

A pályázat tartama alatt végzett munkánk azt a célt szolgálta, hogy a homeotikus bithorax génkomplex (Bx-C) kifejeződésének epigenetikai szinten való szabályozását jobban feltárjuk, illetve megértsük az ecetmuslicában.

A Bx-C három homeotikus fehérjekódoló gént, az *Ultrabithoraxot* (*Ubx*), *abdominal-A-t* (*abd-A*) és az *Abdominal B-t* (*Abd-B*) foglal magába. Ez a három gén határozza meg a 3. torszelvény, (T3) és az összes potrohszelvény (A1 - A8) identitását a muslicában. Ezek a szelvények a korai embriogenezis során kialakuló 5. – 14. paraszegmentekből származnak. Az *Ubx*, *abd-A* és *Abd-B* kifejeződését egy összetett, 300 kb hosszú DNS szakaszt lefedő cisz-regulátor régió szabályozza. Molekuláris genetikai elemzés segítségével ezt a terjedelmes régiót 9 szelvény/paraszegment-specifikus alrégióra (*abd/bx*, *bx/pbx*, *iab-2 – iab-8*) osztották. Figyelemreméltó módon, a komplex génjei és szabályozó régiói abban a sorrendben helyezkednek el a kromoszómán, amelyben az általuk meghatározott szelvények követik egymást.

Vizsgálatink során az *Ubx* gén kifejeződését a PS6-ban (amely a 3. torszelvény hátulsó, és az első potrohszelvény elülső felének felel meg) szabályozó *bx/pbx* (röviden *bx*) cisz-regulátor régióban, illetve kisebb mértékben az *Abd-B* kifejeződését a 7. potrohszelvényben (PS12) szabályozó *iab-7* régióban végeztük. Tipikusan a cisz-regulátorok működését a következő speciális szekvencia részletek biztosítják:

- (1) Az iniciátor elemek a cisz-regulátorok korai aktiválódásához, illetve inaktivációjához szükségesek. Korai transzkripciós faktorok (GAP, PAIR-RULE fehérjék) kötőhelyeit tartalmazzák megfelelő elrendezésben.
- (2) A fenntartó elemek (Polycomb Response Elements PREs, Trithorax Response Elements, TREs, együttesen Maintenance Elements (MEs) azon transz-hatású faktorok (a Polycomb csoport, PCG, illetve a trithorax csoport TRXG tagjainak) támadáspontjai a DNS-en, melyek felismerik egy adott cisz-regulátor aktív, illetve inaktív állapotát, és a továbbiakban az egyed teljes élete folyamán fenntartják azt.
- (4) A határoló elemek (izolátorok, boundary régiók) megőrzik a cisz-regulátorok autonóm működését azáltal, hogy meggátolják az adott cisz-regulátor aktív, illetve inaktív állapotának (kromatin konformációjának) átterjedését a szomszédos cisz-regulátorokra.
- (5) A cisz-regulátorokban található (sejtípus- vagy szövet-specifikus) enhanszerek biztosítják a hozzájuk tartozó homeotikus gén szelvény-specifikus expressziós szintjét, illetve a homeotikus gének adott sejtre vagy szövetre jellemző expressziós mintázatát.

Ezek a ciszhatású elemek természetesen mind a *bx*, mind az *iab-7* cisz-regulátor régióban megtalálhatók

Az egyik legérdekesebb kérdés a Bx-C szabályozásával kapcsolatban az, hogy a nagyon nagyméretű (pl. a *bx* esetében hozzávetőleg 55 kb hosszú) cisz-regulátor régiókban található ciszhatású elemek hogyan találják meg a célgén promóterét?

A most lezárult pályázat ideje alatt végzett munkánk legfontosabb eredményei az *Ubx* promóter és a *bx* PRE fizikai kölcsönhatásának felismeréséhez és vizsgálatához kapcsolódnak. A korábbi ismeretek szerint a *bx* PRE funkciója az, hogy az első potrohszelvénytől előrébb elhelyezkedő szelvényekben az egész, mintegy 55 kb hosszú *bx* cisz-regulátor régiót az egyedfejlődés végéig zárt, inaktív állapotban tartsa. Eredményeink azt sugallják, hogy a *bx* PRE az aktív, nyitott konformációban lévő *bx* regulátor régióban részleges „silencer”-ként hatva módosítja az *Ubx* gén kifejeződésének szintjét. Erre elsősorban abból a korai megfigyelésből következtettünk, amely szerint a *bx* PRE hiányában nemcsak ectopikusan aktiválódik az *Ubx* gén olyan szelvényekben, ahol normális körülmények között inaktív, hanem megemelkedik a kifejeződési szintje azokban a szelvényekben is, amelyekben az *Ubx* gén a *bx* cisz-regulátor szabályozó hatása alatt áll,

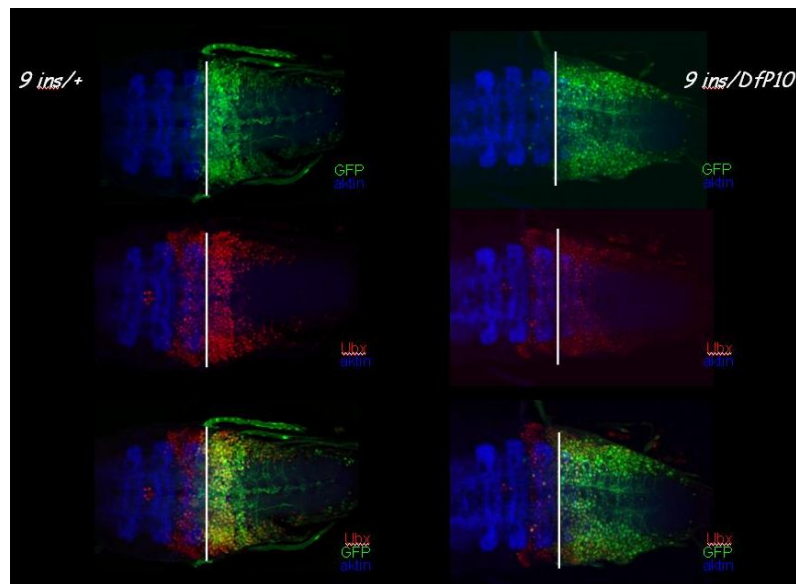
azaz a bxd egyébként is nyitott, aktív állapotú. Annak érdekében, hogy a PRE-knak ezt az eddig fel nem ismert, a cisz-regulátor régióban elhelyezkedő enhanszerek hatását moduláló szerepét jobban megértsük, Gal4VP16 riportergént építettünk be a bxd PRE környezetébe. Az ezzel a rendszerrel kapott első megfigyelésünk arra engedtek következtetni, hogy a bxd PRE közvetlen közelébe elhelyezett, Gal4VP16 riportter-génhez kapcsolt P promóter hatékonyan képes versengeni az endogén Ubx promóterrel, de elveszíti ezt a képességét, ha eltávolítjuk a bxd PRE-t mellőle (lásd a Munkaterv II alpontjában leírtakat). Az elmúlt évek során ugyanezt a kísérleti rendszert használva jelentősen közelebb kerültünk ahhoz, hogy megértsük, hogy a kromatin milyen térbeli struktúrájában valósul meg az Ubx gén kifejeződési szintjének PRE-mediálta szabályozása az aktív cisz-regulátor doménben embrionális, lárvális és felnőtt szövetekben, elsősorban ellenanyag-festést követő konfokális mikroszkópia és fenotípus-analízis segítségével. A kísérletek tételes felsorolása hosszadalmas és nehézkes lenne, ezért a zárójelentésben a konkrét kísérletek vázlatos leírása mellett elsősorban a belőlük adódó fontosabb következtetéseket ismertetjük:

1.

1.1. Kísérleteink arra a váratlan eredményre vezettek, hogy a bxd PRE és a Gal4VP16 markergén promótere együttesen képes lehet a nyílt konformációjú bxd cisz-regulátor régió enhanszereit átszervezni oly módon, hogy az enhanszerek a markergén promóterhez kapcsolódnak, ezáltal olyan alternatív „aktív kromatin tengelyt” (active chromatin hub) kialakítva, amely erős versenytársa az Ubx promóter körül normálisan kialakuló aktív tengelynek minden életszakaszban és minden általunk vizsgált szövetben. (A bxd PRE és a riportergén promótere az Ubx promótertől hozzávetőleg 25 kb távolságban található.) Ennek az a feltétele, hogy a Gal4VP16 promótere a PRE közvetlen közelében legyen. Például ha a Gal4VP16 riportter-gént megfordítjuk, ez a hatás lényegében megszűnik, mivel a promóter kb. 2,5 kb-sal, a riportergén hosszának megfelelő távolsággal távolabb kerül. Az alternatív idegen promóter – PRE – enhanszer kapcsolat különösen erős olyan testszelvényekben, ahol a bxd cisz-regulátor nyitott konformációjú ugyan, de az UBX expresszió szintje más, közvetett hatások következtében alacsony, azaz az Ubx promóter – enhanszer kapcsolat eleve gyengébb. Például a központi idegrendszer (CNS) első potrohszelvénynek megfelelő részétől hátrafelé haladva a test hossz tengelye mentén az Ubx gén kifejeződése fokozatosan csökken, míg a Gal4VP16 kifejeződése lényegében változatlan marad. Az erős kompetíció nemcsak az Ubx gén kifejeződésének jól detektálható csökkenésében, hanem a fenotípus szintjén is megnyilvánul, amennyiben az Ubx gén mutáns változatára jellemző transzformációk jelennek meg mind a CNS-ben, mind a felnőtt állat megfelelő testtáján (az első potrohszelvényben). Arra nézve, hogy a PRE és a közeli promóter milyen mechanizmuson, illetve fehérjekomplexeken keresztül alakítja ki azt az új DNS-fehérje platformot, amely alternatív enhanszeoszóma kialakítását teszi lehetővé, jelenleg nincs elképzelésünk, erre a kérdésre a jövőben célzottan megtervezett kísérletek adhatnak választ.

1.2. Ha a Gal4VP16 promótert a PRE közvetlen közelében hordozó kromoszóma vad típusú kromoszómával párosodik, a Gal4VP16 kifejeződése pontosan, sejtről sejtre, térben és intenzitásban is követi az Ubx-ét. (Az *ecetmuslica* testi sejtjeiben a homológ kromoszómák interfázisban is szorosan párosodottak.) Ez azt jelenti, hogy a Gal4VP16 promótere ebben az esetben is kompetál ugyan az Ubx promóterével az elérhető enhanszerekért, azonban a kompetíció itt más jellegű. Az észlelt kifejeződési mintázatot azzal lehet magyarázni, hogy a vad kromoszómával való párosodás megakadályozza az alternatív aktív tengely kialakulását a Gal4VP16 promóter körül, és mintegy kaptafaként szolgálva rákényszeríti a riportergént hordozó kromoszómára a vad kromoszóma térbeli konformációját. A párosodott

homológokon mindkét bxd PRE (és a PRE révén a pár nélküli Gal4VP16 promóter) térben az Ubx gén közvetlen közelében helyezkedik el, és ennek az elrendezésnek a következményeként a Gal4VP16 promótere osztozik a vele azonos térrészben helyet foglaló két, párosodott Ubx gén promóterével a velük ugyancsak azonos térrészben helyet foglaló enhanszerek hatásán.



1. ábra

1.3. A riportergén kifejeződési mintázatára vonatkozó fenti magyarázatot alátámasztja az az eredmény, hogy ha a Gal4VP16 mellől eltávolítunk egy, a bxd PRE-t ismereteink szerint teljes mértékben magában foglaló 665 bp hosszú DNS szakaszt, a Gal4VP16 kifejeződése elválk az Ubx-étől, és jórészt csak a periférikus idegrendszer sejtjeiben észlelhető, ahol az Ubx maga alig kimutatható mértékben expresszálódik. Ez annyit jelent, hogy a PRE hiányában a riportergén promótere kizáródik abból az aktív kromatin tengelyből, amelynek az Ubx promóter és az adott sejtípusban működő enhanszer(ek) mellett a PRE is része, és amelyhez a PRE autonóm módon, saját működésének részeként csatlakozik. Ugyanakkor a PRE 185 bp hosszú mag régiójának az eltávolítása legfeljebb alig észlelhető mértékben befolyásolja a mellette elhelyezkedő Gal4VP16 promóter targetálódását, annak ellenére, hogy ez a delécio jórészt elrontja a PRE működését. Ugyanezt az eredményt kaptuk, amikor a 185 bp hosszú PRE mag szekvenciában elrontottuk az összes GAGA factor, és az összes PHO kötőhelyet. A mutáns PRE az inaktív konformációt éppen úgy képtelen fenntartani, mint a 185 bp-os delécio, és ahhoz hasonlóan alig befolyásolja a riportergén „targetálódását”. Ezek az adatok felvetették annak a lehetőségét, hogy a PRE zárt konformációt fenntartó működéséhez szükséges elemek nem azonosak a targetáló funkcióban kulcsszerepű fehérjékkel. Ezt a következtetésünket alátámasztotta az a kísérleti eredményünk, amely szerint a PRE inaktiváló hatásában kulcsszerepű, a Polycomb géncsoportba tartozó *extra sexcombs* (*esc*) gén működésének teljes hiányában sem sérül a PRE régió (illetve a hozzá kapcsolt riportergének) az Ubx promóterhez való targetálódása, annak ellenére, hogy a zárt, inaktív konformáció fenntartása teljesen megszűnik ebben a mutáns háttérben. Hasonló eredményt kaptunk, amikor az *esc* gén mutáns változata helyett a *Polycomb* gén homozigóta mutáns

változatát használtuk. Ezek az eredmények együttesen határozottan arra mutatnak, hogy a bxd PRE inaktív konformációt fenntartó és „targetáló” hatása egymástól különböző fehérjekomplexek működésének lehetnek az eredményei. Ebben az esetben elképzelhető, hogy a két funkció fizikailag is elválasztható egymástól. Ennek a lehetőségnek a vizsgálatára létrehoztunk olyan deléciókat, amelyek a teljes 665 bp hosszú szakasz különböző részeit távolítják el *in situ*. Kísérleteink eredményét abban lehet összefoglalni, hogy a PRE magszekvenciájától mindkét irányban található olyan régiók, amelyek hozzájárulnak a targetáláshoz, de a megfigyelt teljes hatáshoz mindegyik épségére szükség van. Vagyis a targetáló funkció a PRE silencer funkciójához hasonlóan moduláris szerkezetű, attól részben különböző, de azzal átfedő szakaszon oszlik meg. A továbbiakban az egyszerűség kedvéért a PRE-vel átfedő targetáló funkciójú szakaszokat együttesen Targetáló Elemnek (Targeting Element, TE) fogjuk nevezni.

Természetesen elvben felmerülhet az a lehetőség, hogy a bxd PRE általunk észlelt „targetálódása” az Ubx promóterhez csak műtermék, azaz annak a következménye, hogy egy idegen promóter közelsége olyan fehérje komplexek kötődését teszi lehetővé, amelyek egyáltalában nem jönnek létre az idegen promóter hiányában, vagy ha az a PRE-től nagyobb távolságban foglal helyet. Ezt a lehetőséget épp az a megfigyelésünk teszi valószínűtlenné, hogy a vad kromoszómával való párosodás eredményeként létrejövő Gal4VP16 kifejeződési mintázat meglehetősen pontosan követi az Ubx gén kifejeződési mintázatát, míg a párosodás hiányában attól eltér. Vagyis a vad kromoszómán a PRE és a bxd domén enhanszerei egyaránt nagyrészt az Ubx promóter közelében tartózkodnak, míg PRE - Gal4VP16 promóter párosodás hiányában ettől a térbeli helyzettől téríti el az enhanszerek egy részét.

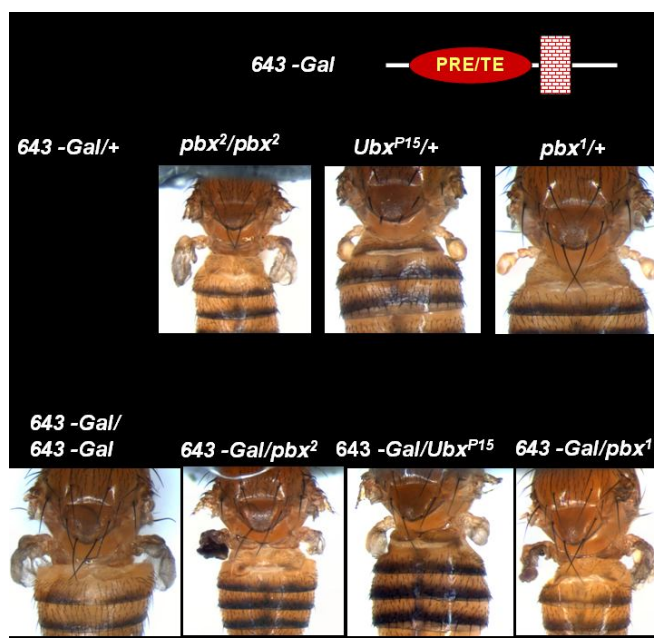
A targetálódás műtermék jellegét jórészt kizárja az a kísérletsorozatunk, amelyben azt kívántuk megválaszolni, vajon a PRE-vel átfedő targetáló szekvencia a bxd cisz-regulátor enhanszereinek az endogén Ubx promóter környékére való szervezésében is részt vesz-e. Erre a lehetőségre éppen az hívta fel a figyelmünket, hogy a PRE a szomszédos helyzetű Gal4VP16 promóterrel együttműködve képes részben „eltéríteni” a kérdéses enhanszereket. Vagyis arra a kérdésre kerestünk választ, hogy a bxd enhanszerek a TE-től teljesen függetlenül kerülnek-e fizikai kapcsolatba az Ubx promóterrel, vagy a TE közvetlenül szerepet játszik ebben a folyamatban. Az utóbbi lehetőségnek ellene szól az a korábbi megfigyelés, amely szerint a PRE/TE eltávolítása nem okoz észlelhető Ubx funkcióvesztéses fenotípust, éppen ellenkezőleg, az Ubx normálisnál előrébb megjelenő kifejeződését eredményezi. Ez azonban nem zárja ki azt a lehetőséget, hogy a TE részt vesz ugyan az enhanszer-promóter kapcsolat szervezésében, de ez a funkciója a bxd cisz regulátor egészét tekintve redundáns.

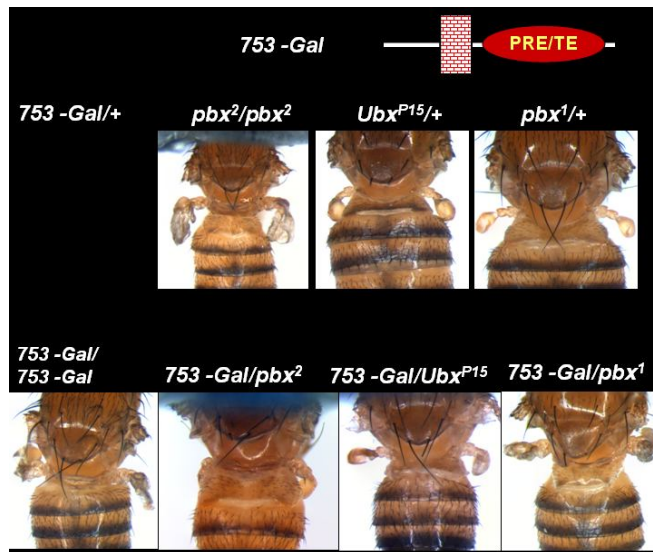
Kiválasztottunk két, egymáshoz méretben hasonló, régóta ismert deléciót, amelyek homozigóta formában csak a billér hátsó felében (azaz az utótor hátsó felében) okoznak mutáns, funkcióvesztéses fenotípust (részben szárnyá transzformálják ezt a területet), ezért *postbithorax*<sup>1</sup> (*pbx*<sup>1</sup>) és *postbithorax*<sup>2</sup> (*pbx*<sup>2</sup>) néven ismertek. A fenotípusuk alapján világos, hogy mindkettő eltávolít egy nemredundáns enhanszert, amely csak a billér hátulsó felének normális kialakulásához szükséges. Lényeges különbség a két deléció között abban van, hogy a *pbx*<sup>2</sup> eltávolítja a bxd PRE/TE-t is, míg a *pbx*<sup>1</sup> nem, és az utóbbi teljes egészében a PRE/TE-től az Ubx promóterhez viszonyított disztális irányban helyezkedik el. A két deléciót hordozó törzset olyan, általunk előállított mutáns vonalokhoz kereszteltük (lásd a 4. pont alatt leírtakat), amelyekben egy határoló szakasz vagy közvetlenül a PRE/TE régiótól proximálisan (**753 –Gal**), vagy attól közvetlenül disztálisan (**643 –Gal**) helyezkedik el. Ebből az elrendezésből az következik, hogy a billér enhanszer egyik esetben sem képes a cisz helyzetű

Ubx promóterrel kapcsolatba lépni, (ami normális körülmények között egyenértékű azzal, mintha az enhanszer hiányozna ezekről a kromoszómáról), de az első esetben a PRE/TE képes „kommunikálni” a billér enhanszerrel, míg a második esetben nem. Azt az eredményt kaptuk, hogy az a kromoszóma, amelyben a határoló elem a billér enhanszert elválasztja a PRE/TE régiótól, nem képes komplementálni sem a *pbx<sup>1</sup>*, sem a *pbx<sup>2</sup>* kromoszómát, vagyis a billér hátulsó fele hozzávetőlegesen olyan mértékben marad transzformált, mint a homozigóta deléciók esetében. Ez teljes egészében megfelel a várakozásnak, hiszen a billér enhanszer egyik krómósómán sem működik. Abban az esetben azonban, amikor a PRE/TE a billér enhanszerrel azonos oldalon helyezkedik el, a határoló elemet hordozó kromoszóma jelentős mértékben komplementálja a *pbx<sup>2</sup>* deléciós kromoszómát, azaz a billér fenotípusa közelít a vadtypushoz. Ezzel szemben ilyen komplementációt nem találunk, ha a billér enhanszer és a PRE/TE a határoló szakasz ellentétes oldalán helyezkedik el, azaz a két elem közti kapcsolat gátolt. Ezt csak úgy lehetséges magyarázni, hogy a PRE/TE képes a billér enhanszert átvezetni a transzhelyzetű Ubx promóteréhez. Ebből az következik, hogy a PRE/TE valóban részt vesz az enhanszerek és az Ubx promóter közti kapcsolat szervezésében, és ez a működése a fent leírt, különleges mutáns kombinációban meg is nyilvánul.

Akkor sem tapasztalunk komplementációt, ha a határoló elemet hordozó kromoszóma a *pbx<sup>1</sup>* kromoszómával, amely nem távolítja el a PRE/TE régiót, van szemben. Ezt a megfigyelést úgy magyarázzuk, hogy az ép PRE/TE elfoglalja a cisz helyzetű Ubx promóter környezetét, ezáltal akadályozza a transzhelyzetű PRE/TE-t abban, hogy megközelítse ugyanezt a promótert.

Érdekes eredményre vezetett az a kísérletünk is, amiben a jól komplementáló **753 -Gal** kromoszómát egy Ubx pontmutációt (*Ubx<sup>P15</sup>*) hordozó kromoszómával kombináltunk. Ebben az esetben is részleges komplementációt tapasztaltunk, ami csak úgy magyarázható, hogy a PRE/TE nemcsak a transzhelyzetű Ubx promótert (ami funkcióképtelen génhez tartozik), hanem a vele párosodott cisz promótert is eléri, vagyis a határoló szakaszt mintegy megkerüli a transz helyzetű promóter segítségével.





1.4. Választ kerestünk arra a kérdésre, hogy mi lehet a szerepe annak, hogy a *bx*d PRE közvetlenül az *Ubx* promóterhez van pányvázva? Konfokális mikroszkópia segítségével megállapítottuk, hogy ha a *bx*d PRE 665 bp hosszú szakaszát eltávolítjuk, akkor az *Ubx* gén kifejeződése sejtszinten is egyértelműen megerősödik a központi idegrendszernek azokban a régióiban, ahol az *Ubx* kifejeződését a nyílt konformációjú *bx*d cisz-regulátor régió szabályozza. Vagyis a PRE valóban kettős szerepet tölt be a bithorax komplex géneinek szabályozásában, ahogy arra korábbi (az *Abd-B* gén *iab-7* cisz-regulátorához tartozó PRE vizsgálata kapcsán végzett) kísérleteink alapján is következtettünk: egyrészt szükséges ahhoz, hogy az egyszer inaktív állapotba került regulátor régiók megőrizték a zárt konformációjukat az egyedfejlődés teljes tartamára, másrészt hozzájárulnak a komplex géneinek finomszabályozásához is ott, ahol a regulátor régiók nyílt, aktív állapotban vannak.

2.

A fenti modellünk további megerősítést nyert azoknak a kísérleteknek a során, amelyekben helyettesítettük az *iab-7* PRE-t a *bx*d (665 bp-os) PRE-vel. Ezekben a kísérletekben első, sikertelen próbálkozás után egy, Francois Karch laboratóriumában kifejlesztett platform

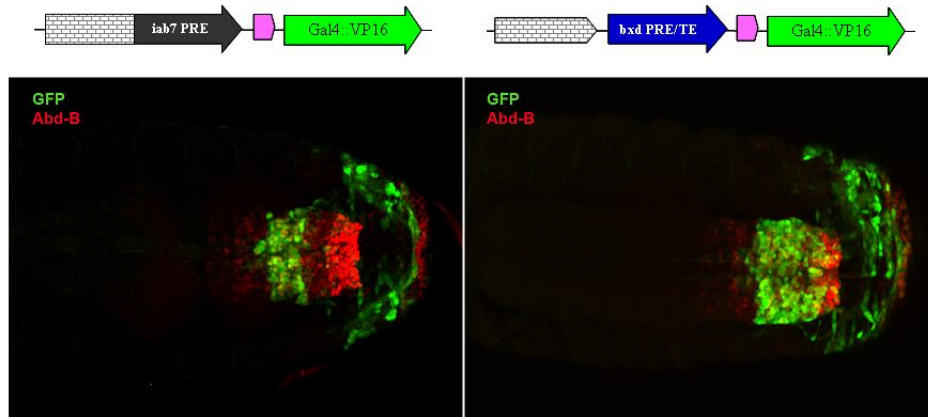
kromoszómát használtunk, amely jelentősen megkönnyítette a munkánkat. A kísérletek legfontosabb eredményei a következők:

2.1. Korábbi kísérleteink alapján tudjuk, hogy az *iab-7* PRE hiánya egy gyenge *Fab-7* jellegű, funkciónyeréses (GOF) típusú homeotikus transzformációt okoz. Ezt a fenotípust teljes mértékben menekíti a *bxd* PRE jelenléte.

2.2. Ugyanakkor az aktív állapotú *iab-7* cisz-regulátorban a *bxd* PRE az *iab-7* PRE-hez képest másképp viselkedik, amennyiben a hetedik potrohszelvény morfológiáját kis mértékben ugyan, de egyértelműen megváltoztatja. Ez a változás olyan jellegű, ami megfelel az *iab-7* cisz-regulátor részleges funkcióvesztésének, azaz az aktív állapotú regulátor régióban erősebb „silencer”, mint az endogén PRE. Ez a megfigyelés alátámasztja azt a feljebb vázolt elképzelést, hogy a PRE-k a cisz-regulátorok természetes célgénjeinek kifejeződését moduláló, finomhangoló szerepet töltenek be az aktív állapotú cisz-regulátorokban. További következtetésünk, hogy míg az inaktív konformáció fenntartásában a két általunk vizsgált PRE egyenértékű, az aktív állapotú szabályozó régióban különbözőképpen viselkednek, más hatásfokkal működnek. Ez csak úgy képzelhető el, hogy ha a hozzájuk kötődő fehérjekomplexek sem tökéletesen azonosak, legalábbis az egyes komplexeket alkotó fehérjék kötött állapotban eltöltött idejük különböző kell, hogy legyen. Érdeemes megemlíteni, hogy korábbi tapasztalatok szerint a *bxd* PRE transzgenikus vonalakban is erősebben inaktiválja a *miniwhite* riportergént, mint az *iab-7* PRE.

Az *iab-7* PRE és a *bxd* PRE együttes jelenléte csökkentette a Gal4::VP16 kifejeződési szintjét a PS13-ban, ami egyrészt jelzi, hogy alapvetően mindkét PRE képes az enhancer-promoter kapcsolatok szabályozására, másrészt azt is jelzi, hogy a két PRE képes együttműködni.

2.3. Ha az endogén, *iab-7* PRE mellé Gal4VP16 riportergént helyezünk, azt tapasztaljuk, hogy a kifejeződése majdnem kizárólag a hetedik potrohszelvénynek megfelelő testtájról korlátozódik, vagyis arra a szelvényre, amelynek a helyes kialakulásához az *iab-7* cisz-regulátor régió működése specifikusan szükséges. Ez azt tükrözi, hogy az *iab-7* az eggyel hátrébb elhelyezkedő szelvényben jórészt nincs kapcsolatban a célgénje (*Abd-B*) promóterével, mivel helyettesítődik egy másik, eggyel hátrébb aktiválódó cisz-regulátorral, az *iab-8-cal*. Ebben az esetben a Gal4VP16 promótere nincs az aktív kromatin tengelyjel azonos térrészben a sejtmagon belül, mivel azt az *iab-8* megfelelő elemei (*iab-8* enhanszerek, *iab-8* PRE) foglalják el. Ha azonban az *iab-7* PRE-t helyettesítő *bxd* PRE mellé építjük be a riportergént, azt tapasztaljuk, hogy a riportergén legalább egy szelvényel hátrébb is a hetedik szelvényel közel azonos szinten fejeződik ki (4. ábra), amit úgy értelmezünk, hogy a *bxd* PRE a riportergén promóterével együttműködve hibásan targetálódik, ott is beékelődik az aktív tengelybe, ahová az *iab-7* szabályozó elemei, beleértve az *iab-7* PRE-t is, már nem, vagy csak alig. Ez a hibás targetálódás fenotipikus következményekkel is jár, a nyolcadik potrohszelvény az *Abd-B* gén kismértékű funkcióvesztésének megfelelő morfológiát mutat, azaz a riportergén észrevehető mértékben kompetál az *Abd-B* génnel egy olyan szelvényben, amelyben a riportergént magába foglaló cisz-regulátor normálisan nem jut kimutatható szerephez. Ezeket az eredményeket összefoglalva, megállapíthatjuk, hogy a *bxd* PRE promóter-targetáló hatását autonóm módon megőrzi a normális környezetén kívül, „ektopikus” helyen is.



Fentebb említettük, hogy a bxd PRE funkciójának *in situ* vizsgálata fényt derített arra, hogy a PRE targetáló funkciója is moduláris felépítésű. Ezek alapján az *iab-7* régióban is megvizsgáltuk, hogy a bxd PRE-re jellemző A8 specifikus targetálódás kialakulásáért a PRE melyik része felelős. Ezek a vizsgálatok az *in situ* eredményekhez képest némileg eltérő eredményre vezettek. A bxd PRE 665 bp-os fragmentumát három kisebb részre osztottuk és vizsgáltuk azok aktivitását. Az egyik vizsgált fragmentum megfelelt a 185 bp-os PRE „magnak” (C fragmentum), a másik két fragmentum pedig az ettől disztálisan (T fragmentum) ill. proximálisan (L fragmentum) elhelyezkedő fragmentumoknak felelt meg. Azt tapasztaltuk, hogy az A8 specifikus targetálódáshoz főként a C és T fragmentumok járulnak hozzá, bár egy minimális aktivitással az L fragmentum is rendelkezik. Ezzel összhangban, a T és a C fragmentumok együttesen közel olyan erősek, mint a teljes bxd PRE. Összegzésében eredményeink megerősítik a BXD PRE moduláris felépítésére vonatkozó elképzeléseinket, továbbá az *in situ* vizsgálatokhoz hasonlóan jelzik, hogy az enhancer-promoter kommunikációban a PRE-től közvetlenül disztálisan elhelyezkedő régiók töltik be a legfontosabb szerepet. A „mag” PRE jelentősebb szerepét feltehetőleg az ektopikus környezet magyarázza.

3.

3.1 Munkánk során megkíséreltünk olyan konvertáns vonalakat előállítani, amelyek többszörös UAS szekvenciát hordoznak a bxd PRE közvetlen közelében úgy, hogy egyúttal a PRE eltávolítható legyen. Ezekkel a vonalakkal kettős célunk volt. Egyrészt az UAS szekvenciákhoz Gal4-DAM metiláz hibridfehérjét kívántunk kötni. Az UAS-hez kötött bakteriális DAM metiláz képes a hozzá fizikailag közel eső DNS szakaszokat metilálni, aminek segítségével fel kívántuk térképezni a bxd cisz-regulátor térbeli helyzetét a PRE-hez viszonyítva (DAM ID módszer). A másik felhasználási mód esetében a konvertánsok UAS szekvenciájához olyan hibridfehérjéket kívántunk kötni, amelyekben a Gal4 fehérjéhez különböző, működőképes Polycomb fehérjék kapcsolódnak. Ezek felhasználásával azt szerettük volna megvizsgálni, hogy képesek-e a helyhez kötött hibridfehérjék helyettesíteni a PRE funkcióját, ha a PRE-t eltávolítjuk. Ezeket a konvertánsokat azonban többszöri kísérletre sem sikerült előállítanunk, mert a konvertánsok kivétel nélkül elpusztultak az egyedfejlődés különböző stádiumaiban. Ennek az lehet a magyarázata, hogy a Gal4VP16 gént használtuk konverziós markerként. A Gal4VP16 által kódolt transzkripciós factor kötődik az UAS szekvenciákhoz, és elképzelhető, hogy az így feltöltött UAS szekvenciák enhanszerként működve túlhajtják a Gal4VP16 expresszióját. Ez a pozitív visszacsatolás azután olyan mennyiségű Gal4VP16 fehérjét eredményez, amely elpusztítja azokat a sejteket, amelyekben



Gal4VP16 egyáltalán átíródik. Ezért megterveztünk és előállítottunk olyan konverziós konstrukciókat, amelyben a Gal4VP16 gént a *rosy* markergén helyettesíti. A konstrukciók beinjektálása után számos olyan utódot kaptunk, amelyek szemszínük alapján hordozták a *rosy* markergént. Ezek utódaiból vonalakat alapítottunk, amelyek további vizsgálata során kiderült, hogy egyikük sem valódi konvertáns, azaz nem a tervezett helyen hordozza a markergént, hanem a genom más részein véletlenszerűen integrálódott konstruktot hordozó, transzformáns vonal. Ez azért lehetséges, mert a *rosy* gén nem sejtautonóm módon fejeződik ki, vagyis a test bármely szövetében kifejeződve képes biztosítani a vad szemszínét. A konverzió hiányát nem tudjuk kielégítően magyarázni; elképzelhető, hogy a markergén hossza (hozzávetőleg 8 kb) súlyosan nehezíti a tervezett helyre való integrálódást.

4.

Ezzel egyidőben a csoportunk által kifejlesztett kétlépcsős génkonverziós módszer segítségével határoló elemet (boundary, izolátor elem) építettünk a *bx*d PRE egyik, illetve másik oldalára. (A felhasznált határoló elem nem más, mint a SUPPRESSOR OF HAIRY WING fehérje célszekvenciáját 12 példányban tartalmazó DNS szakasz. Ez a szekvencia minden eddigi kísérleti elrendezésben kiválóan működött határoló elemként.) A határoló elem mellé jobbról, illetve balról a Gal4-VP16 riportergént helyeztük el. Ez utóbbi azt a célt szolgálta, hogy információt nyerjünk az izolátor elem által leválasztott cisz-regulátor szakasz funkcionális állapotáról a riportergén kifejeződési mintázatának segítségével. Így a PRE, a határolóelem és a riportergén egymáshoz viszonyított sorrendjét tekintve 4 különböző konvertánst állítottunk elő. Időközben felmerült annak a lehetősége, hogy a Gal4-VP16 transzkripciója (elsősorban az átíródás iránya) hatással lehet a *bx*d/*pbx* cisz-regulátor régió magasabbrendű kromatinszerkezetére, és ezen keresztül az *Ubx* gén kifejeződésére, e kérdés vizsgálatára létrehoztuk az egyik konverziós konstrukció olyan változatát is, amelyben a Gal4-VP16 orientációja az előzővel ellentétes. A helyes beépülést minden esetben igazoltuk genomikus PCR és szekvenálás segítségével is.

4.1. A konvertánsok heterozigóta formában vad fenotípusúnak bizonyultak, hemizigóta formában (azaz abban az esetben, amikor a homológ kromoszóma olyan deléciót hordozott, amely eltávolítja a *BX-C-et*.) azonban homeotikus transzformációkat figyeltünk meg rajtuk, például az első potrohszelvényük helyén az utótorra jellemző szöveti struktúrák jelentek meg. E fenotípusok hátterében az *Ubx* gén csökkent expressziója áll, ami azzal magyarázható, hogy a határolóelemmel „leválasztottuk” az *Ubx* génről a *bx*d cisz-regulátor régióban található enhanszerek mintegy felét. A csökkent *Ubx* expressziót ellenanyagos festéssel is kimutattuk.

4.2. Azokban az esetekben, ahol a határolóelem elválasztja a PRE-t és a Gal4-VP16-ot, várakozásunknak megfelelően a Gal4-VP16 ektopikus expressziót mutatott a lárvális CNS-ben és más szövetekben (pl. trachea, PNS, zsírsejtek). Meglepő azonban, hogy az ektopikus kifejeződéssel egyidejűleg a kifejeződési mintázat az első potrohszelvénytől kezdődően erősebb marad, mint attól előrébb, ami azt mutatja, hogy a *bx*d cisz-regulátor régióban a *bx*d PRE-től disztálisan található(k) még gyenge PRE-aktivitású szakasz(ok). Ennek a felismerésnek a jelentősége abban áll, hogy ezek az alárendelt PRE-szerű működést mutató szakaszok lehetnek felelősek azért a jelenségért, hogy az ismert PRE eltávolítása után néhány generációval a PRE deléciót hordozó vonalak funkcionyeréses fenotípusa fokozatosan gyengül, a vad fenotípus felé tolódik el. Elképzelhető, hogy ezek a „mellék-PRE”-k epigenetikusan átstrukturálódnak, és fokozatosan átveszik a fő PRE szerepét.

4.3. A határoló elemmel kettéosztott *bx*d régióban a Gal4-VP16 kifejeződési mintázatának vizsgálata révén meg tudtuk állapítani, hogy központi és a periférikus idegrendszerben,

valamint a lárvális epidermisben működő enhanszerek a *bxd* mindkét oldalán redundánsan vannak jelen, míg trachea, limph gland, és imaginális diszkusz enhanszerek csak a disztális oldalon találhatók.

5.

Az X-ChIP technika alkalmazásában a tervezetthez képest jelentősen elmaradtunk. Ennek oka kettős: egyrészt jelentkező hiányában nem sikerült megfelelő felkészültségű munkatársat alkalmaznunk, másrészt a PRE működésére vonatkozó eredményeink arra készítettek minket, hogy a meglévő erőnket az ezzel kapcsolatos munkákra összpontosítsuk. Mindazonáltal jelentős előrehaladást értünk el az elmúlt mintegy másfél évben. Lényegében minden, az *Ubx* szabályozási egység területén korábban más laboratóriumban elért eredményt sikerült reprodukálnunk, így felkészültünk arra, hogy az általunk előállított mutáns vonalakban megvizsgáljuk a mutációk által a kromatinszerkezetben okozott változásokat. Ez az előrelépés arra készítette minket, hogy megkíséreljük felhasználni a technikát arra, hogy az *Ubx* promóter és a *bxd* PRE közötti fizikai kapcsolatot közvetlenül kimutassuk. Ezt a kapcsolatot eredetileg a DAM ID felhasználásával terveztük kimutatni, azonban, mint feljebb ismertettük, a szükséges konvertáns vonalakat nem sikerült előállítanunk. Egy másik lehetőséget jelentene az ún. „conformation capture” technika alkalmazása. Ehhez azonban nagy mennyiségű, megfelelően szétválogatott sejt lenne szükséges. Úgy gondoltuk, hogy ezeket a technikai nehézségeket megkerülhetnénk az X-chip technika alkalmazásával. Elképzelésünk azon alapult, hogy az *Ubx* – *bxd* szabályozási rendszerben a korábbi adatok szerint egyedül az *Ubx* promóter közvetlen környezetében található jelentősebb mennyiségben az aktív állapotot jellemző, a 4-es lizinen trimetilált H3 hiszton (H3-K4met3). Úgy gondoltuk, hogy olyan kromatin immunoprecipitációs kísérletben, amelyben a H3-K4met3 elleni ellenanyagot használunk, precipitálható nemcsak az *Ubx* promóter régió, hanem a *bxd* PRE-nek megfelelő DNS szakasz is, ha a két régió a genetikai kísérleteink eredményeinek megfelelően valóban egymás közvetlen közelében található azokban a sejtekben, amelyekben a *bxd* szabályozó régió aktív/nyitott konformációjú. Kvantitatív PCR segítségével elvégzett kísérleteink részben igazolták ezt az elképzelést, amennyiben valóban kimutatható a *bxd* közvetlen közelében a környezetéhez képest magas H3-K4met3 szint az aktív doménben. A kísérletben az aktív domént a billér, illetve a harmadik láb imaginális kezdeményei (imaginális diszkuszok) reprezentálták. Azonban hasonlóan magas szintet találtunk a *bxd* PRE területén azokban a mintákban is, amelyek olyan szövetből származnak (szárny-, illetve második láb diszkusz), ahol a *bxd* domén inaktív, zárt konformációjú. Ez az eredmény azt mutatja, hogy az aktiváló komplexek képesek a közvetlen környezetükben a H3 hiszton 4-es pozíciójű lizinjét metilálni az inaktív állapotban is. Ez annyiban meglepő, hogy ellentétben áll a korábban más csoportok által közölt eredményekkel, valamint azzal a felfogással, hogy a H3-K4met3 jelenléte a transkripció aktivitással van összefüggésben. Ugyanakkor azt is megmutatta, hogy az eredeti elképzelésünk hibás volt, ezzel a módszerrel nem lehet az *Ubx* promóter és a *bxd* PRE közötti fizikai kapcsolatot kimutatni.

6.

Korábbi munkáinkból kiderült, hogy a *bxd* PRE egy 185 bp-os szakasza kulcsfontosságú az *Ubx* gén normális működéséhez, hiánya poszterior irányú szegmentális transzformációkat okoz már heterozigóta formában is. Az általunk kidolgozott, génkonverzió alapuló technika segítségével lehetővé vált, hogy idegen DNS-szakaszokat építsünk be az esszenciális 185 bp-os *bxd* PRE helyére és megvizsgáljuk, hogy képes-e az idegen DNS részben vagy teljesen ellátni a hiányzó *bxd* PRE-mag funkcióját. Két más, de szintén a bithorax-komplexből származó régió (*Mcp* és *iab-7* PRE-k) sikeresen helyettesítette a *bxd* PRE-t (*Kozma és mtsai.*, 2008, *MGG*). Mindhárom PRE-régióra igaz, hogy kis méretük ellenére (>200 bp) nagy

számban tartalmaznak GAGA és PHO kötőhelyeket (legalább 4 PHO és 3 GAGA), melyek elrontása a *bx*d PRE-ban hasonló erősségű és penetranciájú, mutáns fenotípust eredményez, mint a 185 bp *bx*d PRE-mag teljes hiánya.

Emlősökben két éve írták le az első PRE-t. Rendszerünkben humán HOX-génből (Hox-7,8 és 9) származó olyan DNS-régiókat is teszteltünk, melyekről elképzelhető, hogy eredeti helyükön PRE-ként viselkednek. Bár az emlős szekvenciákban a PHO és GAGA fehérjék kötőhelyei az ismert és helyettesíteni képes *mus*lica PRE-régiókhöz hasonló számban fordulnak elő, mégsem tudták helyettesíteni a *bx*d PRE-t. Ennek alapján feltételezhető, hogy e két fehérjén kívül egyéb, eddig azonosítatlan szekvenciákhoz kötődő faktorokra is szükség van a *bx*d PRE működéséhez, amelyek kötőhelyei hiányoznak az emlős szekvenciákból.

7.

7.1 Korábban laborunkban előállítottunk több, az *iab-7* PRE-t tartalmazó transzgenikus, *miniwhite* riportergént tartalmazó vonalat. Ezek részletes fenotipikus jellemzését elvégeztük, és azonosítottunk több, független párosodás érzékeny vonalat, melyek közül három olyat választottunk ki további vizsgálatra, amely az X kromoszómán található, és homozigóta formában világos, de jól látható a szemszínt eredményez, vagyis a *miniwhite* riportergén kifejeződése alacsony szintű ugyan, de nem inaktíválódott teljesen. Ennek az a jelentősége, hogy ilyen kifejeződési szint mellett mind az inaktíváló-, mind az aktiváló hatás érzékelhető változást okoz a szemszínben. Megállapítottuk, hogy minden ismert, egyszerű funkcióvesztése *Brm*, *moira* és *osa* allél világosítja a PRE-t tartalmazó transzgent hordozó állatok szemszínére. Mindhárom gén olyan fehérjét kódol, amelyek részei ún. „remodeling complex”-eknek. A *Df(3R)trx* két olyan vonalon, amelynek szemszíne mozaikos, világosító hatást mutatott, míg egy harmadikra, amely majdnem homogén szemszínt mutat, nem hatott. Ezért a TRX protein PRE-n belüli támadáspontjára vonatkozóan nem tudtunk biztos következtetést levonni.

7.2 A fenti három vonalból a PRE-régiót flipáz enzimet hordozó kromoszómákhoz való keresztezés segítségével eltávolítottuk, aminek eredményeképpen a párosodás érzékenység megszűnt, és az így kialakított vonalakra a továbbiakban nem hatottak sem a klasszikus *Polycomb* mutánsok, sem a *trx* csoport génjeinek mutációi. Ezzel igazoltuk, hogy a transzgén és a *Polycomb*, illetve *trithorax* csoport mutáns változatai közvetlenül a PRE-n keresztül hatnak, vagy legalábbis a hatásukhoz szükséges a PRE jelenléte. Ezek után megvizsgáltuk, hogy a munkaterv V. pontjában leírt transzregulációs mutagenézis kísérletben izolált, és a funkcióvesztéses allélokhoz képest szokatlanul viselkedő *brm* és *osa* allélek, illetve a két legnagyobb komplementációs csoportot alkotó *ebi* és *hdac3* allélek milyen hatást gyakorolnak rájuk. Azt találtuk, hogy a különleges *brm* és *osa* alléleknek a jelenlétében az *iab7* PRE-t és *miniwhite* riportergént tartalmazó konstrukciókat hordozó vonalak szemszíne még világosabbá vált, mint az egyszerű funkcióvesztéses allélok esetében. Ez a hatás éppen ellentétes azzal a *Polycomb* csoport funkcióvesztéses alléljaira emlékeztető hatással, amit a a *Fab-7* fenotípusra gyakorolnak (a 6. potrohszelvény még inkább a 7. szelvényhez válik hasonlatossá - a mutánsizolálás részleteire vonatkozóan lásd a tudományos háttérben leírtakat). A két adatsorból arra következtettünk, hogy:

I, a „nucleosoma remodeling complex”-eknek szerepük van a PRE működésében is, pl. a gyakorlatilag nukleosóma-mentes DN-áz hiperszenzitív régiók kialakítása vagy fenntartása révén, és működésük a PRE inaktíváló, „silencer” hatását ellensúlyozza,

II, a különleges, „domináns negatív” (a *Drosophila* kutatás nomenklatúrájában antimorfként ismert) allélek *Fab-7* fenotípusra gyakorolt hatása nem a PRE-n keresztül, hanem attól függetlenül és azzal ellentétes módon valósul meg.

Az *ebi* allélok különböző mértékű sötétítő hatást mutattak a konstruktokon, a *hdac3* allélokhoz hasonlóan, ami arra utal, hogy ezek a gének is részt vesznek a PRE működésében, amelyre eddig nem volt közvetlen adatunk. A rendelkezésünkre álló funkcióvesztéses allélok azonban nem, vagy csak kis mértékben hatottak a transzgenikus vonalaink szemszínére. Hogy közelebb jussunk ennek az ellentmondásnak a feloldásához, megszekvenáltunk 12, általunk izolált mutáns *ebi* allélt. Azt találtuk, hogy kivétel nélkül mindegyik az EBI fehérje fehérje-fehérje kölcsönhatást közvetítő, ún. „WD repeat” régiójának egy meghatározott, két „propeller struktúra” között elhelyezkedő, kihurkolódó szakaszán okoz változást. Feltételezzük, hogy ennek a fehérjeszakasznak a változása meghatározott fehérje-fehérje kapcsolat kialakítását akadályozza meg vagy nehezíti, ezáltal „domináns negatív” jellegű adva a mutáns alléleknek.

Ezek az eredmények legegyszerűbben úgy értelmezhetők, hogy az *ebi* és a *hdac3* gének a Polycomb csoportba sorolandók, azaz részt vesznek az inaktív konformáció fenntartásában. Annak érdekében, hogy az *ebi* gének az inaktivációban játszott szerepét tisztázzuk, heterozigóta *ebi* mutáns nőtények ivarsejtvonalában homozigóta klónokat indukáltunk, majd ezeket a nőtényeket megfelelően markerelt *ebi* heterozigóta hímekhez kereszteztük. Ilyen módon olyan embriókat állítottunk elő, amelyek vad típusú allélt sem anyai eredetű, sem zigotikus eredetű formában nem tartalmaznak. Ezek az embriók súlyos fejlődési rendellenességeket mutattak ugyan, de ABD-B elleni ellenanyaggal megfestve őket annyi egyértelműen megállapítható, hogy az ABD-B kifejeződésének elülső határa, a vad típusal megegyezően, az 5. potrohszelvényben található, azaz az EBI fehérje gyakorlatilag teljes hiánya sem okoz ektopikus Abd-B expressziót. Ez az ellentmondás azonban feloldható, ha feltételezzük, hogy az EBI fehérje szerepe nem az egyes cisz-regulátor domének inaktív állapotának fenntartásában, hanem a POLYHOMEOTIC fehérjéhez hasonlóan (lásd alább!) az aktív doménen belüli enhanszerek hatásának moderálásában/visszafogásában van. Ezt az elképzelésünket közvetett módon alátámasztja az az időközben közölt eredmény, hogy az EBI fehérje a POLYHOMEOTIC-kal együtt integráns része a Polycomb csoport fehérjék által alkotott egyik, jól jellemzett komplexnek, a PRC1-nek.

Jelen pályázat megkezdése előtt itt nem részletezhető kísérleti eredményekre támaszkodva arra a meggyőződésre jutottunk, hogy az egyes PRE-k nemcsak a cisz-regulátorok inaktív/zárt konformációjának fenntartásában játszanak kulcsszerepet, hanem a nyílt konformációban is silencerként működnek, és a velük azonos doménben helyetfoglaló enhanszereknek a célpromóterre gyakorolt hatását visszafogják, gyengítik, és a PRE-knek ebben a funkciójában néhány Polycomb fehérje is részt vesz. Ezt a feltételezésünket igen bonyolult genetikai apparátus felhasználva igyekeztünk bizonyítani. A rendkívüli nehézséget az okozta, hogy igen körülményes, ha egyáltalán lehetséges az egyes cisz-regulátorok inaktív állapotának megszűnését, illetve az aktív doménben megerősödő enhanszerhatás következményét egymástól elkülönítve vizsgálni. Különböző deléciókat és a Polycomb csoport génjeinek különleges mutációit kombinálva véleményünk szerint mégis sikerült igazolni a feltevésünket. Eredményeinket egy közleményben foglaltuk össze, és azt a tavalyi évben közlésre benyújtottuk. Cikkünk közlését azonban elutasították, legfőbb kifogásként azt említve, hogy a következtetéseinket csak fenotipikus változásokra alapoztuk, és javasolták, hogy közvetlenül a géntermék mennyiségének változását kövessük. Ezt a javaslatot a fentebb már vázolt oknál fogva elvetettük: a szabályozott gén termékének mennyisége egyaránt növekedhet ektopikus aktiváció, és az enhanszerek megnövekedett hatása következtében, azaz a speciális feladatot ilyen módon nem lehet teljesíteni. Gyökeres fordulatot jelentett azonban az a laborunkban a közelmúltban született felismerés, hogy azokban az állatokban, amelyek Gal4VP16 markergént hordoznak különböző Bx-C cisz-regulátorokba ékelődve, a markergén

kifejeződésének elülső határa egyáltalán nem változik meg egyetlen fejlődési alakban sem egy (gyengén) homozigóta életképes mutáns *Polyhomeotic* allél, a  $ph^{410}$  jelenlétében, noha az állatoknak igen erős, a Bx-C funkciónyeréses fenotípusaira emlékeztető fenotípusuk van. Ez azt jelenti, hogy a  $ph^{410}$  mutáció hatására az egyes cisz-regulátorok nem aktiválódnak a normális aktivitási mintázatuknál előrébb. A mutáns fenotípus tehát kizárólag az egyes cisz-regulátorok normál aktivitási mintázatukon belüli hiperaktivitásának a következménye. Ezért felnőtt, homozigóta  $ph^{410}$  állatok hatodik és hetedik tergitjét kivágtuk, majd ezekben a mintákban kvantitatív PCR segítségével megmértük az *Abd-B* RNS mennyiségét. Azt tapasztaltuk, hogy mindkét, mutáns fenotípusú szelvényből származó mintában mintegy kétszerese az *Abd-B* RNS mennyisége, mint a megfelelő vad kontrolban. A kísérletet többször megismételve is következetesen hasonló eredményt kaptunk. Ez az eredmény teljes összhangban van az adott szelvények morfológiai változásával, így ezzel bizonyítottnak tekinthető, hogy a polycomb csoport génjeinek legalább egy része – és ezért az elsődleges támadáspontjuk, illetve kötőhelyük, a PRE-k is - szerepet tölt be az aktív állapotú cisz-regulátorokban is, ahol hozzájárul az enhanszerek hatásának finomszabályozásához. Ezen PC-G gének egyike a *Polyhomeotic* gén.