

*Kromatinszerkezet és génműködés kapcsolata ecetmuslicában*

Tézis

Dr. Gyurkovics Henrik

MTA Szegedi Biológia Központ

Genetika Intézet

1996

A magasabbrendű eukarióta szervezetekben a génkifejeződés szabályozásának egyik módja a kromatinszerkezet változásai révén valósul meg. Munkacsoportunk ezért a kromatinszerkezetet befolyásoló *Drosophila* gének azonosítását tűzte ki célul. Az egyik lehetséges megközelítés a pozíció effektus variegációt (PEV) módosító gének azonosítása, mivel ezek a heterokromatin-eukromatin átalakulást szabályozzák. Elsősorban azokra a PEV módosító génekre fordítottuk a figyelmünket, amelyek egyes eukromatikus gének, így pl. az egyedfejlődésben fontos, ún. homeotikus gének kifejeződését is szabályozzák. Ezzel párhuzamosan megvizsgáltuk, hogy a homeotikus gének tér- és időspecifikus működése milyen mértékben függ a kromatin-konformáció változásaitól. Az alábbiakban vázlatosan ismertetem az ezekkel a kérdésekkel összefüggő eredményeinket

## **1. Heterokromatinizációt befolyásoló *Drosophila* gének és hatásuk más eukromatikus gének kifejeződésére**

### A 87B kromoszómális régióban lévő PEV-szuppresszor gén szerveződése

A pozíció effektus variegáció jelenségének oka általában az, hogy egy eukromatinban található gén egy kromoszóma-átrendeződés következtében a központi heterokromatin közvetlen szomszédságába kerül, és az erősen kondenzálódott heterokromatin hatására a gén kifejeződése gátlódik. Ez a gátló hatás azonban az egyes sejtekben véletlenszerűen érvényesül, ezért a gén kifejeződése a test egészét tekintve mozaikos mintát mutat. Régóta ismeretesek olyan mutációk, amelyek elősegítik az inaktivációt (ún. PEV enhanszerek, E-var), és olyanok is (ún. PEV szupresszorok, Su-var), amelyek gátolják azt. Azonosítottunk néhány olyan Su-var mutációt, amelyek a 87B kromoszómális régióba térképeződtek (Reuter, G., Bang, R.,



Friede, B., Gausz, J., Gyurkovics, H., Hall, L.M.C., Spierer, A. és Spierer, P. (1987) Modifiers of Position-Effect Variegation in the Region from 86C to 88B of the *Drosophila melanogaster* 3rd Chromosome. *Molecular and General Genetics* 210, 429-436). Kiderült, hogy ezek egyetlen gén (Su-var(3)6) alléljai, amely azonosnak bizonyult az általunk korábban más módszerekkel azonosított letális ck19 komplementációs csoporttal. A 87B régiót klónoztuk és azonosítottuk különböző deléciók töréspontjainak helyét a molekuláris térképen. Ezek alapján megállapítottuk, hogy a Su-var(3)6 lókuszt egy 3 kilobázis hosszú DNS szakaszon belül helyezkedik el. Munkánkkal párhuzamosan Axton és munkatársai megfigyelték, hogy a ck19 csoportba tartozó egyes mutáns allélok letális ill. mitotikus mutáns fenotípusát egy 6.5 kilobázis hosszú DNS szakasz menekíteni képes. Megállapították, hogy ez a DNS fragmentum a fehérje foszfatáz 1 katalitikus alegységét (PP1) kódoló gént tartalmazza.

Ennek ismeretében megvizsgáltuk, hogy a PP1 fehérje génjét biztosan hordozó DNS szakasz segítségével menekíthető-e a Su-var(3)6 mutáció PEV-szuppresszor fenotípusa. Egy 5.8 kilobázis hosszú fragmentumot P-elem transzformációval bevittünk az egyetlen homozigóta életképes Su-var(3)6 mutáns allél genomjába, és megállapítottuk, hogy a bevitt DNS szakasz megszüntette a mutáns PEV-szuppresszor fenotípusát. A letális Su-var(3)6 allélok pedig a transzformáló DNS hatására visszanyerték normális életképességüket. Poláris sejtek transzplantációjával igazoltuk, hogy a Su-var(3)6 gén terméke elengedhetetlenül fontos a csíravonal kialakulásához. A különböző mutáns allélok esetében vizsgáltuk a PP1 mRNS mennyiségét és a foszfatáz aktivitást, ill. az egyes allélok lárvális agysejtjeiben a mitózis folyamatát. Négy vizsgált allél esetében a mitózissra gyakorolt hatás együttjár az alacsony foszfatáz aktivitással és az erős PEV-szuppresszor fenotípussal. Két allél esetében viszont nem találtunk mitotikus fenotípust és a PEV-szuppresszor fenotípus is viszonylag gyenge ill. a

foszfatáz aktivitás is a vad típushoz közeli érték. Két másik mutáció esetében nem találtunk mitótikus fenotípust, de ezek a mutánsok nagyon erős PEV-szuppresszornak bizonyultak és foszfatáz aktivitásuk is nagyon alacsony. Az utóbbiakról feltételeztük, hogy ezek az enzim szubsztrát specifikitását befolyásolják és amíg a mitótikus funkcióhoz szükséges szubsztrátok normálisan defoszforilálódnak, addig a PEV-ben fontos szerepet játszó szubsztrátokra ez nem érvényes. A PP1 fehérje szubsztrátspecifikitása valószínűleg elég széles és genetikai kölcsönhatás alapján az egyik szubsztrát egy másik Su-var gén terméke, a Su-var(3)7 fehérje lehet. A Su-var(3)6 génről összefoglalóan megállapítottuk, hogy nem egy strukturális heterokromatin-specifikus fehérjét kódol, hanem egy vagy több ilyen elem aktivitását módosító enzimet (Baksa, K., Morawietz, H., Dombrádi, V., Axton, M., Taubert, H., Török, I., Udvardy, A., **Gyurkovics, H.**, Szőőr, B., Glover, D., Reuter, G. és Gausz, J. (1993) Mutations in the Protein Phosphatase 1 Gene at 87B Can Differentially Affect Suppression of Position-Effect Variegation and Mitosis in *Drosophila melanogaster* Genetics 135, 117-125.).

### Eukromatikus gének kifejeződését befolyásoló PEV-enhanszer lókuszek

Az elmúlt évek folyamán kísérletet tettünk arra, hogy olyan géneket azonosítsunk, amelyek nemcsak a heterokromatinra, hanem eukromatikus gének kifejeződésére is hatnak. Úgy gondoltuk, hogy ezek olyan gének lehetnek, amelyek terméke a kromatinszerkezetet nemcsak általában befolyásolja, hanem a génkifejeződés szabályozásában is részt vesz. Először 4 olyan független PEV-enhanszer lókuszt azonosítottunk, amelyek egyúttal a homeotikus Antennapedia és bithorax géncsaládok kifejeződését befolyásolják. Ezeket genetikailag jellemeztük és megállapítottuk, hogy a homeotikus gének kifejeződését különböző mértékben módosítják .



Ezekre az eredményekre támaszkodva az ellenkező irányban is elindultunk, kerestünk olyan mutációkat, amelyek nem tartoznak a 2 nagyobb homeotikus géncsaládba (a homeotikus gének szerepének működésének részletesebb leírását lásd később), mégis homeotikus mutáns fenotípusúak, és egyúttal befolyásolják a PEV-t is. Az egyik ilyen mutáció egy olyan P-elem inszerció, amely gyenge *Ubx* fenotípust eredményez. Ismert tény, hogy a homeotikus gének normális működésének folyamatos fenntartásához a *Drosophila* esetében 2 nagyobb géncsoport tagjai is szükségesek. A Polycomb csoportba tartozó gének mutációja jellegzetes "gain of function" fenotípust okoz, azaz a cisz-regulátor elemek megváltozott aktivitásának hatására a homeotikus gének azokban a testszelvényekben is kifejeződnek, amelyekben normális körülmények között inaktívak. A fenotípus szintjén ez azt jelenti, hogy egy testszelvény morfológiailag az utána következő szelvényre hasonlít. A trithorax csoportba tartozó gének mutációja ezzel szemben azt eredményezi, hogy a homeotikus gén aktivitása egy adott testszelvényben lecsökken és ennek a következménye egy "loss of function" (funkcióvesztéses) fenotípus, azaz egy szelvény morfológiailag az előtte található szelvényhez lesz hasonló (részletesebben lásd alább). Az általunk azonosított inszerció mutáció fenotípusa alapján az utóbbi csoportba tartozik és ezért a gén a *Trithorax-like* (*Trl*) nevet, a mutáns allél pedig a *Trithorax-like*<sup>13C</sup> (*Trl*<sup>13C</sup>) nevet kapta.

A mutációt *in situ* hibridizációval a 70F1,2 sávra térképeztük. A homozigóta állapotban gyengén életképes és nőstény-steril mutáció jellegzetes homeotikus transzformációkat mutat. Így például az 5.potrohszelvény a 4.potrohszelvényre, míg a 6.potrohszelvény az 5. potrohszelvényre emlékeztet. Továbbá a mutáció heterozigóta formában jelentős mértékben erősíti az *Ubx* mutáció fenotípusát. Megvizsgáltuk a *Trl*<sup>13C</sup> PEV módosító hatását is. Ennek eredményeként kiderült, hogy a mutáció erős PEV-enhanszer.

Az inszerciós mutáció lehetővé tette, hogy egyrészt a gént molekulárisan klónozzuk, másrészt pedig a transzpozon mobilizálásával újabb mutánsokat állítsunk elő a Tr1 lókuszban. Azokban az esetekben, amelyekben a transzpozon pontosan vágódott ki, az állatok fertilitás váltak, megszűntek a homeotikus transzformációk és a PEV-enhanszer fenotípus is. Pontatlan kivágódás esetén viszont a PEV-enhanszer fenotípus megmaradt és ezen mutánsok egy része elvesztette homozigóta életképességét.

Ezzel párhuzamosan a P-elem próba segítségével sikerült a gént klónozni és cDNS-ét is izolálni. A cDNS szekvenciát adatbank szekvenciákkal összehasonlítva kiderült, hogy a cDNS a már más módszerekkel azonosított GAGA-faktor fehérjét kódolja. (A GAGA faktor a nevét a kötőhelyére jellemző bázissorrendről (GAGAG) kapta) A pontatlan kivágódás következtében létrejött mutánsok egy részében azt találtuk, hogy a gén 5' végén keletkezett kisebb-nagyobb méretű deléció, ezért minden valószínűség szerint a GAGA faktor teljes hiányát okozzák (Farkas, G., Gausz, J., Galloni, M., Reuter, G., **Gyurkovics, H.** és Karch, F. (1994) The *Trithorax-like* Gene Encodes the *Drosophila* GAGA Factor. Nature 371, 806-809).

A tipikus eukarióták genomjának nagy része erősen kondenzált állapotú nukleoprotein struktúra. Felmerül a kérdés, hogy a különböző RNS polimerázok és az ezek aktivitását szabályozó különféle fehérjemolekulák hogyan találnak maguknak utat a célszekvenciáikhoz? Az egyik lehetséges választ erre a kérdésre az a felismerés adja meg, hogy az egyes gének szabályozó szekvenciái legtöbbször nukleoszóma-mentes szakaszokon található. Ezek a szakaszok viszonylag könnyen kimutathatóak, mivel különböző nukleázokkal szemben hiperszenzitívek. A promóterekkel és egyéb szabályozó régiókkal kapcsolatba hozható nukleáz-hiperszenzitív régiók durván két csoportba oszthatók. Egy részük "konstitutív", azaz kimutathatóak attól függetlenül, hogy a kapcsolódó gének aktívak vagy sem. Erre a típusra



példaként a hő-sokk gének említhetők. Más részük eredetileg nukleoszómákkal asszociáltak és csak a gén aktiválódásának folyamata során képződnek valamilyen módon. Ilyen pl. az MMTV vírus gén. A nukleáz hiperszenzitív régiók kialakulásának mechanizmusa azonban alig ismert. A "konstitutív" hiperszenzitív helyek esetében kézenfekvő az a feltételezés, hogy közvetlenül a replikációt követően bizonyos fehérjék a DNS-hez kötődve megakadályozzák a nukleoszómák kialakulását az adott szakaszon. Azokon a promótereken, amelyek az indukcióval kapcsolatban átalakulnak, a nukleoszómák aktívan át kell helyeződjenek. Mindkét esetben fel kell tételezzük olyan specifikus fehérjék létét, amelyek képesek a nyílt kromatin-konformáció kialakítására. A GAGA-faktor jelenleg az egyetlen olyan fehérje, amelyről bizonyították, hogy a DNáz hiperszenzitív helyek kialakulásához elengedhetetlenül szükséges. Fontos szerepet játszik a korai egyedfejlődést szabályozó gének közül azoknak a kifejeződésében, amelyek promoter szakaszaiban GAGA-faktor kötőhelyek találhatóak.

Munkacsoportunk izolált mutánsokat először erre a kromatin szerkezet kialakításában fontos génre és az izolált mutánsok elvileg lehetővé teszik, hogy részleteiben is megvizsgáljuk az egyedfejlődésben ill. a GAGA-faktor kötőhelyet hordozó gének szabályozásában betöltött szerepét. Nehézséget jelent azonban ebből a szempontból az a körülmény, hogy az *ecetmuslica* nőténye a petéket feltölti minden olyan géntermékkel, így a GAGA faktorról is, amely az egyedfejlődés korai stádiumaiban szükséges. Ezért a genotípusukra nézve homozigóta mutáns egyedek az életük korai szakaszaiban nem viselkednek mutánsként, hiszen rendelkezésükre áll az anyától származó vad géntermék. Ennek a problémának részbeni kiküszöbölésére adott lehetőséget az eredeti *Trl<sup>13C</sup>* mutációnak az a tulajdonsága, hogy ha kis számban is, de homozigóta állapotban túlél. A homozigóta nőtények petét is raknak, amelyek azonban az embrionális fejlődésük vége előtt feltétlenül elpusztulnak. Ennek oka feltehetőleg az, hogy a mutáns anyák mutáns géntermékkel töltik fel a petéiket. Ezt a feltételezést sikerült igazolnunk

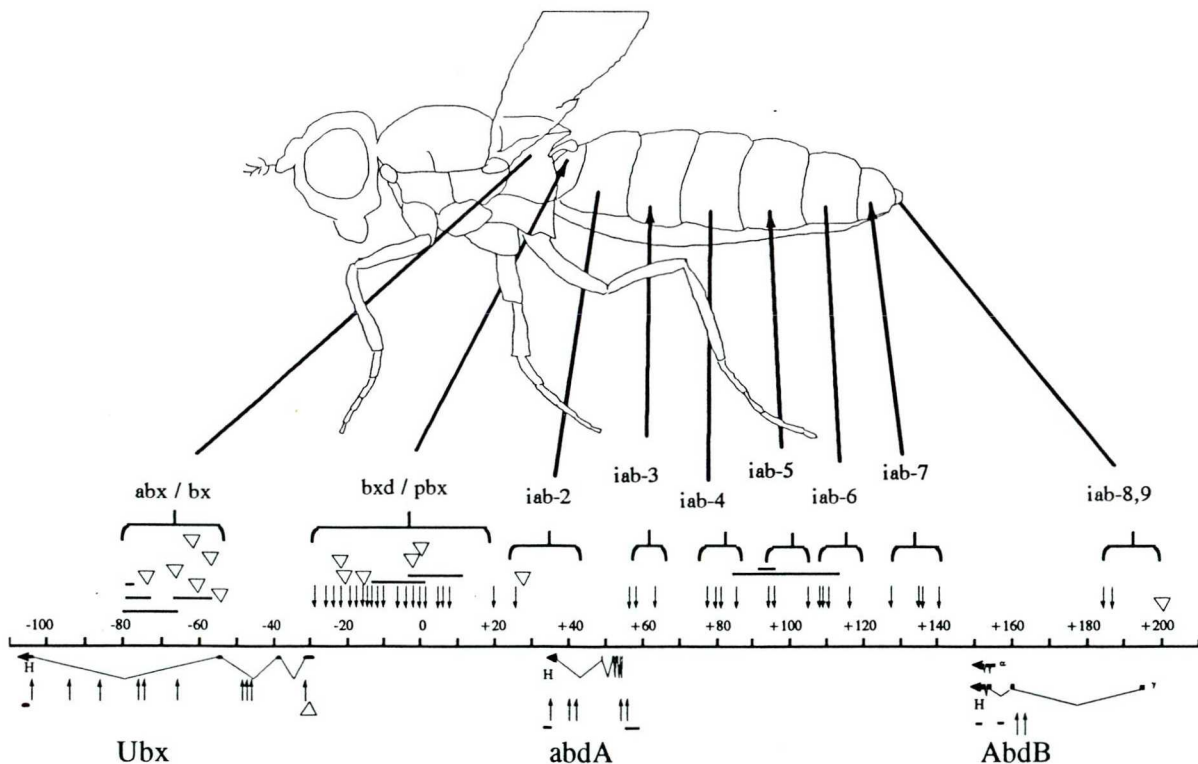


(Bhat, K.M., Farkas, G., Karch, F., Gyurkovics, H., Gausz, J. és Schedl, P. (1996) The GAGA Factor Is Required in the Early *Drosophila* Embryo Not Only for Transcriptional Regulation But Also for Nuclear Division. *Development* 122, 1113- 1124). Kimutattuk, hogy a *Trl<sup>13C</sup>* nőstények nagyrészt a normálisnál jóval rövidebb GAGA faktor RNS-t termelnek. Kis mennyiségben a normálisnak megfelelő hosszúságú RNS is képződik. Ezeknek a mennyiségi viszonyoknak az a következménye, hogy a legtöbb *Trl<sup>13C</sup>* anyától származó embrióban ellenanyaggal nem mutatható ki GAGA fehérje. Ezek az embriók az egyedfejlődés kezdeti lépései után elpusztulnak. Azokban az embriókban, amelyek az előző csoporthoz képest tovább jutnak a fejlődésben, azt tapasztaltuk, hogy a GAGA fehérje rendkívül egyenlőtlenül és véletlenszerűen oszlik el. Míg néhány sejtben meglehetősen magasnak találtuk a GAGA faktor szintjét, más sejtekben gyakorlatilag nem volt kimutatható a fehérje. Bár ennek az egyenlőtlen eloszlásnak a magyarázatát nem ismerjük, arra mindenesetre lehetőséget nyújtott, hogy a GAGA faktor viszonylagos hiányának illetve jelenlétének következményeit egyazon szervezeten belül tanulmányozhassuk. Megállapítottuk, hogy azok a gének, amelyek promoter-régiójukban GAGA kötőhelyeket tartalmaznak, a várakozásnak megfelelően nem fejeződnek ki azokban a sejtekben, amelyekben a GAGA faktor mennyisége alacsony. Váratlan volt viszont az a megfigyelésünk, hogy GAGA faktor hiányában a mitózis folyamata is súlyosan sérül. Így például a homológ kromoszómák gyakran nem válnak szét, kromoszóma hidak képződnek az anafázis során az egyenlítői síkban, végül egyes kromoszómák fragmentálódnak. Más esetekben megindul a mitózis anélkül, hogy a kromoszómák megfelelően kondenzálódtak volna. Ezeket a jelenségeket összefüggésbe hoztuk azzal a megfigyeléssel, hogy a GAGA faktor a teljes sejtciklus folyamán kapcsolatban marad két, jellegzetes bázissorrendű szatelit szekvenciával a központi heterokromatinban.



## 2. Izolátor szakaszok a homeótikus bithorax komplexben

Az ecetmuslica testét, mint minden rovarét, szelvények alkotják. Minden egyes szelvény alaktani jellegzetességei kisebb-nagyobb mértékben eltérnek a többiekétől. Ezeket a szelvényekre jellemző különbségeket az ún. homeótikus gének alakítják ki. A homeótikus gének a genom két különböző helyén csoportosulva homeótikus génkomplexeket alkotnak, amelyek közül az *Antennapedia* komplex a középtortól előrébb, míg a *bithorax* komplex (*Bx-C*) a középtortól hátrébb elhelyezkedő szelvények morfológiai tulajdonságait határozza meg. A *Bx-C*-ben mindössze három, DNS-kötő (ún. homeodomént tartalmazó) fehérjét kódoló gén (*Ultrabithorax*, *abdominal-A* és *Abdominal-B*) található, ami első pillantásra meglepő, hiszen az utótor és kilenc potrohszelvény, összesen tíz szelvény alaktani és működésbeli különbségeinek a kialakulásához szükséges (lásd ábra).



A *bithorax*-komplex szerkezete, szelvény-specifikus szabályozás, mutációk a *Bx-C*-ben

A folytonos vonal a *BX-C*-nek megfelelő 300 kb hosszú DNS-szakaszt jelképezi. Felette az egyes szelvény-specifikus szabályozó elemek, alatta a három fehérjekódoló transzkripciós egység található. **H** a homeodoménnek megfelelő homeobox-szekvenciákat, a nyilak töréspontokat, a vízszintes vonalak deléciókat, a háromszögek pedig inszerciákat jelölnek.

Ez a látszólagos ellentmondás akkor válik érthetővé, ha jellemző példaként vázlatosan áttekintjük az *Abdominal-B* (*Abd-B*) gén működését és - ezzel összefüggésben - szerkezetét. Az *Abd-B* gén által kódolt különböző fehérjék két csoportba oszthatók, amelyek közül az egyik (ez a csoport háromféle, egymástól kissé eltérő fehérjét foglal magában) csak a kilencedik, míg a másik, amely egyetlen fehérjét tartalmaz, az 5. - 8. potrohszelvények meghatározásához szükséges. Ez utóbbi (ill. a neki megfelelő RNS) azonban a különböző szelvényekben nem egyforma mennyiségben található meg: az ötödik potrohszelvényben csak egészen kicsi, a hatodikban, hetedikben és nyolcadikban egyre növekvő mennyiségben mutatható ki. (A negyedik és az ennél is előrébb elhelyezkedő potrohszelvényekben egyáltalán nincs *Abd-B* géntermék, itt az *abdominal-A* határozza meg a szelvények tulajdonságait). Ebből kikövetkeztethető, hogy ennek a négy szelvénynek a jellegét az *Abd-B* géntermék mennyiségi különbségei határozzák meg. Ezek a különbségek úgy alakulnak ki, hogy minden egyes szelvényben egy arra a szelvényre nézve specifikus *cisz*-regulátor elem szabályozza az *Abd-B* gént: az ötödik potrohszelvényben (A5) az *infraabdominal-5* (*iab-5*), az A6-ban az *infraabdominal-6* (*iab-6*), stb. Ha pl. az *iab-7* -ben bekövetkezett deléció hatását vizsgáljuk (homozigóta állapotban), azt tapasztaljuk, hogy az A7-ben az *Abd-B* RNS/fehérje mennyisége visszaesik arra a szintre, amely az A6-ra jellemző, miközben sem az utóbbi szelvényben, sem a nyolcadik potrohszelvényben (A8) nem változik a géntermék mennyisége. Ennek megfelelően a deléciót homozigóta állapotban hordozó állatokban az A7 hatodik potrohszelvénné alakul át, míg a többi szelvény változatlan marad. Az egyes *cisz*-regulátor elemek meglepően nagyméretűek, átlagosan kb. 20 kilobázis hosszúak. Az egész bithorax komplexben összesen 9 ilyen *cisz*-regulátor található (a 9. potrohszelvényre nézve specifikus szabályozó elemet még nem azonosították). Ezek a nagyméretű szabályozó régiók ugyanolyan sorrendben követik egymást a kromoszómán, mint az általuk meghatározott szelvények a test hossz tengelye

mentén. A középtortól hátrafelé haladva minden egyes szelvényben újabb regulátor szakasz kerül aktív, működőképes állapotba, és szabályozza valamelyik gén (*Ubx*, *abd-A*, vagy *Abd-B*) kifejeződését.

Ha a szelvényazonosságot meghatározott sorrendben elhelyezkedő szelvény-specifikus cisz-regulátorok aktivitása határozza meg, hogyan szabályozza egy adott cisz-regulátor a génkifejeződést anélkül, hogy befolyásolná a szomszédos szabályozó régiók működését? A választ erre a kérdésre két új típusú, cisz-hatású elem, az *Mcp* és a *Fab-7* szerepének vizsgálata adhatja meg (Gyurkovics, H., Gausz, J., Kummer, J. és Karch, F. (1990) A New Homeotic Mutation in the *Drosophila* Bithorax Complex Removes a Boundary Separating Two Domains of Regulation. The EMBO Journal 9, 2579-2585). Az *Mcp* az *iab-4* és *iab-5* között, míg a *Fab-7* az *iab-6* és az *iab-7* között helyezkedik el. Szemben azzal a "funkcióvesztés" ("loss of function") fenotípussal, amely a különböző cisz-regulátor elemeket érintő mutációk következménye, az ezekben a régiókban bekövetkezett deléciók az ellenkező eredményre vezetnek, ún. "funkciónyerés" ("gain of function") fenotípust eredményeznek; az érintett szelvény ahelyett, hogy a közvetlenül előtte elhelyezkedő szelvényhez válna hasonlóvá, a közvetlenül utána található szelvényre emlékeztet. Például az *Mcp* régióban bekövetkező deléció hatására a negyedik potrohszelvény alakítási sajátosságait tekintve megkülönböztethetetlené válik az ötödiktől (az A5 ugyanakkor változatlan marad). Úgy látszik, hogy ez a fenotípus annak a következménye, hogy az *iab-5* cisz-regulátor régió aktiválódik a negyedik potrohszelvényben, ahol normálisan az *iab-4* működik. A *Fab-7* régióban bekövetkezett deléció a hatodik potrohszelvényt alakítja hetedikké. Ebben az esetben a szelvényazonosság megváltozása az *iab-7*-nek a hatodik szelvényben való aktiválódásának tulajdonítható, ahol normális körülmények között az *iab-6* szabályozza az *Abd-B* kifejeződését.



Az *iab-7*-nek a hatodik potrohszelvényben való aktiválódásának feltétele, hogy az *iab-6* és az *iab-7* kölcsönhatásba lépjenek egymással. Ezt igazolja, hogy a *Fab-7* domináns, "funkcionyeréses" fenotípusa megszüntethető egy második mutációval, amely akár az *iab-6*-ot, akár az *iab-7*-et működésképtelenné teszi. Hasonló együttműködés szükséges az *iab-4* és az *iab-5* között annak a fenotípusnak a kialakulásához is, amely az *Mcp* régiót eltávolító deléciókhoz kapcsolódik. Ezek a felismerések vezettek ahhoz a nézethez, hogy az *Mcp* és a *Fab-7* mutációk *cisz*-regulátor régiók "izolátor" elemeit ("határoló szakaszait") azonosítják. Eszerint a nézet szerint izolátorok biztosítanak azt, hogy a bithorax komplexben a különböző *cisz*-regulátor domének autonóm egységként működhessenek.

Számos modell született azzal a céllal, hogy a bithorax komplex három génje kifejeződésének nagy és komplex *cisz*-regulátorok által történő szelvény-specifikus szabályozását magyarázza. Az általunk javasolt modell ezekből tartalmaz néhány elképzelést és kísérletet tesz arra, hogy beillesse az eddigi eredményeinket. Modellünk szerint minden egyes *cisz*-regulátor autonóm módon szabályozza egy meghatározott szelvényben a megfelelő homeotikus gén kifejeződését. Minden *cisz*-regulátor egyedi kombinációban tartalmazza a gátló hatású "gap"-, és az aktiváló hatású "pair-rule" gének termékeinek célszekvenciáit, amelyek végső soron meghatározzák az egyedfejlődés korai szakaszában a megfelelő szelvény-specifikus kifejeződési mintázatot. Mivel a gap- és pair-rule gének csak átmenetileg fejeződnek ki az embrió fejlődésének korai szakaszában, a *cisz*-regulátorok aktív illetve inaktív állapotának fenntartásáról az egyedfejlődés további szakaszaiban egy másik mechanizmus gondoskodik. Ez a mechanizmus a *Polycomb* és a *trithorax* csoport génjeit foglalja magába. Az első csoportba tartozó gének formailag "negatív regulátor"-ként működnek, és a csoportba tartozó gének inaktivációja a *Bx-C* génjeinek kisebb-nagyobb mértékben való derepresszióját eredményezi. A *trithorax* csoport ellenkező előjelű hatást gyakorol a komplexre. Ezek a gének

olyan fehérjéket kódolnak, amelyek szükségesek a *Bx-C* normális kifejeződéséhez, és mutációjuk a komplex génjeinek aktivitását jelentősen csökkentheti. Bár működésük valóságos mechanizmusa egyelőre teljesen ismeretlen, néhány *Polycomb* és *trithorax* csoportba tartozó génről feltételezik, hogy azáltal játszanak döntő szerepet a *bithorax*-komplex szelvénspecifikus kifejeződésének fenntartásában, hogy kialakítják a különböző *cisz*-regulátor domének stabil, sejtről-sejtre átadódó inaktív ill. aktív kromatin-konformációját (az "imprinting"-nek egy sajátos formáját).

Szerencsés véletlennek köszönhetően izoláltunk egy olyan mutációt, amelyet egy *Lac-Z* riporter gént tartalmazó P-elemnek a *Fab-7* régió közvetlen közelébe, de még az *iab-7* *cisz*-regulátor elemen belül való beépülése okozott (Galloni, M., Gyurkovics, H., Schedl, P. és Karch, F. (1993) The Bluetail Transposon - Evidence for Independent *Cis*-Regulatory Domains and Domain Boundaries in the Bithorax Complex. The EMBO Journal 12, 1087-1097). Az inszercióban lévő riporter gén viselkedése pontosan tükrözi az *iab-7* állapotváltozásait és lényegében igazolja modellünk helyességét. A *lac-Z* kifejeződése az *iab-7* *cisz*-regulátor doménben található enhanszer elemektől függ, de nem függ a szomszédos szakaszokban elhelyezkedő *iab-5*, *iab-6* és *iab-8,9* *cisz*-regulátor doménektől. Southern analízissel bizonyítottuk, hogy az inszerció helye az *iab-7* *cisz*-regulátor domén proximális szélén, a *Fab-7* izolátor szakasz közvetlen szomszédságában található. A transzpozon mobilizálásával kisméretű deléciókat hordozó törzseket állítottunk elő, amelyek közül az inszerciótól disztálisan eső deléciók megszüntették az *iab-7* regulátor funkciót. Ezzel szemben azt tapasztaltuk, hogy az inszerciótól proximálisan elhelyezkedő szekvenciák deléciója megszüntette a *Fab-7* izolátor szakasz működését. Több kisméretű deléciót izoláltunk, amelyek teljesen vagy részlegesen inaktiválták az *Fab-7* izolátor szakaszt. Ezekben a mutánsokban az *iab-7* *cisz*-regulátor aktiválódik a 11.paraszegmentben, amelyikben

normálisan csak az *iab-6 cisz*-regulátor elem működik. A *Fab-7* szakasz kromatin-szerkezetét jellemeztük és megállapítottuk, hogy több nukleáz-hiperszenzitív helyet tartalmaz. Ezek a nukleáz-hiperszenzitív régiók már az embrionális egyedfejlődésnek abban a korai szakaszában megfigyelhetők, amikor a *bithorax komplex* kifejeződési mintázata meghatározódik, de a hiperszenzitivitás ezeken a szakaszokon akkor is megmarad, amikor a komplex szabályozása az iniciációról a fenntartásra vált. Kísérleteink azt igazolják, hogy a *bithorax-komplex cisz*-regulátor elemei független egységeként funkcionálnak és ezeket az *Fab-7*-hez hasonló izolátor szakaszok különítik el egymástól.

Az *Mcp* és *Fab-7* izolátor funkcióhoz szükséges szekvenciák pontosabb térképezését is elvégeztük (Karch, F., Galloni, M., Sipos, L., Gyurkovics, H. és Schedl, P. (1994) *Mcp* and *Fab-7*: Molecular Analysis of Putative Boundaries of Cis-Regulatory Domains in the Bithorax Complex of *Drosophila melanogaster*. Nucleic Acids Research 22, 3138-3146). Ennek érdekében újabb *Mcp* mutációkat izoláltunk. Ezek molekuláris térképezése alapján megállapítottuk, hogy az *Mcp* funkcióhoz elegendő egy 417 bázispár hosszú DNS szakasz. Ez a szakasz tartalmazza a legfontosabb DNáz-hiperszenzitív régiót és a másodlagos hiperszenzitív helyek egyikét. Az új *Fab-7* mutációk molekuláris analizise alapján ez az izolátor szakasz egy 800 bázispár hosszú DNS szakaszra térképezhető, amely szintén több DNáz hiperszenzitív régiót tartalmaz. Az *Mcp* és *Fab-7* izolátorok között több hasonló szekvenciájú szakaszt találtunk.

Annak érdekében, hogy könnyebben felismerhessük a *Fab-7* régió belüli működés szempontjából fontos szakaszokat, a régiót megklónoztuk egy távolabbi rokon *muslica* fajból, a *Drosophila virilis*-ből is. Meglepetésünkre kiderült, hogy ebben a fajban a *Fab-7* régió a kromoszómának nem ugyanarra a helyére térképeződik, mint a már ismert helyzetű *Ubx* gén. További DNS próbák segítségével megállapítottuk (Von Allmen, G., Hogga, I., Spierer, A.,



Karch, F., Bender, W., Gyurkovics, H. és Lewis, E.(1996) Splits in Fruitfly Hox Gene Complexes. Nature 380, 116), hogy a bár a *Drosophila virilis*-ben a homeotikus géncsalád a *D. melanogaster*-hez hasonlóan ketté osztott, a két fajban a hasadás különböző helyen történt. Ebből következik, hogy a két faj közös őse a homeotikus géneket az állatvilág összes többi tagjához hasonlóan egyetlen génkomplekként hordozta. További következtetésünk, hogy az a szelekciós mechanizmus, amely jelenlegi ismereteink szerint minden más állatcsoportban a homeotikus génkomplext egyben tartotta, a muslicákban megszűnt működni. Megfigyelésünk várhatóan hozzájárul annak a felderítéséhez, hogy a génkifejeződés szabályozásának milyen részletei indokolják a homeotikus géneknek egyetlen komplekként való fenntartását a legkülönbözőbb szervezetekben.

### Közlemények jegyzéke

Gausz J; Ashburner M; Bencze G; **Gyurkovics H**; Holden J. J; Genetic Characterization of the 87C Region of the 3rd Chromosome of *Drosophila melanogaster* GENETICS 93(4):917-934 1979

Ish-Horowicz,D., Pinchin,S., Gausz,J., **Gyurkovics,H.**, Bencze,G., Goldschmidt-Clermont, M. és Holden,J.J. (1979) Deletion mapping of two *D. melanogaster* loci that code for the 70 000 dalton heat induced protein. CELL 17, 565-571

Gausz J; **Gyurkovics H**; Awad A. A; Bencze G; Holden J. J; Genetic Characterization of the Region Between 86F1,2 and 87B15 on Chromosome 3 of *Drosophila melanogaster* GENETICS 98(4):775-789 1981

Voelker RA; Gausz J; **Gyurkovics H**; Langley CH; Ohnishi S Genetic and Cytogenetic Studies of Malic Enzyme in *Drosophila melanogaster* BIOCHEMICAL GENETICS 19(5-6):525-534 1981

Awad A. A; Gausz J; **Gyurkovics H**; Parducz A; A New Homeotic Mutation, Sga62, in *Drosophila melanogaster* ACTA BIOLOGICA ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE 32(3-4):219-228 1981

Udvardy A; Gausz J; **Gyurkovics H**; Ishhorowicz D; Schedl P; Sumegi J; Toth E. C. Genomic Organization and Functional-Analysis of a Deletion Variant of the 87A7 Heat-Shock Locus of *Drosophila melanogaster* JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY 155(3):267-280 1982

Voelker RA; Bingham PM; Greenleaf AL; **Gyurkovics H**; Huang SM; Jokerst RS; Searles LL; Wisely GB. Cloning and Genetic-Analysis of Hybrid Dysgenesis-Induced Alleles at an RNA Polymerase-II Locus in *Drosophila melanogaster* ENVIRONMENTAL HEALTH PERSPECTIVES 52(OCT):285-285 1983

Devay P; Bot G; Dombradi V; Friedrich P; **Gyurkovics H**; Hajdu J; CAMP Microcompartmentation and Protein-Phosphorylation in Wild-Type and Memory-Mutant Dunce Strains of *Drosophila melanogaster* ACTA BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA HUNGARICA 19(1-2):100-100 1984

**Gyurkovics H**; Gausz J; Szabo G; Torok I; Udvardy A. Analysis of a Cis-Acting Regulatory Mutation in *Drosophila melanogaster* ACTA BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA HUNGARICA 19(1-2):28-28 1984



SYMPOSIA QUANT. BIOL. 58, 45-54

Karch, F., Galloni, M., Sipos, L., Gausz, J., **Gyurkovics, H.** és Schedl, P. (1994) *Mcp* and *Fab-7*: Molecular Analysis of Putative Boundaries of Cis-Regulatory Domains in the Bithorax Complex of *Drosophila melanogaster*. NUCLEIC ACIDS RESEARCH 22, 3138-3146

Farkas, G., Gausz, J., Galloni, M., Reuter, G., **Gyurkovics, H.** és Karch, F. (1994) The Trithorax-like gene encodes the *Drosophila* GAGA factor. NATURE 371, 806-808

Mal'ceva, N. I., **Gyurkovics, H.** és Zhimulev, I. F. (1995) General characteristics of polytene chromosomes from ovarian pseudonurse cells of the *Drosophila melanogaster otu<sup>11</sup>* and *fs(2)B* mutants. CHROMOSOME RESEARCH 3, 191-200

Bhat, K. M., Farkas, G., Karch, F., **Gyurkovics, H.**, Gausz, J. és Schedl, P. (1996) The GAGA Factor is required in the early *Drosophila* embryo not only for transcriptional regulation but also for nuclear division. DEVELOPMENT 122, 1113-1124

Von Allmen, G., Hogga, I., Spierer, A., Karch, F., Bender, W., **Gyurkovics, H.** és Lewis, E. (1996) Splits in Fruitfly Hox Gene Complexes. NATURE 380, 116