

Doktori értekezés tézisei

Lucerna hiszton H3 gén szabályozó régióinak vizsgálata transzgénikus növényekben

Készítette: Kelemen Zsolt

**Témavezetők:
Dr. Györgyey János
Professzor Dr. Dudits Dénes**

**Növénybiológiai Intézet
MTA Szegedi Biológiai Központ**

2002

Bevezetés

Az eukarióta sejt genomja a membránnal határolt sejtmagban helyezkedik el. A genomalkotó DNS kromoszómális méretű lineáris kettőshélix, és ún. nukleoszómaképző fehérjékkel, a hisztonokkal specifikus dezoxiribonukleoprotein (DNP) komplexet alkot. A hisztonok kis molekulatömegű, 100-200 aminosavból felépülő, erősen bázikus fehérjék. Meglehetősen konzervatív szekvenciák, ami azt jelenti, hogy aminosav-sorrendjük az evolúcióban alig változik. A DNP ötféle hisztonból épül fel: H1, H2A, H2B, H3 és H4.

Állati sejtekben a hiszton fehérjék szintézise számos szinten, komplex mechanizmusok útján szabályozott. A tipikus, replikációtól függő kifejeződést mutató hiszton gének kivételesnek számítanak abban a tekintetben, hogy nem tartalmaznak intront, és nem poliadenilált mRNS-sé íródnak át. A megfelelő hiszton fehérjemennyiség több szinten szabályozott: a transzkripció elindítása, a pre-mRNS érése, és az érett mRNS lebomlása szintjén. A transzkripcionális szabályozásban részt vevő pozitív és negatív elemeket számos emberi és a két élesztő (H2A és H2B) hiszton génben kimutatták. Ezek az elemek önmagukban elégségesek a sejtciklusspecifikus kifejeződés biztosításához, de az alapállapothoz képest csak körülbelül ötszörös erősödést biztosítanak az S-fázis során. Az mRNS 3' nemkódoló régiójában található jellemző hajtú-szerű struktúra az RNS érésének és féléletidejének befolyásolásával a hiszton fehérje mennyiségnek további 5-10 szerez növekedését biztosítja az S fázisban.

A növények esetében a merisztéma-specifikus hiszton gének poliadenilált mRNS-sé íródnak át, hosszú 3' nemkódoló régióval, melyben nem található meg az állati hiszton génekre jellemző hajtú szerkezet. Ez arra utal, hogy a növényi hiszton gének kifejeződésének szabályozása alapvetően transzkripciós szinten történhet.

A sejtciklus függő variánsok kivül a hiszton géneknek állatokban és növényekben egyaránt létezik egy másik csoportja, melyek konstitutívan fejeződnek ki, poliadenilált mRNS-sé íródnak át, intronokat tartalmaznak. Transzkripció alkalmával az átíródott szekvenciák elveszítik nukleoszómaikat, újraszerveződésükben a konstitutív hiszton gének fehérje termékei vesznek részt. Mivel erre a hiszton variánsra cserélődik ki az S-fázis specifikus géntermék, az azt

kódoló géneket összefoglaló néven kicserélődési (replacement, rHis) hiszton géneknek nevezzük.

A lucerna haploid genom három kicserélődési hiszton H3 gént tartalmaz. Ez a három gén a logaritrikus növekedés fázisában levő lucerna sejtszuspenzióban kétszer annyi hiszton fehérjét termel, mint a több, mint ötven sejtciklus-függő kifejeződésű hiszton H3 gén összesen.

Valamennyi ismert növényi hiszton gén promóterében, függetlenül azok kifejeződési mintázatától, hasonló elemek találhatók, de egyik sem tűnik felelősnek az rHis gének konstitutív kifejeződéséért. Felmerül tehát a kérdés, hogy melyek azok a további szabályozó elemek, amelyek ezt a magas szintű, sejtosztódási állapottól független kifejeződést biztosítják. A lucerna hiszton H3.2 gének 5' nem transzlálódó régiójában és intronjaiban nagy mennyiségben fordulnak elő polipirimidin/polipurin-gazdag szekvenciák (PPY/PPU), melyek nem gyakoriak a sejtciklus-függő hiszton H3 génekben. Feltételezhető, hogy ezek azok az elemek, amelyek, ha nem is kizárólagosan, de szükségesek a magas szintű, konstitutív kifejeződés biztosításához.

Ennek az érdekes és fontos szabályozással összefüggő kérdésnek a tanulmányozásához laboratóriumunkban megvannak a feltételei. A rekombináns DNS módszerek és a hatékony transzformáció különösen kedvező lehetőséget kínál e biológiai probléma tanulmányozásához. A génkifejeződés szabályozásában fellelhető törvényszerűségek megismerésén túl az előállított vektorkonstrukciók széleskörűen felhasználhatók idegen gének magas szintű kifejeztetésére transzgenikus növényekben. Ez külön jelentőséggel bír, ha el kívánjuk kerülni a virális DNS-ek használatát a géntechnológiával történő növénynevelés során.

Célkitűzések

A Sejtosztódási és Differenciálódási Csoportban a 80-as évek közepétől kezdve vizsgálják a hiszton géneket, elsősorban lucernára alapozott kísérleti rendszerekben. 1989-ban jelent meg a közlemény, amely igazolta a H3 hiszton génvariánsok meglétét lucernában. Ezt követően a cDNS klónok birtokában ki lehetett mutatni egy sejtciklus függő (H3.1) és egy konstitutív (H3.2) gén működését. A H3.1 genomikus klónját korábban szintén csoportunkban izolálták, és később igazolták az osztódási állapottól függő promóterműködést. A konstitutív cDNS variáns genomikus megfelelőjét izolálva vált lehetővé e gén működését befolyásoló elemek jellemzése és felhasználása.

A szekvencia adatok alapján elkülöníthető az 5' végi promóter régió (a transzkripció kezdőpontjához viszonyítva –482 és –1 bázispárok között), három intron (555 és 668; 746 és 962; 1053 és 1174 bázispárok között), valamint a 3' nemtranszlálódó régió (1346 és 1676 bázispárok között).

Az elmúlt évek kutatási eredményei alapján bebizonyosodott, hogy a sejtciklus-függő hiszton gének S-fázisos és merisztéma-specifikus kifejeződése meghatározott szekvencia elemeknek köszönhető, melyek a promóteren a transzkripció startponttól számított 300 bázispáron belül, 5' irányban helyezkednek el. Meglepő módon ezen motívumok többsége szintén megtalálható a konstitutívan működő lucerna hiszton H3.2 génben. Ezek közé tartozik az úgynevezett nonamer motívum (CCATCN₀₋₂CANC), egy szabályozó elem, melyről kimutatták, hogy kapcsolódik egy, az S-fázis indukálta génexpresszióhoz elengedhetetlenül szükséges fehérjéhez. Annak ellenére, hogy a H3.2 gének tartalmaznak a replikáció-függő variánsokra jellemző promóter elemeket, *Northern* analízis világosan mutatta ezen gének konstitutív kifejeződését, egy, a sejtciklus-függő H3.1 génekét messze meghaladó egyensúlyi mRNS szinttel.

Az irodalomban számos közlemény foglalkozik a hiszton gének expressziójával, annak szabályozásával, a szabályozásban részt vevő *cisz* és *transz* faktorok azonosításával, jellemzésével. Ezek a kísérletek azonban elsősorban az S-fázis specifikus, sejtciklus függő kifejeződésű hiszton gének vizsgálatára korlátozottak. Nem vizsgálják azt a kérdést, hogy annak ellenére, hogy az rHis gének (a mi esetünkben a lucerna H3.2) promóterében megtalálhatók azok a *cisz* szabályozó

elemek, melyek bizonyítottan az S-fázis specifikus kifejeződésért felelősek, ezek a gének mégis konstitutívan, magas szinten fejeződnek ki.

A virális promóterek használata transzgenikus növények előállítására számos problémát jelenthet. Ezek közé tartozik például a megemelkedett rekombinációs gyakoriság, fontos transzgének elhallgatása (silencing), és a vírus eredetű szekvenciákkal szemben megfigyelhető ellenérzés. A hiszton gének több kópiában fordulnak elő a genomban, az evolúció során nem váltak gén inaktiváció tárgyává. A replacement H3 gének valamennyi növényfajban megtalálhatók, és magas szinten, konstitutívan fejeződnek ki. A gén promóterében és intronjaiban olyan szekvenciák találhatóak, melyek feltételezhetően megakadályozzák az olyan kromatinszerkezet kialakulását, amely a génműködés gátlásáért felelős.

Az elmondottak alapján munkánk kezdetén kitűzött céljaink két fő pont köré csoportosíthatók:

1. Megválaszolandó kérdésként merült fel, hogy az izolált lucerna H3.2 promóter is képes-e a konstitutív, magas szintű kifejeződést biztosítani a hozzá kapcsolt riporter génnek? A gén intronja, 3' nemkódoló régiója képes-e befolyásolni, megváltoztatni az expressziót? A CT gazdag szekvenciák, melyek a gén 5' nemkódoló régiójában és intronjaiban találhatóak hatással vannak-e a merisztéma-specifikus lucerna H3.1 promóter működésére?

2. Tanulmányoztuk továbbá, hogy az említett szabályozó régiók egyenként és kombinációkban alkalmasak-e új vektormolekulák kifejlesztésére, amelyek lehetővé tehetik idegen gének működtetését a növényi sejtekben, szövetekben, valamint a saját gének expressziós mértékének, vagy térbeli, időbeli mintázatának megváltoztatását. Ezért célul tűztük ki, hogy az izolált konstitutív génvariáns szabályozó régióinak felhasználásával széles gazdaspecificitású, konstitutív expressziót biztosító növényi expressziós vektort állítsunk elő.

Alkalmazott módszerek

A plazmid konstrukciókat az általánosan használt rekombináns DNS technikák alkalmazásával készítettük el. A transzgénikus dohány növényeket *Agrobacterium tumefaciens* közvetített transzformációval regeneráltattuk. A tranziens expressziós kísérleteket izolált lucerna protoplastokon végeztük, direkt DNS bevitellel. A stabil transzformáns dohány növényekben a transzgén működését transzkripciós szinten *northern* hibridizációval, fehérje szinten fluorometrikus GUS aktivitás méréssel és hisztokémiai GUS festéssel vizsgáltuk

Eredmények és következtetések

Első lépésben azt vizsgáltuk, hogy az izolált, riporter génhez kapcsolt H3.2 promóter is mutatja-e a sejtciklustól független, magas szintű kifejeződést. A H3.2 gén 424 bázispárnyi promóter szakaszát a GUS riporter génhez fúzionáltattuk (pBHEX-N::GUS). Kontrollként a CaMV 35S promótert használtuk (pBI121). A konstrukciókkal *Agrobacterium tumefaciens* segítségével dohány növényeket transzformáltunk. A második generációs növények 5 centiméternél hosszabb leveléből GUS aktivitásokat mértünk. A pBHEX-N::GUS konstrukció esetében mért aktivitások átlaga alatta maradt a CaMV 35S promóter (pBI121) által mutatottnak, de az egyes vonalakat vizsgálva sok esetben elérte azt.

Az izolált hiszton H3.2 promóter szövetspecifitásának vizsgálatára transzgénikus dohány csíranövényeken hisztokémiai GUS festést végeztünk. Erős GUS festődés volt megfigyelhető a csíranövény valamennyi szövetében, ami világosan utal arra, hogy az izolált H3.2 promóter azokban a szövetekben is aktív, melyek csak kevés osztódó sejtet tartalmaznak.

Következő megválaszolendő kérdésként arra kerestük a választ, hogy mely további elemek képesek a hiszton H3.2 promóter erősségét befolyásolni. Elsősorban arra voltunk kíváncsiak, hogy a hiszton gén első, CT gazdag intronja képes-e erősíteni az izolált promóter működését. A kérdés vizsgálatára további GUS expressziós kazettákat készítettünk a hiszton H3.2 gén különböző szekvencia

részleteinek felhasználásával. A pHEX110::GUS konstrukció a pHEX-N::GUS-hoz hasonlóan tartalmazza a GUS riporter gént a lucerna hiszton H3.2 gén 424 bázispárnyi promóteréhez fúzionáltatva, a NOS terminációs szignált, valamint a transzkripcionális és a translációs kezdő pont között a hiszton gén első, CT-gazdag intronját. A harmadik vizsgálandó konstrukció megegyezett a pHEX110::GUS összeállítással, azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben a NOS terminátort a hiszton gén saját terminátorára cseréltük (pHEX111::GUS). Pozitív kontrollként a pIDS211 elnevezésű plazmidot használtuk, amely a GUS riporter gént tartalmazza transzkripcionálisan fúzionáltatva a széleskörűen alkalmazott CaMV 35S promóterhez.

A konstrukciók működését tranziens expressziós kísérletekben vizsgáltuk. Lucerna A2-es sejtszuszpenzióból származó protoplasztokat transzformáltunk. Mindhárom, hiszton promóteren alapuló konstrukció magasabb GUS aktivitásokat mutatott, mint a virális promóter. A legmagasabb aktivitás a pHEX-110::GUS konstrukció esetében volt mérhető, ami arra utal, hogy a polipirimidin-gazdag intron szekvencia felerősítette a promóter működését. Ezzel szemben NOS terminátornak a hiszton gén saját terminátorára cserélése a GUS aktivitás csökkenését okozta.

Tranziens expressziós kísérletekben a legmagasabb szintű kifejeződést a pHEX110::GUS konstrukció mutatta. A következőkben megvizsgáltuk, hogy ez a magas szintű kifejeződés kimutatható-e heterológ rendszerben, transzgénikus dohány növényekben. A második generációs növények idős, 5 centiméternél hosszabb leveléből GUS aktivitást mértünk. A CaMV 35S promóter átlagos GUS aktivitása a hiszton promóter által biztosított harmada volt.

A GUS aktivitás szöveti eloszlásának vizsgálatára a transzgénikus dohány csíranövényeken hisztokémiai GUS festést végeztünk. Erős GUS festődés volt megfigyelhető mindkét konstrukció esetében, ami világosan utal arra, hogy a pHEX-110::GUS konstrukció az intront nem tartalmazóhoz hasonlóan a csak kevés osztódó sejtet tartalmazó szövetekben is aktív.

Annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy a mért enzimaktivitások arányaikban megfelelnek-e a promóterek transzkripció aktivitásának *Northern* hibridizációt végeztünk. A megfigyelt hibridizációs jel nagysága arányaiban jó korrelációt mutatott az ugyanezen vonalakon mért GUS enzimaktivitásokkal, a mért enzimaktivitási különbségek jól tükrözik az mRNS szintű különbségeket.

Az előző kísérletekből világossá vált, hogy a CT gazdag szekvencia elemek fontos szerepet játszanak a lucerna hiszton promóter magas szintű kifejeződésében. Ha igaz az, hogy a polipirimidin szekvenciák is felelősek a H3.2 promóter konstitutív működéséért, akkor ezek a szekvenciák feltételezhetően megváltoztatják a merisztéma specifikus H3.1 promóter szövetspecifitását. Ennek vizsgálatára további konstrukciókat készítettünk a H3.1 promóter, és szintetikus, CT-gazdag oligonukleotidok felhasználásával. A három új expressziós kazetta tartalmazza a GUS riporter gént a lucerna H3.1 promóter irányítása alatt, valamint a NOS terminációs szignált. A transzkripció és transzláció kezdőpont közé a CTCTC szekvenciát tartalmazó szakaszokat építettünk be. Ez a szekvencia elem a 2CT::GUS kazetta esetében kétszer, a 4CT::GUS esetében négyszer, a 6CT::GUS esetében pedig hatszor fordul elő. Velük *Agrobacterium tumefaciens* segítségével dohány növényeket transzformáltunk. Kontrollként a H3.1 promóter – GUS – NOS kazettát hordozó plazmidot használtuk.

A GUS expresszió erősségét és szöveti megoszlását második generációs transzgenikus dohány növényeken vizsgáltuk. Jól megfigyelhető enzimaktivitás erősödés volt kimutatható CT-gazdag elemek számának a növekedésével. Annak eldöntésére, hogy vajon a CT-gazdag szekvenciák beépítése megváltoztatta-e az S-fázis specifikus hiszton promóter szövetspecifitását a transzformáns dohány növények gyökerein hisztokémiai GUS festést végeztünk. Míg a H3.1::GUS expressziós kazetta esetében csak a gyökércsúcsban volt megfigyelhető a festődés, addig a CT-gazdag szekvenciákkal kiegészített lucerna H3.1 promóter a konstitutív H3.2 promóterhez és a CaMV 35S promóterhez hasonlóan a nem osztódó szövetekben is működik, a gyökércsúcsban megfigyelhetővel közel azonos mértékben. A CT gazdag elemek képesek voltak megváltoztatni az S-fázis specifikus hiszton H3.1 promóter erősségét és szövetspecifitását, ezáltal alátámasztva azt a feltételezést, mely szerint ezek az elemek fontos szerepet játszhatnak abban, hogy a lucerna H3.2 gén a promóterében megtalálható sejtciklus-függő expresszióért felelős *cis* regulátor elemek ellenére konstitutívan, magas szinten fejeződik ki.

Az eredményeket összefoglalva az lucerna hiszton H3.2 gén szabályozó régióinak vizsgálata során kimutattuk a következőket:

1. Az izolált H3.2 promóter magas szintű, konstitutív kifejeződést biztosít a hozzá kapcsolt riporter génnek.

2. A lucerna hiszton H3.2 gén CT-gazdag, első intronja képes megnövelni az izolált promóter aktivitását, az így kialakított kiméra promóter az általánosan használt virális CaMV 35S promóter által mutatottnál magasabb riporter gén aktivitást biztosít.
3. Az izolált promóter és a genomi klón első intronjának felhasználásával egy olyan növényi expressziós kazettát hoztunk létre, mely nem tartalmaz vírus eredetű szekvenciákat, magas szintű, konstitutív kifejeződést biztosít a beépített transzgénnek, a transzgén elhallgatásának és rekombinációjának veszélye nélkül.
4. A hiszton H3.2 5' nemkódoló régiójában és intronjaiban található CT-gazdag szekvenciák képesek voltak megváltoztatni az S-fázis specifikus kifejeződésű lucerna hiszton H3 variáns (H3.1) kifejeződési mintázatát hasonlóvá téve azt a 35S promóterhez és a konstitutív variánshoz (H3.2). A CT-gazdag szekvencia elemek számának növelése a promóter aktivitásának erősödését okozta.

Az, hogy ezek a faktorok hogyan változtathatták a replikáció-függő hiszton gént konstitutívvá, egyelőre nem ismert. Mindenesetre, a *Drosophila* GAGA faktor egy lehetséges magyarázat. A GAGA fehérjék a GAGAG polipurin szekvenciát ismerik fel, függetlenül attól, hogy az a kódoló vagy a nemkódoló szálon helyezkedik el. Ezen motívumok szekvenciája nagyfokú variabilitást mutat, miközben fennmarad a gél shift és DNáz footprinting vizsgálatokkal kimutatható erős, specifikus kötés. Számos *Drosophila* gén promóterében megtalálhatóak ezek a kötőhelyek, valamint a lucerna és *Arabidopsis* rHis génekben. Kimutatták, hogy a GAGA faktor egyrészt megakadályozza a nukleoszómák kialakulását, valamint ATP jelenlétében eltávolítja azokat. Ezáltal a transzkripció faktorok számára hozzáférhetővé teszi a DNS-t és visszafordítja az erős repressziót biztosító hajtogatottságát, mely elősegíti a génátíródást.

A GAGA faktort eddig csak *Drosophilában* írták le, ahol, úgy tűnik számos gén expressziójának szabályozásában részt vesz. GAGA faktor-szerű fehérjék megtalálhatóak *Xenopus*-ban és emberben. Ha feltételezzük, hogy GAGA-szerű faktor létezik lucernában, és a *Drosophiláéval* azonos tulajdonságokkal rendelkezik, a CT-gazdag szekvenciáknak köszönhetően a lucerna H3.2 gének feltételezett nukleoszóma sűrűsége kevesebb, mint kétharmada a replikáció függő variáns esetében várhatóan. A csökkentett nukleoszóma sűrűség teljesen visszafordítja a

hiszton gének S-fázison kívüli represszióját, a legnagyobb derepressziót a promóter közelében, a gének 5' régiójának közelében mutatva.

Jelenleg nincs direkt bizonyítékunk arra nézve, hogy a PPY/PPU faktorok a növényekben kromatin derepressziót okoznának, de a transzgénikus növényeken végzett kísérleteink egybehangzanak ezzel a lehetőséggel. A PPY/PPU kötő faktorok működési módjának megértése jobb betekintést nyújthat a növényi kromatin transzkripció és génregulációs működésébe, valamint lehetőséget nyújtott arra, hogy olyan, nagy hatékonyságú növényi transzformációs konstrukciót hozzunk létre, amely védelmet nyújthat a kromatin represszió keresztül működő silencing mechanizmussal szemben.

Publikációs lista

Doktori dolgozatban felhasznált:

Kapros Tamás, Dudits Dénes, Györgyey János, Mai Antal, **Kelemen Zsolt**: Növényi génextpressziós vektor család a lucerna H3 hiszton génvariáns (Ms. H3g1) szabályozó DNS szekvencia szakaszainak felhasználásával (szabadalom; száma: P9503352)

Kelemen Zs., Mai A., Kapros T., Fehér A., Györgyey J., Jakob H. Waterborg J.H. és Dudits D. (2002) Transformation vector based on promoter and intron sequences of a replacement histone H3 gene. A tool for high, constitutive gene expression in plants Transgenic Research, elfogadva

További publikációk:

Györgyey J., Németh K., Magyar Z., **Kelemen Zs.**, Alliotte T., Inzé D. és Dudits D. (1997) Expression of a novel type small proline-rich protein gene of alfalfa is induced by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in dedifferentiated callus cells Plant Mol. Biol. 34: 593-602

Kondorosi É., Trinh H., Roudier F., Foucher F., Vaubert D., Cebolla A. Lodeiro A., Fehér Z., **Kelemen Zs.**, Györgyey J., Mergaert P., Kereszt A., Dudits D., Hirt H., Kondorosi A: Nod factor-induced cell cycle activation in root cortical cells. In: Nitrogen Fixation for the 21st Century, Eds. Elmerich C., Kondorosi A., Newton W. E., Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, pp. 189-192, 1998.

Kelemen Zs., Dudits D. és Györgyey J. (1999) Nucleotide Sequence of a cDNA Encoding a Cytosolic Small HSP from Medicago sativa: MsHsp18.3 (Accession No. X98617). (PGR99-080) Plant Physiol. 120: 634