2000 Sep;113 (Pt 18):3207-16.

A jelen doktori munkában fel nem használt tudományos publikációk:

Endre G, Kalo P, Kevei Z, Kiss P, Mihacea S, **Szakal B**, Kereszt A, Kiss GB. Genetic mapping of the non-nodulation phenotype of the mutant MN-1008 in tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*). *Mol Genet Genomics.* 2002 Feb;266(6):1012-9. Epub 2002 Jan 23.

Társszerzői nyilatkozat:

A tézisekben foglalt tudományos eredményeket a jelölt önálló tudományos eredményeinek ismerem el. Az eredményeket tudományos fokozat megszerzéséhez nem használtam fel és a továbbiakban sem kívánom felhasználni.

Hadlaczky Gyula PhD, DSc
a *J Cell Sci.* 2000 Sep;113 (Pt 18):3207-16
közlemény felelős szerzője