

OTKA zárójelentés

PD 72491, témavezető: Bodai László

Készült: Szeged, 2011. 03. 21.

Jelen pályázat azt tűzte ki céljául, hogy meghatározzuk és jellemezzük az ekdizon indukálta génaktiváció során *in vivo* bekövetkező hiszton módosításokat és azok időbeli változásait; azonosítsuk az ezek létrehozásáért felelős fehérje faktorokat, valamint megvizsgáljuk e módosítások szerepét a génaktiváció folyamatában.

A prodzsekt teljesítése során a kitűzött kutatási célokat döntő részben teljesítettük. Az elért eredmények egy részét két színvonalas, az OTKA támogatást feltüntető nemzetközi közleményben publikáltuk (*Nucl Acid Res.*, *Mol Cell Biol.*), melyek összesített impakt faktora 13,5. Emellett további 1-2, a prodzsekt során nyert eredményeken alapuló közlemény megjelenése várható. A prodzsekt eredményeiről rendszeresen beszámoltunk számos hazai, és nemzetközi konferencián.

A pályázati munka eddig nem publikált további eredményeit a következő 2 éven belül tervezzük megjelentetni, ezért kérem, hogy a pályázat minősítését az OTKA kiegészítő eljárásban később módosítsa. Ugyanezen okból kérem, hogy a zárójelentés anyagát publikus adatbázisba (REAL) a következő 12 hónapban egyelőre ne töltsék fel.

Lényeges személyi eltérések a pályázatban foglaltakhoz képest nem történtek. A pályázatban egyedül nevesített Bodai László témavezető mellett a prodzsekt végrehajtásában részt vett Zsindely Nóra PhD hallgató, valamint három egyetemi hallgató készítette a szakdolgozatát a pályázat által támogatott témában (Neparáczki Endre, BSc 2009., Gáspár Renáta, MSc 2011., Kristó Ildikó, MSc 2011.).

A kutatás főbb eredményei:

Az eredeti kutatási terv szerint az ekdizon választ exogén módon adagolt hormon analóggal kívántuk indukálni, azonban azt találtuk, hogy intakt lárvák Ponasterone A kezelésével nem váltható ki a vizsgált géneknek az endogén ekdizon hullámkor megfigyelhető drasztikus aktivitásváltozása. Ezért a későbbi kísérletekben szinkronizált lárvákban az endogén ekdizon indukció hatására bekövetkező változásokat vizsgáltuk.

Az *Eip74EF* és *Eip75B* gének expressziója a harmadik lárvastádium során

Az *Eip74EF* (*E74*) és *Eip75B* (*E75*) korai ekdizon indukálta gének komplex transzkripciós egységek, amelyek több promóterről számos transzkriptum variánst termelnek. Vizsgálataink során olyan promóterek kromatin szerkezetének analízisét tűztük ki célul, melyek az ekdizon válasz során eltérő módon aktiválódnak. Három promótert, az *E74* gén *RA* és *RB*, valamint az *E75* gén *RC* promóterét teszteltünk arra nézve, hogy megfelel-e ennek a kritériumnak. Ehhez a harmadik lárvastádium során vizsgáltuk a promóterekről képződő nascens RNS mennyiségét. Az *E74-RA* promóter kikapcsolt állapotban van az L3 stádium első 36 órájában, majd 8 órával a bábozódás előtt erősen indukálódik. Az *E74-RB* promóter az L3 stádium során végig magasabb szinten expresszálódik, a bábozódást megelőző 12 órában mérsékelten indukálódik, közvetlenül a bábozódás előtt expressziója visszaesik. Az *E75-RC* promóter alacsony szinten expresszált az L3 lárvastádium során, a bábozódást megelőző utolsó 8 órában transzkripciója mintegy ötszörösére nő.

Hisztón módosítások az *Eip74EF* és *Eip75B* gének területén

Késői L3 lárva stádiumban H3 hisztón elleni ellenanyaggal CHIP kísérletben kimutattuk nukleoszómák jelenlétét az *E74-RA*, *E74-RB* és *E75-RC* promótereken, valamint a

transzkripciós egységek 5' ill. 3' végein található átírt régiókban. A vizsgált régióban sikeresen kimutattuk az RNS polimeráz II. komplex jelenlétét is.

Számos hiszton módosítás (H3K4me3, H3K9ac, H3K18ac, H3K23ac, H3K36me2, H4ac, H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac, H4K16ac) jelenlétét vizsgáltuk az *E74* és *E75* géneken vándorló L3 stádiumban. E módosítások közül ötöt lehetett megbízhatóan kimutatni (H3K9ac, H3K23ac, H4K8ac, H4K12ac és H4K16ac), amelyeket tovább vizsgáltunk az L3 stádium három pontján: az L2/L3 vedlés után 28-32 órával; vándorló lárva stádiumban, valamint közvetlenül a bábozódás előtt álló lárváknál.

A H3K9 acetiláció kimutatható az *E74* és *E75* géneken, de nem mutat szignifikáns eltéréseket sem a fejlődési állapottal, sem a vizsgált funkcionális régióval (promóter, 5' és 3' átírt régiók) összefüggésben. A H3K9 lizin a *gcn5* tartalmú SAGA hiszton acetiltransferáz komplex egyik targetje. E komplex *Ada2b* alegységére mutáns lárvák vizsgálatával kimutattuk, hogy a SAGA komplex részt vesz az *E74* és *E75* géneken történő H3K9 acetilációban, és hiányában e gének expressziója csökkent mértékű. *Ada2b*⁸⁴² és vad típusú, bábozódás előtt álló L3 lárvákon végzett összehasonlító CHIP analízissel kimutattuk, hogy a H3K9 acetiláció csökkent a SAGA komplex számos más target génjén is. Meglepő módon e targetek között vannak olyanok is, amelyek aktiválódnak, és olyanok is, amelyek represszálódnak az *Ada2b* mutánsban. Így ez a hiszton módosítás valószínűleg abban játszhat szerepet, hogy fehérje faktorok számára hozzáférhetővé teszi az általa érintett géneket, de önmagában nem határozza meg egyértelműen a génexpressziós szint módosításának irányát.

A H3K23 acetiláció az egyetlen olyan általunk eddig vizsgált hiszton PTM, amelyet egyértelműen összefüggésbe lehet hozni az *E74* és az *E75* gének aktivációjával. Ez a módosítás az általunk vizsgált pozíciók közül az ekdizon indukálta gének promóterein dúsul fel magas ekdizon szintnél. Létrehozásáért a nejlire géntermék felelős (lásd lent), *Ada2b* mutánsban szintje nem változik.

A H4K8, H4K12 és H4K16 acetiláció jellemzően hasonló képet mutat. Ezek a módosítások minden vizsgált régióban megfigyelhetők a 28-32 órás valamint vándorló L3 lárvákban, majd a szintjük csökken a közvetlenül a bábozódás előtt álló lárvákban. Kifejezett pozicionális hatás ezekre a módosításokra nem volt jellemző, amiből arra következtetünk, hogy ezeknek a módosításoknak az L3 stádium végén megfigyelhető mennyiségi változásai elsősorban általános kromoszóma szerkezeti vagy transzkripciós kompetenciabeli változásokkal lehetnek asszociáltak. A H4K12 acetilációját a *gcn5* tartalmú ATAC komplex katalizálja. Azt találtuk, hogy ez a komplex szerepet játszik az *ekd*-on bioszintézisét végző enzimek expressziójában. Exogén *ekd*-on kezeléssel az ATAC hiányos (*Ada2a* mutáns) lárvák letális fenotípusát részlegesen menekíteni tudtuk, valamint a kezelés hatására részlegesen helyreállt az *E74* és *E75* gének indukciója is, ami arra utal, hogy az ATAC komplex áttételesen, az *ekd*-on szint szabályozásán keresztül is befolyásolja e gének transzkripcióját. Kimutattuk, hogy a H4K8 lizin acetilációját a *gcn5* acetiltranszferáz végzi, enzimkomplexhez ezt az aktivitást eddig nem sikerült kötni.

A H3 hiszton K23 lizinjének acetilációjáért felelős faktor azonosítása

Mivel az *E74* és *E75* géneken a vizsgált kromatin jelek közül a legjelentősebb változást a H3 hiszton K23 lizinjének acetilációja mutatta, kísérleteket végeztünk abból a célból, hogy ezt a módosítást létrehozó acetiltranszferázt azonosítsuk. Kétféle megközelítést alkalmaztunk: egyrészt a rendelkezésünkre álló HAT mutánsokat western-blot analízissel végigteszteltük a H3K23ac módosítás szintjére nézve; másrészt célzott kísérleteket végeztünk az irodalmi adatok alapján jelöltként azonosított *nejire* (a humán CBP homológja) génnel. Western blot analízissel vándorló L3 lárvá stádiumban vizsgáltuk az acetilált H3K23 szintjét homozigóta *chm¹⁴*, *mof²*, *gcn5^{E333st}*, *Ada2a^{d189}*, *Ada2b^{d842}* mutánsokban (ez utóbbiak *gcn5*

tartalmú fehérje komplexek alegységei). Ezekben a mutánsokban nem tapasztaltunk eltérést a vad-típusú kontrolltól.

Mivel a *nejire* mutációi embrionális letális fenotípusúak, ezért a *nejire* hatását a H3K23 acetilációra embriók immunfestésével vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy a *nejire* túlhajtása UAS-CBP konstrukcióról nagymértékben fokozta a H3K23 acetiláció szintjét, míg az acetiltranszferáz doménjében mutációt hordozó UAS-CBP-FLAD konstrukció expresszálása nem járt ilyen hatással. Ezt az eredményt kétféle, eltérő szövet specifitású GAL4 driver felhasználásával is kimutattuk. Ez az eredmény bizonyítja, hogy a CBP képes a H3K23 acetilációjának katalizálására *in vivo*. Ez után igazolni akartuk, hogy az endogén *nejire* géntermék szerepet játszik e módosítás létrehozásában, ezért *nej³* mutáns valamint kontroll embriókat festettünk α -H3K23ac ellenanyaggal. Megállapítottuk, hogy a mutánsokban a módosítás mennyisége szignifikánsan alacsonyabb, így igazolást nyert, hogy a *nejire* fehérje ténylegesen szerepet játszik a H3K23 lizin acetilációjában.

A *nejire* esszenciális a lárvális fejlődések folyamán, és szükséges az ekdizon indukálta gének megfelelő expressziójához

Hogy a *nejire* lárvális élet folyamán játszott szerepét vizsgálni tudjuk, *nejire* RNS interferencia konstrukciókat hordozó transzgenikus törzseket szereztünk be osztrák és japán törzsközpontokból. A *nejire* szerepét az egyedfejlődés során úgy vizsgáltuk, hogy a *nej-RNSi* transzgeneket hősokk-GAL4 driverrel meghajtva lecsökkentettük a mennyiségét az egyedfejlődés különböző stádiumaiban. Mindkét vizsgált *nej-RNSi* vonal esetében azt tapasztaltuk, hogy a peterakást követő 3., 4., 5. és 6. napon, azaz az L2 és L3 lárvastádiumok, valamint a prepupa stádium során hősokkolt állatok életképessége jelentősen lecsökkent; míg az 1., 2. és 7. napon, azaz az embrió, L1 és báb stádiumban hősokkolt állatok életképessége csak kisebb mértékű változást mutatott. Ebből egyrészt arra következtethetünk, hogy a

petében olyan mennyiségű maternális nejure géntermék lehet felhalmozva, amely kompenzálja a nej-RNSi hatását az egyedfejlődés első két napja során. Másrészt kimutattuk, hogy a nejure szükséges a lárvális élet során és a korai bábban, ami valószínűsíti, hogy szerepe lehet az ezekben a stádiumokban az egyedfejlődési folyamatokat koordináló ekdizon válaszban.

A *nejire* csendesítésének az ekdizon indukálta génekre gyakorolt hatását harmadik stádiumos lárvákban vizsgáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy a *nej-RNSi* konstrukciót expresszáló lárvákban jelentősen csökkent a transzkripció mértéke az *E74-RA*, *E74-RB* és *E75-RC* promóterről, valamint csökkent az *E74* és *E75* mRNS mennyisége is.

FLAG-tag jelölt HAT transzgenikus törzsek előállítása

Létrehoztunk olyan *Drosophila* törzseket, amelyek különböző hiszton acetiltranszferáz fehérjék FLAG taggel jelölt változatait expresszálják. Ehhez először előállítottunk egy olyan módosított Gateway vektort, amely lehetővé teszi FLAG peptid C-terminális fúzióját, valamint tartalmazza a ϕ C31 fág attB integrációs helyét (pTWF-attB), majd ezt a vektort felhasználva helyspecifikus integrációval építettük be a transzgéneket. Ilyen módon hoztuk létre UAS-Pcaf-FLAG, UAS-chm-FLAG, UAS-Tip60-FLAG, UAS-mof-FLAG valamint UAS-CG14222-FLAG vonalakat. A transzgenekről történő expressziót α -FLAG ellenanyaggal végzett western-blot analízissel igazoltuk, amely az UAS-chm-FLAG vonalakat leszámítva pozitív eredményt hozott. A transzgenek hatását actin-GAL4 és daughterless-GAL4 driver törzsekkel összekeresztelve vizsgáltuk. A mof túlhajtása letalitást eredményezett, a többi transzgen nem csökkentette az életképességet és nem mutatott látható fenotípust.

Kapcsolódó publikációk:

(melyekben az OTKA támogatás feltüntetésre került)

Zsindely N, Pankotai T, Ujfaludi Z, Lakatos D, Komonyi O, Bodai L, Tora L, Boros I.

The loss of histone H3 lysine 9 acetylation due to dSAGA-specific dAda2b mutation influences the expression of only a small subset of genes. *Nucl Acid Res.* **2009.** 37(20):6665-80.

Impakt faktor: 7.479

Pankotai T, Popescu C, Martín D, Grau B, Zsindely N, Bodai L, Tora L, Ferrús A, Boros I. Genes of the ecdysone biosynthesis pathway are regulated by the dATAC histone acetyltransferase complex in *Drosophila*. *Mol Cell Biol.* **2010.** 30(17):4254-66.

Impakt faktor: 6.057