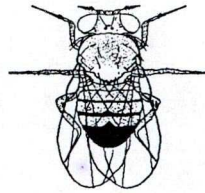
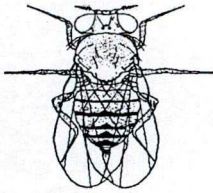


B3541

„Transz-reguláció a *Drosophila melanogaster* Abd-B doménjében”



Ph.D. értekezés tézisei



készítette: *Sipos László*

témavezető: *Dr. Gyurkovics Henrik*

MTA Szegedi Biológia Központ

Genetika Intézet

1996

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A legnagyobb köszönettel és hálával mesteremnek, *Dr. Gyurkovics Henrik*-nek tartozom, aki egyetemista korom óta témavezetőm volt. Módszertani és elméleti alapismereteim zömét Tőle kaptam, döntő hatással volt tudományos világképem és gondolkodásmódom kialakulására is.

Köszönöm *Dr. Gausz János* csoportvezetőnek, hogy lehetővé tette számomra azt, hogy tudományos diákkörös egyetemistaként majd segédmunkatársként résztvehessek a csoportjában végzett kutatásokban. Éveken keresztül figyelemmel kísérte munkámat és egyengette utamat.

Köszönöm *Apátiné Kiss Anita*, *Csendes Tiborné* és *Dongóné Gyányi Edit* asszisztenseknek a pontos és lelkiismeretes munkájukat, mellyel nagyban hozzájárultak kísérleteim sikeréhez.

Köszönöm *Dr. François Karch* külföldi együttműködő partnerünknek, hogy genfi laboratóriumában elsajátíthattam a *Drosophila*-embriók immunhisztokémiai vizsgálatához szükséges elméleti és gyakorlati ismereteket.

Köszönöm *Mihály József*-nek, hogy segítségemre volt a molekuláris munkák elvégzése során.

Köszönöm *Messerné Bajusz Izabella*, *Blastyák András* és *Dr. Györgypál „Csövi” Zoltán* kollégáimnak, hogy hasznos tanácsokkal láttak el kéziratom olvasása során.

Köszönöm a két másik „*drozis*” csoport vezetőinek, *Dr. Erdélyi Miklós*-nak és *Dr. Kiss István*-nak, valamint csoportjuk összes tagjának,

hogy mindig segítségemre voltak.

Köszönöm *Dr. Maróy Péter* tanszékvezetőnek és a *JATE Genetika Tanszék* minden munkatársának, különösen *Dr. Szidonya János*-nak, hogy lehetővé tették számomra a mikroszkópos felvételek digitalizálását.

BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

Az eukarióta élőlények örökítő anyaga kromoszómákra tagolódik. A kromoszómák anyaga, a kromatin, a DNS mellett fehérjéből és kismennyiségű RNS-ből épül fel. Számos kísérleti adat és megfigyelés igazolja, hogy ennek a nukleoprotein összetételű anyagnak rendkívül bonyolult, a sejtélete során folytonosan változó térbeli szerkezete van. Például sejtosztódáskor a kromatin rendkívül tömör szerkezetű, mely ahhoz szükséges, hogy az egyes kromoszómák el tudjanak különülni egymástól. Ettől eltérően, az interfázis alatt a lazább kromatin-szerkezet az egyes gének működését teszi lehetővé. Valószínű, hogy e két feladat ellátása mellett a kromatin-szerkezet azonossága biztosítja azt, hogy a homológ kromoszómák párosodjanak egymással a meiózis korai szakaszában.

A homológ kromoszómák a *Drosophila* és más *Diptera* rovarok testi sejtjeiben a mitózis során is párt alkotnak. Ez a kapcsolat az interfázisban is fennmarad, ami jól megfigyelhető a *musca* nem osztódó, politén sejtjeiben kialakuló óriáskromoszómák révén. A széleskörű citológiai vizsgálatok során kiderült, hogy a párosodás megszűnik a kromoszóma egyes szakaszain, ha

az egyik homológ szerkezeti átrendeződések (kromoszóma-mutációk) található. Ezzel egyidőben felismerték, hogy egyes mutációk okozta fenotípus függ a homológ kromoszómák szomatikus párosodásától. Ezt a jelenséget *transzvekciónak* nevezik.

A homológ kromoszómák párosodásának szerepéről és a transzvekciónak jelentőségéről alkotott vélemények igen eltérőek. Egyes szerzők szerint a transzvekciónak alapvető, kulcsfontosságú folyamat politén sejtekben a génműködés összehangolásában, diploid sejtekben pedig a transzvekciónak a túlélési esély lehet, a „mentőőv” szerepét töltheti be a létrejövő komplementáció révén. Ezzel ellentétben, más vélemények szerint a transzvekciónak nem egy speciális feladat ellátására kifejlesztett biológiai képesség, hanem azért létezik, mert olyan faktorokat használ, amelyek elsődleges szerepe más, alapvető biológiai folyamatokban való részvétel, a transzvekciónak pedig csak „melléktermék”. Ez alapján a párosodás egyik feladata épp az lehet, hogy kizárja a transzvekciónak ott, ahol az káros lenne (például nem adekvát promóterek és enhanszerek kölcsönhatása esetén). Az kétségkívül igaz, hogy transzvekciónak kimutatni eddig csak akkor sikerült, ha legalább az egyik homológ kromoszóma mutáns allélt hordozott. Homozigóta vad allélok esetében látszólag semmilyen következménye nincs annak, ha a homológok nem párosodnak. Előfordulhat azonban, hogy az egyes fenotípusos jellegek nem reagálnak elég érzékenyen a párosodás hiányában bekövetkező finom génműködésbeli változásokra. Ezt igazolni látszanak a legújabb molekuláris vizsgálatok, melyek során kimutatták, hogy egy adott

gén kifejeződésének mértéke jelentősen lecsökken mindkét homológon, ha a homológ kromoszómák párosodása átrendeződések következtében meggyengül. Úgy tűnik tehát, hogy a normális szintű transzkripció aktiválásához szükség van a homológok párosodására.

Egyre több adat utal arra, hogy a homológ kromoszómák szomatikus párosodása és a transzvekción nem kizárólag az *ecetmuslica* sajátosságai, hanem növényekben, állatokban és emberben is előfordulnak. Ennek köszönhetően e két biológiai jelenség okának megismerése a kutatások középpontjába került. Az ilyen jellegű vizsgálatokat megnehezíti, hogy a transzvekción hatásmechanizmusa különböző gének esetében más és más lehet (például a kromatin-szerkezet oldalirányú „tovaterjedése”, az egyik homológ kromoszómán lévő szabályozó elem kölcsönhatása a másik homológon lévő promóter régióval (ún. „transz-reguláció”), stb.). Emellett további problémát okoz, hogy a homológ kromoszómák párosodása mind aktiváló, mind inaktiváló hatást közvetíthet egyazon gén esetében is. A nehézségek ellenére, alkalmasan megválasztott kísérleti rendszerben a homológ kromoszómák párosodása és a transzvekción tanulmányozása során számos új, általános érvényű ismeretre tehetünk szert az eukarióta génműködés-szabályozás és a magasabbrendű kromatinszerkezet területén.

Értekezésem tárgya egy transzvekción alapuló jelenség, melyet mi mutattunk ki a *Drosophila melanogaster* egyik ún. *homeotikus* génje, az *Abdominal-B* (*Abd-B*) esetében. Elsősorban genetikai módszerekkel, különböző mutációk segítségével részletesen tanulmányoztuk az általunk

kimutatott párosodás-függő kölcsönhatást az egyedfejlődés két eltérő stádiumában, különböző szövetekben: az embrionális mezo- és ektoder-mában valamint központi idegrendszerben (CNS), és az adult kültakarón (kutikulán). Célként az *Abd-B* doménben észlelt transzvekcíós jelenség okának és hatásmechanizmusának feltárását tűztük ki.

MIÉRT HASZNÁLNAK ECETMUSLICÁT GENETIKAI KÍSÉRLETEKBEN?

Az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) több szempontból is ideális kísérleti állat genetikai vizsgálatokhoz. Valódi soksejtes élőlény létére az élesztőével összevethető méretű a genomja, mely mindössze négy kromoszóma-párra tagolódik. Lárvális óriáskromoszómái felbecsülhetetlen értékűek citogenetikai vizsgálatokban, mivel „felnagyított” finomszerkezetük mellett még a homológ kromoszóma-párosodást is mutatják, melynek segítségével a kromoszóma szerkezeti megváltozásai (kromoszóma-mutációk) is elemezhetők. A rekombinációt kizáró, többszörös kromoszómális átrendeződések (inverziók) felhasználásával kialakított ún. „balanszer kromoszómák” és az „ellensúlyozott letális rendszer” alkalmazásával lehetséges az egyes mutációk könnyű és egyszerű, automatikus fenntartása beltenyésztett vonalakban (törzsekben). A számos rendelkezésre álló, ismert térképhelyzetű mutáció segítségével könnyű egy új, eddig ismeretlen mutáció pontos genetikai lokalizációja, azonosítása. A domináns mutációk lehetővé teszik egy-egy kromoszóma követését feno-

típus alapján akár generációkon keresztül. Mindezen rendkívüli genetikai lehetőségek mellett, az ecetmuslica nagyon könnyen kezelhető is kis (de nem túl kicsi) mérete, rövid generációs ideje, utódainak nagy száma és egyszerű tenyésztetősége miatt.

A genetika fejlődése során egyre inkább molekuláris biológiai tudománnyá vált. Az új követelményeknek megfelelően, a *Drosophila* jól használható kísérleti objektum a molekuláris szintű vizsgálatokban is.

A legfontosabb érv az ecetmuslica használata mellett az, hogy a törzsfejlődés során az alapvető biológiai folyamatokban (például a sejt életében, a testfelépítés kialakításában, a génműködés szabályozásában) résztvevő gének szerkezete és működése nagymértékben konzerválódott, így a *Drosophila* vizsgálata során összegyűjtött ismeretek jelentős részét kiterjeszthetjük más élőlényekre is. A számos, molekulárisan is ismert szerkezetű muslica-gén és a könnyen létrehozható, ún. „*transzgenikus*” muslicák segítségével fényt deríthetünk más, genetikailag nehezebben vizsgálható, kevésbé ismert élőlényekben található gének szerepére és működésére is.

Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy az ecetmuslica az egyik leggyakrabban és legjobban használható kísérleti állat genetikai, toxikológiai, biokémiai és fejlődésbiológiai kutatásokban.

AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

A magasabbrendű eukarióta-génszabályozás tanulmányozására kiválóan alkalmas az ecetmuslica *bithorax-komplex-e*, melynek finom működésbeli változásai is jól látható homeotikus transzformációt okoznak. Így például e génkomplex *Abd-B* doménjét érintő, domináns *Fab-7* mutáció hatására a muslicák hatodik potrohszelvénye (A6) hetedikké (A7) módosul. A transzformáció annak a következménye, hogy a *Fab-7* mutáció eltávolít egy kisméretű „szigetelő” elemet, mely az *Abd-B* gén két eltérő aktivitású szelvény-specifikus szabályozó eleme, az *iab-6* és az *iab-7* között helyezkedik el. Az így létrejött fúzió révén a normálisan csak az A7-ben aktív *iab-7* már az A6-ban aktiválódik, így az *Abd-B* gén kifejeződésének mértéke azonos lesz a két szelvényben. A *Fab-7* mutáció hatása hímekben igen látványos: a homozigótáknak látszólag eggyel kevesebb szelvénye van, mert az A7 nem képez kutikulát ebben a nemben. A homozigótáktól eltérően, a heterozigótákban az A6 → A7 irányú transzformáció csak részleges, a *Fab-7/+* hímek hatodik tergijének (a potrohszelvény hátoldali lemezének) a mérete körülbelül egynegyedére csökken a vad hatodik tergithez képest. Ez alapján megállapítottuk, hogy a *Fab-7/+* heterozigóta hímek hatodik tergijének mérete és az *Abd-B* géntermék A6-ban észlelt szintje között fordított arányosság áll fenn. Ezt felhasználva sikerült kimutatnunk egy eddig ismeretlen, a homológ kromoszómák párosodásától függő, transzvekcíós kölcsönhatást az *Abd-B* doménben. A különböző mutánsok keresztezéséből

származó felnőtt egyedek kutikula-vizsgálata során megállapítottuk, hogy:

- az *iab-7* szabályozó elem aktiváló hatása korlátozott, ami megoszlik a cisz- és a transz-helyzetű *Abd-B* gén között azokban a szelvényekben, melyekben csak egy aktív állapotú *iab-7* elem és két párosodó *Abd-B* gén található
- az aktiváló hatás megoszlása nem egyenlő mértékű, a cisz- helyzetű *Abd-B* génre nagyobb hányad jut
- ha a transz-helyzetű *Abd-B* gén pontmutációt hordoz, akkor párosodás-függően, dominánsan szuppresszálódik a *Fab-7* fenotípus, vagyis e jelenség a transzvekción egy esete
- a *Fab-7/Abd-B* transz-heterozigótákban az *Abd-B* mutációt hordozó kromoszómán lévő, a hatodik potrohszelvényben inaktív, párosodó *iab-7* elem nem játszik szerepet az általunk leírt transzvekción, megléte illetve hiánya esetén azonos fenotípust kapunk
- a *Fab-7* fenotípus szuppressziója annak a következménye, hogy az *iab-7* elem aktiváló hatásából a transz-helyzetű *Abd-B* génre jutó rész elvész a mutáció miatt
- a szuppresszió érzékenyen reagál (egy másik homeotikus génben, az *Ubx*-ben ismert párosodás-függő kölcsönhatásokhoz hasonlóan) a homológok párosodását gátló kromoszómális átrendeződések jelenlétére

- a szuppresszió nem észlelhető azokban a szelvényekben, melyekben a cisz- és a transz-helyzetű *iab-7* elem is aktív
- az *Abd-B* gén 5' végén upstream irányban deléció hordozó allélek eltérő mértékben, a deléció méretétől függően komplementálják az *iab-7* elemet eltávolító deléció hatását
- a komplementáció erőssége növekszik az 5' helyzetű deléciók méretével az ép *iab-7* régió egyre gyengébb cisz-, de ezáltal egyre erősebb transz-helyzetű kötődése miatt
- egy *Abd-B* gén egyidejűleg két azonos erősségű (cisz- illetve transz-helyzetű) szabályozó elemmel is kölcsönhatásba léphet, vagyis az *Ubx* génhez hasonlóan, az *Abd-B* gén is hiperaktiválható
- az *Ubx* doménben tapasztaltaktól eltérően, az általunk vizsgált mutáns-kombinációk esetében a *zeste* gén nem befolyásolja a transzvekcziót az *Abd-B* doménben

Eredményeink arra utalnak, hogy az *Abd-B* gén proximális promóterétől upstream elhelyezkedő DNS-szakasz rendkívül fontos szerepet játszik az enhanszer hatású szabályozó elemek rögzítésében. Ez a kölcsönhatás akkor is létrejön és fennmarad, ha a transzkripció iniciációs helye és a promóter régió is hiányzik. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a szűk értelemben vett promóter funkció és az enhanszert a gén 5' végéhez rögzítő mechanizmus fizikailag is elkülöníthető egymástól. Megállapítottuk, hogy a rögzítésért felelős upstream régió több kilobázis hosszú, méretétől függ a szabályozó

régiókkal kialakított kapcsolat erőssége. Ezek szerint a rögzítést végző fehérjekomplex számos elkülönülő elemből tevődik össze, melyek mind részt vesznek és együttműködnek a maximális erősségű cisz-kapcsolat kialakításában és fenntartásában. Valószínű, hogy az elemes felépítésből adódó nagyfokú stabilitás miatt az egyszer már kialakult, teljes mértékben cisz-helyzetű enhanszer-gén kapcsolat csak részlegesen, kismértékben tud átépülni transz-helyzetűvé egy dinamikus egyensúlyi állapot kialakulása során. Feltehetőleg ez lehet az oka annak, hogy az *iab-7* aktiváló hatásából nagyobb hányad jut a cisz-helyzetű *Abd-B* génre. Ezek szerint a cisz-kapcsolat az előtt alakul ki, hogy a homológ kromoszómák párosodnának egymással. Ezt igazolja megfigyelésünk, miszerint az embrionális egyedfejlődés első felében, a mezo- és ektodermában nem mutatható ki transz-reguláció, a később kialakuló központi idegrendszerben viszont igen. E szövet immun-hisztokémiai vizsgálata során megállapítottuk, hogy:

- az *iab-7* szabályozó elemen kívül az *iab-5* és *iab-6* elemek is képesek transz-regulációra
- a párosodás-függő kölcsönhatások a CNS-ben kevésbé érzékenyek a kromoszómális átrendeződések gátló hatására, mint az adult epidermiszben
- amennyiben citológiaiilag nem mutatható ki a homológ kromoszómák párosodása a nyálmirigy-sejtekben, a CNS-ben akkor is észlelhető transz-regulációra utaló, szabálytalan mintázatú festődés

Igy valószínű, hogy az embrionális CNS-ben két különböző, transz-reguláción alapuló kölcsönhatást mutattunk ki: az egyik függ a nyálmirigy-sejtekben megfigyelhető, homológ kromoszóma-párosodástól, míg a másik látszólag ettől független. Véleményünk szerint, az utóbbi esetben a transz-reguláció kialakításában fontos szerepet játszik az *iab-7* régió és az *Abd-B* gén 3' vége között elhelyezkedő, körülbelül tíz kilobázis hosszú DNS-szakasz. Feltételezzük, hogy a nukleáris kompartmentalizáció révén rendkívül nagy távolság (megabázisok) esetén is képes ez a kromoszóma-szakasz kölcsönhatásba lépni homológ párjával, ami biztosítja az *iab-7* szabályozó elem és az *Abd-B* gén között a kellő közelséget.

Vizsgálataink a fentiek megállapításán túl további, a *Drosophila*-genetikában mások számára is hasznosítható gyakorlati jelentőséggel bírnak.

A kísérleti rendszerünket használva könnyen lehet izolálni:

- kromoszómális átrendeződéseket, melyek egyik töréspontja a centromer és az *Abd-B* gén közé esik
- az *Abd-B* génen belül pontmutációkat és a gén 5' végét eltávolító deléciókat, illetve lehetőség van ezek egyszerű, gyors, megbízható elkülönítésére molekuláris vizsgálat nélkül

Az előbbieket mellett, munkánk további gyakorlati jelentősége lehet, hogy az általunk kimutatott transzvekción segítségével nyomonkövethetjük az egyes kromoszómákat embriókban és felnőtt egyedekben egyaránt, még akkor is,

ha az adott genotípusban egy extra kópia *bithorax-komplex* menekíti, maszkírozza az *Abd-B* mutációk okozta egyébként domináns fenotípust.

Értekezésem egy különleges génszabályozási mód kimutatásáról és hatásmechanizmusának feltárásáról szól. Ezt a homológ kromozómák párosodásától függő, ún. transzvekciónak jelenséget az ecetmuslica egyik homeotikus gén-családjában, a *bithorax-komplex Abd-B* doménjében vizsgáltuk a *Fab-7* mutáció segítségével. A magasabbrendű eukarióta élőlényekben (így az emberben is) a homeotikus gének hasonló szerepet töltenek be a test kialakításában, mint a *Drosophila* esetében, molekuláris szerkezetük is igen hasonló. A transzvekciónak jelensége szintén megfigyelhető más élőlényekben is, nemcsak az ecetmuslicára jellemző, speciális biológiai folyamat. Ezek alapján úgy gondolom, hogy eredményeink egy része általános érvényű lehet, hozzájárulhat az eukarióta génszabályozás egyes részleteinek megismeréséhez és megértéséhez.

KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. J. Vasquez, G. Farkas, M. Gaszner, A. Udvardy, M. Muller, K. Hagstrom, H. Gyurkovics, **L. Sipos**, J. Gausz, M. Galloni, I. Hogga, F. Karch, and P. Schedl, (1993) Genetic and Molecular Analysis of Chromatin Domains. *Cold Spring Harbour Symposia Quant. Biol.* **58**, 45-54

Impakt faktor (1996): 1.958

2. Karch, F., M. Galloni, **L. Sipos**, J. Gausz, H. Gyurkovics, and P. Schedl (1994) *Mcp* and *Fab-7*: molecular analysis of putative boundaries of *cis*-regulatory domains in the bithorax complex of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Research* **22**, 3138-3146

Impakt faktor (1996): 4.488

3. J. Mihály, I. Hogga, S. Barges, M. Galloni, R. K. Mishra, K. Hagstrom, M. Muller, P. Schedl, **L. Sipos**, J. Gausz, H. Gyurkovics and F. Karch (1998) Chromatin domain boundaries in the Bithorax complex. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci. (volt Experientia)* **54**, 60-70

Impakt faktor (1996): 1.476

4. **Sipos, L.**, J. Mihály, F. Karch, P. Schedl, J. Gausz and H. Gyurkovics (1998) Transvection in the *Drosophila Abd-B* domain: Extensive upstream sequences are involved in anchoring of distant *cis*-regulatory regions to the promoter. *Genetics*, közlésre elfogadva

Impakt faktor (1996): 4.928

Összimpakt faktor: 12.85