

"A kromatinszerkezet és a génműködés *in situ* tanulmányozása a *Drosophila melanogaster Ubx* doménjében"

OTKA K 83948 Sipos László

A homeotikus *Ubx* gén egyik szabályozóelemében, a *bx*d cisz-regulátor régióban egy olyan speciális, silencer-hatású kromatinszerkezeti elem („*Polycomb Response Element*”, *PRE*) működését tanulmányoztuk *Drosophila*-ban, melynek fontos szerepe van az inaktív (zárt) kromatinszerkezet fenntartásában. Mind a homeotikus gének, mind a *PRE*-k működését szabályozó *Polycomb*-csoport homológjai ismertek magasabbrendű élőlényekben, így emberben is, ahol azoknak analóg funkciójuk van.

1. A 185 bp-os *bx*d *PRE*-mag további vizsgálata

Előzmények

Egy általunk kifejlesztett, új típusú génkonverziós módszerrel korábban végrehajtottuk a *bx*d régió egy ~3kb hosszú darabjára térképeződő *PRE in situ* funkcionális analízisét. A létrehozott kisméretű deléciókkal egy 185 bp-os szakaszra szűkítettük le a *bx*d *PRE* minimális, „központi magját”, melynek hiánya még látható, poszterior irányú homeotikus transzformációkat okoz, ami az *Ubx* gén kromatinszerkezetének rendellenes fellazulása miatt bekövetkező, ektopikus *Ubx*-expresszióval magyarázható (Sipos *et al.*, 2007, PNAS). Módszerünk továbbfejlesztésével fehérjemolekulák kötőhelyeit is képesek lettünk hibás változatokra cserélni a 185 bp-os *PRE*-magon belül, és ennek segítségével megállapítottuk, hogy a vizsgált 3 fehérje (GAGA, PHO, DSP1) közül az első kettő egymással szorosan együttműködve, kulcsszerepet tölt be az inaktív kromatinszerkezet fenntartásában. A *bx*d *PRE* magját kicseréltük két másik (*Mcp* és *iab-7*), hasonló méretű, szintén a bithorax komplex-ből származó *PRE*-magra, melyek a *bx*d *PRE*-hoz hasonló számban és elrendezésben tartalmazzák a PHO és GAGA fehérjék kötőhelyeit, mint a *bx*d *PRE* 185 bp-os magja. A két „idegen” *PRE* teljes mértékben képes volt funkcionálisan helyettesíteni a *bx*d *PRE* magját, jelenlétük nem okozott semmilyen fenotípusos változást. Ezek alapján megállapítottuk, hogy a *PRE*-k nem hordoznak pozicionális információt, hanem egyszerű „silencer”-ként viselkednek (Kozma *et al.*, 2008, MGG).

Elvégzett új kísérletek

Meg akartuk vizsgálni, hogy más, nem a bithorax komplexből származó *PRE*-k, illetve a *bx*d, *Mcp* és az *iab-7* *PRE*-ktől eltérő számú és elrendezésű GAGA és PHO kötőhelyeket tartalmazó *PRE*-k is képesek-e helyettesíteni a 185 bp-os *bx*d *PRE* magját. E célból létrehoztunk olyan konvertáns vonalakat, melyek a *bx*d *PRE*-mag helyén a *Drosophila engrailed*, *even-skipped* és *polyhomeotic* génjeiből származó *PRE*-régiókat, illetve egér és humán *PRE*-szekvenciákat hordoznak. Hogy felderítsük, vajon a GAGA és PHO fehérjéken kívül más fehérjék is szükségesek-e a *bx*d *PRE*-mag működéséhez, mutáltattuk a 185 bp-os *bx*d *PRE*-magon lévő GAGA és PHO kötőhelyek között lévő

szekvenciákat, kicserélve őket komplementer, illetve reverz komplementer megfelelőjükre.

Időközben a korábbi kísérleteinkben alkalmazottól elérő összetételű táptalaj használatára kellett áttérnünk. A lényeges különbség, hogy penészgátló szerként a korábban alkalmazott foszforsav-propionsav keverék helyett Tegosept-et (p-Hidroxibenzoosav metil-észter, Metil 4-hidroxibenzoát, Nipagin) használtunk. A propionsavról ismert, hogy befolyásolja a kromatinszerkezetet (pl. pozíció-effektus-variegáció módosító). Hogy a megváltozott táptalaj és az esetleg időközben bekövetkezett egyéb módosító faktorok hatását megvizsgáljuk, 4 független konvertáns vonalat teszteltünk le, melyekben frissen távolítottuk el a *bxd* PRE 185 bp-os magját. E kontrollkísérletekben a korábbi táptalajon mért ~25%-os gyakoriságú, poszterior irányú homeotikus transzformációk helyett nagyjából kétszeres, ~50%-os penetranciával észleltünk hasonló jellegű transzformáns egyedeket.

Az *engrailed* (*en*) gén 1,6 kb-os, „promoter-upstream” szakaszában korábban három kisméretű, a *bxd* PRE magjához hasonló méretű PRE-régiót is azonosítottak transzgenikus tesztekben (*Kassis*, 1994, Genetics). A három *en* PRE-régió (a promotertől való távolodás sorrendjében: 3-2-1) különböző mértékben, de egyaránt képes volt a *bxd* PRE 185 bp-os magjának hiányában észlelt transzformációk penetranciáját csökkenteni. Tesztünkben a leggyengébb hatású a 2. régió (~44%) volt, közepes hatású az 3. régió (~30%), míg a legerősebb, teljes mértékű helyettesítést az 1. régió esetében (0%) figyeltük meg. A GAGA kötőhely-motívumok gyakoriságának szempontjából a helyettesítés mértékével egybevágó tendenciát vettünk észre a három vizsgált *en* régióban, míg a PHO-kötőhelyek számában nem tapasztaltunk hasonló összefüggést. Ezen eredményeink alapján elmondható, hogy rendszerünk alkalmasnak tűnik arra is, hogy a PRE-hatású régiókat rendszerezhessük *in situ* derepresszió-gátló hatásuk alapján.

Az *even-skipped* (*eve*) génből származó PRE-régió két szempontból is érdekesnek bizonyult: egyrészt, hasonlóan az *en* 1. PRE-hoz, az adult fenotípus szintjén teljes mértékben meggátolta az *Ubx* gén ektopikus kifejeződését, másrészt ebben a 100%-os helyettesítést adó szakaszban csak 1 (illetve maximum 2) potenciális PHO-kötőhely található, szemben az eddig megismert, hasonló erősségű PRE-régiókkal, melyek legalább 4 PHO-kötőhelyet tartalmaznak.

A *Polycomb* csoportba tartozó *polyhomeotic* (*ph*) génből (amely önmaga is *Polycomb*-szabályozás alatt áll) származó PRE-régió meglepő módon a kontroll delécióhoz képest kismértékben ugyan (~58%), de emelte a transzformációk gyakoriságát, azaz egyáltalán nem tudta helyettesíteni a 185 bp-os *bxd* PRE magszekvenciát. Megjegyzendő azonban, hogy az általunk vizsgált, GAGA és PHO kötőhelyekben leggazdagabb régió lényegesen kisebb, mint a korábbi, transzgenikus tesztekben azonosított, a mi szakaszunkkal teljesen átfedő *ph* PRE.

Az első emlős rendszerben azonosított, egérből származó PRE-régió (*Sing et al.*, 2009, Cell) nemcsak hogy nem tudta helyettesíteni a *bxd* PRE magját, hanem a transzformációk gyakoriságát közel 100%-os gyakoriságra (~95%) emelte. Ez a hatás függetlennek bizonyult a tesztelt régió orientációjától (hasonlóan a továbbiakban említett szekvenciák tesztelése során nyert eredményeinkhez). Kicsit alacsonyabb, de szintén kiemelkedően magas (~80%) penetranciát kaptunk az első humán PRE (*Woo et al.*, 2010, Cell) tesztelése során. Ezen eredményeink azt mutatják, hogy a két, emlősrendszerben azonosított PRE nem képes együttműködni a *bxd* PRE magján kívüli, szomszédos PRE-

hatású régiókkal, sőt nagymértékben interferál azok működésével. Emellett az is igaz, hogy az emlős genomban azonosított darabok egy nagyságrenddel nagyobbak az eltávolított *bx*d PRE- magnál, .

Korábbi munkánkban (Kozma *et al.*, 2008, MGG) mutáltattuk a 185 bp-os *bx*d PRE-magban lévő GAGA és PHO kötőhelyeket külön-külön és együtt is. Míg a két kötőhely külön-külön történő elrontása csak kis gyakorisággal (~2% illetve ~4%) okozott transzformációkat, addig együttes elrontásuk esetén a penetrancia megegyezett e szakasz teljes hiányában észlelt gyakorisággal (Kozma *et al.*, 2008, MGG). Ennek ellenére azt tapasztaltuk, hogy a GAGA- és PHO-kötőhelyek között lévő szekvenciák cseréje komplementer, illetve reverz komplementer megfelelőjükre ~12% illetve ~7% gyakorisággal okozott poszterior irányú transzformációkat. Ezek alapján valószínű, hogy a GAGA és PHO kötőhelyeken kívül, más, eddig nem azonosított fehérjék kötőhelyei is szükségesek a 185 bp-os *bx*d PRE-mag normális működéséhez. A fenti adatainkat összesen 9575 adult egyed fenotípusos analízisével kaptuk.

Egyéb, a munkatervben nem szereplő elvégzett kísérletek:

- A tervezett munkán túl egy ígéretesnek tűnő lépést tettünk abba az irányba is, hogy mesterséges/szintetikus PRE-magot állítsunk elő. Az *iab-7* (66bp), a *bx*d (84bp), az *iab-8* (40bp) és az *Mcp* (94bp) PRE-magokból, a zárójelekben feltüntetett hosszúságú DNS-darabkákat a leírt sorrendben összeillesztve, egy további konstruktot is létrehoztunk, mely 284bp hosszú szakaszában 7 potenciális PHO- és 8 GAGA-kötőhelyet tartalmaz. Ez a konstrukció teljes mértékben helyettesíteni tudta a 185 bp-os *bx*d PRE magszekvenciát. Reményeink szerint a hibrid és az eredeti PRE-mag számítógépes elemzése segítségével a közeli jövőben képesek lehetünk egy teljes mértékben mesterséges, algoritmizálható, funkcionális PRE-mag létrehozására.

- A jelentős mennyiségű új adatunk ellenére úgy gondoltunk, hogy eredményeink értékét növeli, illetve közlését megkönnyítheti, ha a tesztelt PRE-fragmenteket egy másik, újonnan kidolgozott rendszerünkben is analizáljuk, noha ez eredetileg nem szerepelt a tervezett, elvégzendő kísérleteink között. Az eddig alkalmazott tesztrendszer a *bx*d PRE-től 25kb távolságra lévő, összetett szabályozás alá eső *Ubx* gén fenotípusos következményekkel járó, működésbeli megváltozását követi felnőtt állatokban. Az új rendszer lényege, hogy a beépített idegen PRE-régiókhöz *flp*-FRT rendszerrel Gal4VP16 markergént kapcsolunk és *UASeGFP* másodlagos riportergén segítségével közvetlenül tanulmányozzuk a lokális kromatinszerkezeti változásokat az egyedfejlődés eltérő stádiumaiban különböző szövetekben. Az új rendszerünk sokkal érzékenyebbnek bizonyult, akár egyetlen sejtben is ki tudtunk mutatni ektopikus génkifejeződést konfokális mikroszkópia segítségével. Sajnos több, váratlan problémába is ütköztünk, mert a rekombinánsok nagy része rossz életképességűnek, illetve sterilnek bizonyult, ezért kísérleteink egy részét többször is meg kellett ismételni. A kísérletsorozat eredetileg végző Ph.D. hallgató (Kárpáti Gábor) elhagyta csoportunkat, és egy munkánkat segítő asszisztens (Kiss Anita) is kilépett. Hogy a kieső munkaerőt pótolni tudjuk, felvettünk egy kutatót (Nagy Andrea), de így is jelentős többletmunka hárult a csoport tagjaira, ami az ígért közlemény elkészülésének elhúzódását okozta. Jelenleg is dolgozunk a kéziraton.

2. A *bxd* régióban azonosított TRE deléciók analízise

Előzmények

Az általunk részletesen vizsgált 665 bp-os *bxd* PRE-régió (Sipos et al., 2007) mellett, közvetlenül disztálisan egy rövid, mindössze 90 bp-os Trithorax-Response-Element-et (TRE-régiót) azonosítottak, amelyhez TRITHORAX-csoportba tartozó fehérjék kötődnek és ez a régió két különböző transzgenikus tesztben is erősíti a tesztgén kifejeződését (Tillib et al., 1999). Vizsgálataink során létrehoztunk olyan deléciókat is, melyek a *bxd* PRE-régióval együtt eltávolítják ezt a TRE-t is, de nem tapasztaltunk sem anterior irányú homeotikus transzformációt, sem csökkenést az *Ubx* gén kifejeződésében, sem észlelhető gyengülést a PRE hiányában bekövetkező, poszterior irányú homeotikus transzformációk penetranciájában vagy expresszivitásában. Lehetséges azonban, hogy a TRE-régió hiányának következményeit elfedi vagy kioltja a PRE-szakasz egyidejű eltávolítása miatt bekövetkező enyhe *Ubx*-upreguláció. Hogy megvizsgáljuk ennek a TRE-szakasznak a kizárólagos, önálló *in situ* hatását (pl. befolyásolja-e az *Ubx* gén működését, szükséges-e a szomszédos PRE „kikapcsolására” azokban a szelvényekben, ahol a *bxd* régió aktív), olyan deléciók létrehozását tűztük ki célul, melyek épen hagyják a szomszédos PRE-t, de különböző méretű szakaszait eltávolítják a 90 bp-os TRE-régióhoz. E célból génkonverzióval beépítettünk a *bxd* PRE és TRE régió közé egy *FRT-I-SceI-rosy+-I-SceI-FRT* kazettát, melyben a muslica *rosy* génjének vad kópiáját hordozó, 7.3 kb-os genomikus HindIII fragmentjét egy-egy 18 bp-os *I-SceI* megaendonukleáz-hasítóhely és a szintén élesztőből származó, 34 bp-os *flip-recognition-target*, FRT-szekvencia vesz közre.

Elvégzett új kísérletek

A 665bp-os *bxd* PRE és a szomszédos, 90 bp-os TRE közé épített *FRT-I-SceI-rosy+-I-SceI-FRT* kazettát hordozó konvertáns egyedekben transzgenikusan kifejezett *I-SceI*-enzim segítségével kettősszálú kromoszóma-töréseket indukáltunk. A sikeres, mindkét *I-SceI* hasítóhelynél bekövetkezett kettősszálú kromoszómatöréseket a következő generációban a *rosy* markergén elvesztése alapján azonosítottuk. Az elvégzett 320 párkeresztezésből 214 *rosy*- utódot kaptunk, melyeket több lépcsőben, különböző primerpárok felhasználásával PCR-analízisnek vetettünk alá. A vártnál kisebb méretű DNS-fragmentek esetében megszekvenáltattuk a kapott PCR-terméket. Így végül összesen 6 egyirányú, a PRE-től disztálisan induló (18, 23, 65, 200, 276 és 751 bp méretű) deléciót azonosítottunk.

Ezen deléciókra homozigóta egyedek repülőképessége jelentősen lecsökkent a vad egyedekéhez képest. Ugyanakkor a homozigóta, illetve a teljes *Ubx*-domént eltávolító delécióval transz-heterozigóta felnőtt egyedek nem mutattak olyan homeotikus transzformációkat, melyek az *Ubx* gén működésének lecsökkenésére utalnának. Ennek egy lehetséges oka, hogy két további TRE-régió található a *bxd* PRE egy kilobázisos körzetében. Mivel ezek átfednek két gyengébb PRE-hatású régióval is, kizárólagos eltávolításuk nem lehetséges. Működésük legyengítését *trx*-csoportba tartozó mutációkkal kíséreltük meg úgy, hogy a megvizsgált egyedek egyidejűleg hordozták volna az általunk

izolált deléciókat és a homológ kromoszómán hiányzott a teljes *Ubx*-domén. Sajnos, az adott mutáns kombinációkat egyelőre nem sikerült létrehozni a gyenge életképesség és az alacsony fertilitás miatt, de módosított stratégiánk reménnyel kecsegtet e téren.

Ha delécióinkat Gal4VP16 markergénhez kapcsoltuk, az UASGFP riportergén fokozatos gyengülését figyelhettük meg a 18, 23 és 65 bp-os deléciók esetében az azonos pozíciójú és orientációjú, de deléciót nem hordozó kontroll inszercióhoz képest embrionális, lárvális és adult állapotban egyaránt. Érdekes módon az átfedő, 135bp-tal nagyobb (200bp-os) deléció esetében a kontrollhoz hasonló, míg a 276bp-os deléció esetében annál erősebb GFP-expressziót tapasztaltunk. A legnagyobb, 751bp-os delécióval a kontrollnál kicsit gyengébb GFP-intenzitást kaptunk. Ezen eredményeink jól összeegyeztethetőek a korábbi, transzgenikus eredményekkel. A fokozatos GFP intenzitás-csökkenés megmagyarázható a TRE-ban talált három, a TRX-csoportba tartozó ASH1 fehérje kötőhelyeinek eltávolításával. A két nagyobb, 200 illetve 276 bp deléció a markergént közel helyezi egy, a 90 bp TRE-t is átíró nemkódoló RNS transkripció startjához. Feltehetőleg a Gal4VP16 markergén profitál ennek a promóternek a közelségéből (pl fokozott átírás, enhanszerek „elcsábítása” révén). A legnagyobb deléció (751bp) kiejti ezt az endogén promótert, így elveszik a pozitív hatás.

A munkából több angol nyelvű poszter és előadás készült, és e témából készül Farkas Dávid fiatal kutató Ph.D. értekezése is.

In situ* analysis of the maintenance element in the *bxd* cis-regulatory region of *Drosophila

(Dávid Farkas, Gabriella Kozma, Izabella Bajusz, Péter Kaltenecker, Henrik Gyurkovics and László Sipos)

Előadás, Straub-Napok, 2013

Revealing the *in situ* function of the *bxd* TRE in maintaining the active state of the *bxd* cis-regulatory region of *Drosophila*

(Dávid Farkas, Gabriella Kozma, Izabella Bajusz, Henrik Gyurkovics and László Sipos)

Poszter, Molekuláris Élettudományi Konferencia, 2015)

3. A korai S1 és S2 embrionális enhanszerek eltávolítása

Előzmények

Korábbi munkánk alapján megállapítottuk, hogy minden deléció, mely eltávolítja legalább a *bxd* PRE 185 bp-os magját, domináns poszterior irányú homeotikus transzformációt okoz a delécióra heterozigóta felnőtt egyedekben. Az egyetlen kivétel az általunk létrehozott legnagyobb, 3 kb-os deléció, mely belevág a PRE-t közrefogó embrionális S1 és S2 embrionális enhanszerekbe. Noha az adult fenotípus kialakításáért a késői enhanszerek felelősek, nem a koraiak, eredményeink alapján úgy tűnik, hogy egyfajta együttműködés jöhet létre a korai enhanszerek, a PRE és a késői enhanszerek között. Ennek a kölcsönhatásnak a felderítéséhez a két enhanszer külön-külön és együttes eltávolítását, összekapcsolását PRE-deléciókkal és Gal4VP16 marker génnel tűztük ki célul.

Elvégzett új kísérletek

Sikeresen létrehoztuk az S1 és S2 embrionális enhanszereket külön-külön eltávolító vonalakat, melyekben a deléciók meglétét molekulárisan is ellenőriztük. A S2-delécióra homozigóta lárvák központi idegrendszerében kismértékű szintcsökkenést sikerült kimutatnunk az *UBX*-fehérje mennyiségében ellenanyagossal festéssel nagyfelbontású konfokális felvételek segítségével, míg az S1-deléciós mutánsok esetében nem tapasztaltunk hasonló változást. A homozigóta felnőtt egyedek vad fenotípust mutattak mindkét esetben. Ugyanakkor mindkét régió hiánya már heterozigóta állapotban is közel 10 százalékos repülésképtelenséget eredményezett, melynek mértéke homozigótákban tovább fokozódott.

Az S1 és S2 deléciók létrehozása során a genomban maradó FRT-szekvenciákat felhasználva, helyspecifikus rekombinációk segítségével megnöveltük az eredeti deléciókat, teljes egészében eltávolítva ezáltal a 665bp-os *bx* PRE régiót is. A S1 enhanszer hiánya nem befolyásolta az *Ubx* gén ektopikus aktiválódását és a poszterior irányú transzformációk létrejöttét a PRE-t is eltávolító kettős deléciós adult egyedekben. Ezzel szemben az S2 enhanszert eltávolító deléció megakadályozta a PRE hiányában bekövetkező *Ubx*-derepressziót és az ebből adódó domináns fenotípus kialakulását. Ez alapján elmondhatjuk, hogy az S2 korai enhanszer egyfajta szenzorként érzékeli, majd valamilyen módon „továbbítja” a *bx* cisz-regulátor kromatinszerkezeti állapotát a késői enhanszereknek.

Az 1.5 kb-os S1 és az 1 kb-os S2 deléciókat egymással hasonló módon összekapcsolva, létrehoztunk egy olyan 5 kb-os deléciót, mely a két enhanszeren túl a közöttük elhelyezkedő 665 bp-os PRE és a 90 bp-os TRE régiókat is eltávolítja. A delécióra heterozigóta egyedek vad fenotípusúak, míg a homozigótákban gyenge, részleges poszterior irányú homeotikus transzformációk figyelhetők meg. Ugyanakkor egy erős *Ubx*-mutáció, illetve a teljes *Ubx*-domént eltávolító deléció okozta, domináns, anterior irányú transzformációkat kismértékben erősíti az 5 kb-os deléció. Létrehoztunk egy olyan konvertáns vonalat is, amelyben az 5 kb-os delécióba visszaépítettük a 665 bp-os PRE-t. Noha az *Ubx* mutáció illetve deléció jelenlétében jelentős mértékben megerősödött anterior irányú transzformációkat figyelhetünk meg (ami a *bx* régió működésének számottevő lecsökkenését jelzi), a homozigóta egyedek vad fenotípusúak. Vagyis, a két enhanszer- és a TRE-régió együttes hiányában sem inaktiválja a visszaépített PRE a domént, a jelenlévő, bár távoli megmaradt korai enhanszerek képesek e feladat ellátására.

A S1 és S2 enhanszereknek a lokális kromatinszerkezetre gyakorolt hatását Gal4VP16 markergén segítségével vizsgáltuk UASGFP riportergén jelenlétében embriókban, lárvákban és adult egyedeken. Ehhez a két enhanszert külön-külön eltávolító deléciót a már ismertetett FRT-rekombinációval hozzákapcsoltuk Gal4VP16-inszerciós vonalainkhoz. Míg az S2 enhanszer hiánya drámaian lecsökkentette a GFP riportergén kifejeződésének mértékét a kontrollként használt azonos pozíciójú és orientációjú, deléciómentes inszercióhoz képest, addig az S1 enhanszer hiányában csak kismértékben csökkent a GFP-okozta fluoresszencia intenzitása. Ugyanakkor az S1 deléciós heterozigóta egyedek központi idegrendszerében a GFP kismértékű, ektopikus

kifejeződését figyeltük meg, vagyis az S1 enhanszert tartalmazó 1.5 kb-os régió gyenge PRE-ként is viselkedik.

A munkából több angol nyelvű előadás és poszter készült, és elkészült Kiss Viktória volt Ph.D hallgató értekezése is, melynek javítása folyamatban van.

Viktória Kiss and László Sipos: ***In situ* analysis of different cis-acting elements in the bxd regulatory region** (Előadás, Molekuláris Élettudományi Konferencia 2015. március 27-29. Eger)

Viktória Kiss and László Sipos: ***In situ* dissection of embryonic enhancers flanking the bxd maintenance element of Drosophila** (Poszter, MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Straub - Napok, 2013. május 29-30.)

4. A *bxd* PRE és környezete lokális kromatinszerkezetének közvetlen tanulmányozása GFP markergén segítségével

Előzmények

A 665 bp-os *bxd* PRE-t eltávolító delécióhoz kapcsolt Gal4VP16 markergén és UASeGFP riportgén jelenlétében nemcsak a GFP nagymértékű ektopikus kifejeződését tapasztaltuk, hanem a GFP-intenzitás jelentős csökkenését is. Ebből arra következtettünk, hogy a PRE nemcsak silencer-ként működik, hanem rendelkezik enhanszer-horgonyzó képességgel is.

Elvégzett új kísérletek

FRT-rekombináció segítségével létrehoztunk öt olyan vonalat, melyekben különböző darabjai hiányoznak a 665 bp-os *bxd* PRE-nak és ugyanakkor hordozzák a Gal4VP16 markergént is. Az így kapott deléciós-inszerciós mutációk lokális kromatinszerkezetre gyakorolt hatását UASeGFP riportergén jelenlétében vizsgáltuk, azonos pozíciójú és orientációjú, deléciómentes inszerciókat használva kontrollként.

Sikerült azonosítani a 665 bp-os *bxd* PRE disztális szélén egy olyan kisméretű DNS-szakaszt (~140 bp), melynek hiánya a GFP-intenzitás kismértékű, de észlelhető lecsökkenését okozta, ugyanakkor a GFP kifejeződése nem lett ektopikus. Ezzel ellentétben, a *bxd* PRE 185bp-os magjának eltávolítása ektopikus GFP-expressziót okozott, de a fluoresszencia intenzitása nem változott. A maggal átfedő, disztális irányba 95 bp-ral nagyobb, 280bp szakasz hiánya egyszerre növelte az ektopikus kifejeződés mértékét és csökkentette az GFP-intenzitást. A maggal átfedő, proximális irányba 260p-ral nagyobb, 445 bp-os szakasz hiánya nem növelte az ektopikus kifejeződés mértékét, de kismértékben csökkentette a GFP-intenzitást. Ugyanakkor a 445bp-os szakasszal átfedő, disztális irányba csak 46bp-ral kisebb 399bp-os szakasz hiánya nem okozott se ektopikus, sem csökkent mértékű GFP-kifejeződést. Eredményeink alapján elmondható, hogy a 665 bp-os *bxd* PRE-ban struktúrálisan és funkcionálisan csak részlegesen szétválasztható a

már korábban is ismert silencer és az általunk felismert enhanszer-horgonyzó funkció. Úgy tűnik, hogy mindkét funkciót több elemből álló, egymással részben átfedő, teljesen el nem különíthető modul látja el.

A teljes 665 bp-os *bx*d PRE régiót és annak három, egymással részlegesen átfedő fragmentjeit helyspecifikus integráció segítségével beépítettük az eredeti helyüktől több, mint 100kb távolságra található, az *Abd-B* doménben lévő *iab-7* PRE helyére Gal4VP16 markergénnel együtt. Nemcsak a teljes 665bp-os *bx*d PRE, hanem mind a három, kisebb méretű *bx*d PRE-fragment is képes volt visszaszorítani az *iab-7* PRE hiányában észlelt ektopikus GFP-expressziót. A legerősebb GFP-intenzitást a teljes *bx*d PRE-t tartalmazó integráns esetében észleltük, ezt követte a *bx*d PRE disztális részét hordozó integráns, megerősítve ezáltal az eredeti környezetben nyert adatainkat, miszerint a *bx*d PRE ezen szakasza kiemelt fontosságú az enhanszerek horgonyzása szempontjából. A proximális és a centrális részeket tartalmazó integránsokban tapasztaltuk a leggyengébb, egymástól nem megkülönböztethető GFP-intenzitást.

Egyéb, a munkatervben nem szereplő elvégzett kísérletek:

Bár a csökkentett költségvetés miatt a módosított munkatervből kihagytuk, de a későbbiekben, munkánk során, eredményeink közléséhez esszenciálisnak tartottuk, hogy az eredeti munkatervben szereplő „III./3. A *bx*d PRE és környezete lokális kromatin-szerkezetének közvetlen tanulmányozása GFP markergén segítségével” feladatot mégis elvégezzük.

Vizsgálataink során kiderült, hogy a *bx*d PRE-ba, vagy annak közvetlen közelébe épített, a Gal4VP16 markergén kifejeződését biztosító, P-elem promóter igen erősen kompetál a tőle ~ 25kb-ra lévő, endogén *Ubx* promóterrel a *bx*d régióban lévő enhanszerekért. Kétféle lehetőséget is kitaláltunk e kompetíció mechanizmusára:

- közvetett módon, a PRE az *Ubx* promóteréhez hurkolódva magával cipelve a P-elem promóterét, mely kompetál az *Ubx* promóterhez hurkolódó enhanszerekért

- közvetlenül, eredeti helyén kompetál a PRE-közeli P-promóter az *Ubx* promóterrel az enhanszerekért

Ha az első lehetőség az igaz, akkor, ha eltávolítjuk/leválasztjuk az *Ubx* promóter a vele egy doménben lévő enhanszerektől, a P-promóter nem, vagy csak kevésbé tud majd kompetálni az enhanszerekért, csökkennie, vagy megszűnnie kell az UASGFP riportgén expressziójának, hasonlóan ahhoz a megfigyelésünkhöz, amit a PRE hiányában észleltünk. Ha a második modell az igaz, akkor az *Ubx* promóter kiejtése nemhogy csökkentené, hanem inkább fokozná a Gal4VP16 és az UASGFP kifejeződésének mértékét.

A promóter-kompetíció mechanizmusának tesztelésére leválasztottuk az *Ubx* gén promóterét egy, a vele azonos kromoszómán lévő *bx*d PRE-hoz közeli, Gal4VP16 inszerciótól egy izolátor régió beépítésével. Fluoreszcencián alapuló vizsgálataink a második mechanizmus helyességét látszanak igazolni, vagyis a PRE-közeli P-elem promóter az *Ubx* promóterhez való kapcsolódás nélkül is, eredeti helyén, hatékonyan

kompetál a vele azonos doménben lévő enhanszerekért. Folyamatban van az *Ubx* gén 5' végének teljes eltávolítása is. E kísérleteink során egy, a kutatásainkat és az uralkodó tudományos nézetet is nagymértékben befolyásolható eredményhez is jutottunk: az *Ubx* gén promóter-upstream szakasza és a *bx*d PRE között FRT-szekvenciák révén inverziót létrehozva erős domináns, poszterior irányú homeotikus tarszformációkat észletünk, noha a PRE jelen volt a régióban. Ez alapján úgy tűnik, hogy a PRE *in situ* silencer hatása függ a pozíciójától, nem véletlenül található normálisan a domén közepén.

5. A *bx* PRE *in situ* boncolása

Előzmények

Az *Ubx* gén *bx* cisz-regulátor régiója a transzkripció starttól „downstream” található, intronikus környezetben. A transzkripció starttól ~ 30 kb-ra található az a pontosan nem definiált, ~1,5kb-os szakasz, ami PRE-ként működik kromatin-immunprecipitációs és transzgenikus kísérletekben. Ezen belül, egy 380 bp-os régióban a (*bx*d PRE-hoz hasonlóan, de attól kisebb mértékben) feldúsulnak a GAGA faktor és PHO fehérjék kötőhelyei, melyekről korábban kimutattuk, hogy esszenciális szerepet töltenek be a *bx*d PRE *in situ* működésében. Továbbá, korábbi együttműködő partnerünk, Welcome Bender (Harvard Egyetem, BCMP, Boston) 4 független P-elem inszerciót izolált ebben a kis szakaszban, hasonlóan a *bx*d PRE-hoz. Ezek alapján feltételeztük, hogy ez a 380 bp-os szakasz képezheti a *bx* PRE „magját” (szintén hasonlóan a *bx*d PRE-hoz).

Elvégzett új kísérletek

Első lépésként leteszteltük, hogy a rendelkezésre álló, ide integrálódott 4 P-elem közül melyik „ugrik” legjobban, ezáltal melyiket használhatjuk a leghatékonyabban génkonverziós kísérleteinkhez. A „győztes” P-elem a 380 bp-os régió középső részén helyezkedik el. Ráadásul, a benne lévő 3 darab FRT-szekvencia segítségével majdnem minden „idegen” DNS-szakasz (markergének, T7 promóter, stb) eltávolítható belőle, így használhatósága tovább fokozható. A transzgenikus, hőszökkel indukálható flp-áz enzim segítségével ezt meg is tettük, és homozigóta törzset hoztunk létre a „kibelezett” HF668 P-inszercióból.

Öt különböző génkonverziós konstrukciót sikerült beépítenünk eddig a kiszemelt 380 bp-os régió területére. Mindegyikben közös, hogy loxP szekvenciák vesznek közre olyan kromoszómális szakaszokat, melyeket később hőindukálható Cre-rekombináz segítségével eltávolíthatunk. (Ebben az esetben szándékosan nem a *bx*d PRE boncolásához használt FRT-szekvenciákat alkalmaztunk, hogy a későbbiekben, a kettős, *bx* és *bx*d PRE-deléciók egyedek létrehozásakor az esetleges problémákat elkerülhessük). Szintén újításunk, hogy a kiejtendő genomikus szakaszokat közrefogó loxP helyeken kívülre helyeztük el a Gal4VP16 markergénünket, hogy ne csak konverziós markerként használhassuk, hanem a deléciók létrehozása után riporterként is funkcionálhasson UASGFP transzgén jelenlétében. Ugyanakkor a Gal4VP16 gént I-SceI szekvenciák közé építettük be, hogy szükség esetén mégis megszabadulhassunk tőle, „tisztá”, idegen DNS-mentes deléciók létrehozásakor. Mindezen ötlettel a konvertánsaink későbbi

felhasználhatóságát igyekeztünk fokozni, ugyanakkor lecsökkenteni a szükséges munka és idő mennyiségét.

Az 1. konvertánsunkban 280 bp található a loxP szekvenciák között, míg 100 bp már eleve hiányzik. Bár ezen konvertánsaink mutattak némi gyenge, domináns fenotípust (a billérek redukciója, a 3. láb „görbesége”) ami a *bx* PRE funkciójának megzavarására utal, ez a fenotípus megszűnt, ha a 2.3 kb inszerciót okozó Gal4VP16 markergént eltávolítottuk. A beépült konvertáns vonalakban az UASeGFP riportergén kifejeződése nem ektopikus, PS5-specifikus; ugyanakkor a közrefogott 280bp-os régió eltávolítása a riportergén drámai ektópikus aktivációját okozta (a GFP az első és második pár lábban is kifejeződött, eltérően a kontrolltól, melyben csak a harmadik lábban tapasztaltunk expressziót). Ennek ellenére, a 380bp eltávolítása nem okozott domináns homeotikus transzformációkat, amiket a *bx* PRE-től megfosztott, ektópikusan kifejeződő *Ubx* gén okozhatna.

A 2. konvertánsunkban a 380 bp *bx*-szekvenciát az *iab-7* régióból származó PRE-val helyettesítettük. Ezen vonalaink igen rossz életképességűek, a markergén intenzitása lecsökkent az 1-hez képest, de akárcsak az 1-ben, PS5-specifikusan fejeződik ki.

A 3. és 4. konvertánsainkban a teljes 380 bp-os *bx*-szakasz a loxP szekvenciák között helyezkedik el. Míg a 3-ban a Gal4VP16 markergén az 1. és 2. konvertánsokhoz hasonlóan, a loxP-közrefogott szakasz proximális végénél van és az *Ubx* gén transzkripciójával megegyező irányba íródik át, addig a 4-ben a markergén a loxP-közrefogott szakasz disztális végénél van és az *Ubx* gén transzkripciójával ellentétes irányba íródik át. A létrehozott deléciók, hasonlóan a 1. konstrukthoz, nem okoznak homeotikus transzformációkat.

A 5. konstrukt segítségével létrehozott 744bp deléció sem okozott látható poszterior irányú transzformációkat, de kissé erősítette az *Ubx* mutáció jelenlétében észlelhető, ellentétes, anterior irányú transzformációkat. Ez arra utal, hogy elérhettük a közeli *bx* enhanszer határát. A GFP kifejeződés továbbra is ektopikusnak bizonyult, de erősségének mértéke váratlanul felerősödött (ez a *bx* PRE-deléciók esetében pont ellentétesen változik). Eredményeink alapján terveztünk és létrehoztunk egy 6. konstrukciót is, ami az eddig létrehozottakkal ellentétes irányba távolít majd el egy további 1kb-os régiót, teljes mértékben lefedve ezáltal a *bx* PRE elméleti területét.

Egyéb elvégzett, a módosított munkatervben NEM szereplő feladatok:

Munkánk során szintén rájöttünk, hogy az *Ubx* gén egymással szomszédos, *bx* és *bx*d cisz-regulátor régióinak, illetve az inaktív állapotukat fenntartó PRE-k szélesebbkörű és mélyebb betekintést lehetővé tévő kölcsönhatásának vizsgálatát nagymértékben megkönnyíti, ha két különböző, így egyszerre vizsgálható, *in vivo* fluoroesszencián alapuló „molekuláris erősítőrendszert” alkalmazunk. Ezért a *bx*d régió tanulmányozásához már sikerrel alkalmazott, élesztőből származó Gal4-UAS rendszer mellett céljainkhoz alkalmassá tettük a *Neurospora*-ból származó Q- (QF-QS-QUAS) szisztémát (Potter *et al.*, 2010, Cell). Ehhez a QF aktivátor gént, hasonlóan az általunk használt hibrid Gal4VP16 génhez, P-elem promóterrel és Hsp70 transzkripció terminátor szekvenciával láttuk el, majd két új gékonvertánst hoztunk létre a *bx*d PRE-ban. Ezek segítségével eltávolíthatunk a *bx*d PRE esszenciális magját is átfogó 280 bp-os szakaszt, melynek

hiánya korábbi vizsgálataink alapján igen erős ektópikus aktivációját okozza a *bx* régióknak. Ugyanakkor a régióban marad az aktiváló QF faktor, melynek derepresszióját QUAS-GFP illetve -RFP segítségével nyomon követhetünk. A megfelelően megválasztott UAS-RFP illetve UAS-GFP segítségével pedig egy időben vizsgálhatjuk a *bx* régió működését PRE jelenlétében és hiányában egyaránt. Előzetes, konfokális fluorezcenciás mikroszkópos vizsgálataink meglepő és egyúttal igen látványos eredménnyel szolgáltak: a *bx* és *bx* régió aktivitási mintázata kölcsönösen exkluzív, kvázi komplementere egymásnak: embrióban a hetedik paraszegmenttől hátra a *bx* régió aktivitása az anterior, míg a *bx* régióé inkább a poszterior kompartmentjére korlátozódik az adott paraszegmentnek. Kíváncsian várjuk, hogy megváltozik-e majd ez a mintázat-eloszlás egyik/másik vagy mindkét PRE hiányában, mind cisz-, mind transz-helyzetű riportergének esetében.

Sajnos kísérleteink elvégzését nem várt nehézségek (fertilítási és életképességbeli problémák, lecsökkent csoportlétszám), az eredmények kiértékelést és közzétét pedig betegségem nagymértékben hátráltatta. Ugyanakkor jelentős mennyiségű nem tervezett, addicionális kísérletet is elvégeztünk, melyek számos új és érdekes adattal szolgáltak, illetve segíthetik eredményeink közzététét.