A *C. elegans* TRA-1/GLI/Ci szex-determinációs faktor célgénjeinek meghatározása és analízise

Doktori értekezés tézisei

Hargitai Balázs

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar
Biológia Doktori Iskola
Klasszikus és Molekuláris Genetika Doktori Program

A Doktori Iskola vezetője: dr. Erdei Anna akadémikus
Programvezető: dr. Orosz László akadémikus
Témavezető: dr. Vellai Tibor docens

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar
Genetikai Tanszék

Budapest
2010

Bevezetés és célkitűzés

Az állati egyedfejlődés során a Hedgehog (Hh) jelátviteli útvonal alapvető szerepet játszik a sejtnövekedés és a differenciáció szabályozásában. Az abnormális Hh jelátvitel emberben különféle ráktípusok és fejlődési rendellenességek kialakulását okozhatja. A fonálféreg *Caenorhabitis elegans*-ban az összefüggő Hh jelátviteli útvonal meglétét eddig nem sikerült igazolni, a jelátvitel több kulcsfontosságú faktora azonban erősen konzerváltan megtalálható ebben a fajban is. A GLI (GLIoblasztóma asszociált) fehérjecsaládba a Hh jelátviteli útvonal konzervált terminális tranckripciós faktorai tartoznak. A *C. elegans* genomjában egyedül a *tra-1* gén kódol GLI/Ci-típusú transzkripciós faktort. A *tra-1* gén a szomatikus szex-determinációs génkaszkád terminális tagja, legfőbb szerepe a női nemi fejlődés biztosítása. Transzkripciós represszorként azonosították, de eddig csak kevés közvetlen célgénje vált ismertté, melyek a nemi jellegek kialakításában szerepet játszó faktorokat kódolnak: az egyes célgének működése az ivar-specifikus sejthalál szabályozásában, a hímek farki párzószervének kialakításában, illetve a spermatogenezis folyamatához bizonyult nélkülözhetetlennek. Fontos fejlődés- és orvosbiológiai kérdés, hogy melyek lehetnek azok a további, eddig ismeretlen célgének, amelyek a TRA-1A hatását közvetítik.

Munkám célja a TRA-1A által közvetlenül szabályozott eddig ismeretlen gének meghatározása, ezáltal a Hh jelátviteli útvonal új effektor molekuláinak azonosítása volt. A TRA-1A fehérje potenciális kötőhelyének *in silico* genomi szintű predikciójával új potenciális célgéneket kívántam meghatározni. A *C. elegans* genomban található potenciális TRA-1A célpontok azonosítása után a kötőhelyek specifikus TRA-1A kötését *in vitro* gélmobilitási kísérlettel terveztem elvégezni. A DNS-fehérje interakcióra utaló eredményeket megfelelő riporter konstrukciók előállításával és *in vivo* expressziós analízisével kívántam megerősíteni. A *tra-1* és feltételezett célgénjei közötti genetikai kölcsönhatás kimutatása és a szabályozás részleteinek felderítése érdekében kettős mutáns (episztázis) elemzéseket végeztem.

Módszerek

In silico kötőhelypredikció

Az eddig megismert közvetlen célgének esetében leírt TRA-1A kötőhelyek különbözőségeit, illetve hasonlóságait figyelembe véve meghatároztam a feltételezett konszenzus kötőszekvenciát. A további kötőhelyek kereséséhez használt program (*Genome Enhancer - Open Genomics*) segítségével a konszenzus szekvenciát összevetettem a teljes *C. elegans* genom szekvenciájával. A program predikciói során nyert feltételezett kötőhelyek közül a továbbiakban kizárólag azokkal foglalkoztam, amelyek gének szabályozó régióiban helyezkedtek el. A TRA-1 kötőszekvencia konzerváltsága alapján tovább szűkítettem a lehetséges célgének listáját. Ez úgy történt, hogy a *C. elegans* genomban azonosított potenciális TRA-1A célgének kötőhelyét tartalmazó szabályozó régiókat összehasonlítottam egy evolúciósan közeli rokon faj, a *Caenorhabditis briggsae* megfelelő ortológ génjeinek genomi környezetével. Amennyiben mindkét fajban hasonló pozícióban volt jelen a kötőhely, az a szabályozó mechanizmus evolúciós konzervációjára, vagyis a szekvencia funkcionális voltára utalhat.

In vitro DNS-fehérje kötési vizsgálatok

Hogy igazolni tudjam az egyes gének szabályozó régióiban talált TRA-1A kötőhelyek funkcionális voltát, fehérje–DNS kötési (EMSA vagy *bandshift*) kísérleteket végeztem. Ezek során *in vitro* termeltetett TRA-1A fehérjének a potenciális kötőhelyet tartalmazó DNS fragmentumhoz történő kötődési képességét vizsgáltam. Pozitív kontrollként ismert TRA-1 transzkripciós célgének (*egl-1* vagy *mab-3*) esetében leírt kötőhelyet használtam. A *xol-1* gén esetében a DNS-kötés specifikus voltát kompetíciós analízissel is igazoltam.

RNSi

Bizonyos gének esetében nem állt rendelkezésemre mutáns törzs, illetve egyes kísérletek jellegéből kifolyólag nem volt lehetséges a mutáció használata. Ilyenkor etetéssel alkalmazott RNS interferencia segítségével inaktiváltam a gént.

In vivo expressziós vizsgálatok

A vizsgálni kívánt gének expresszióját az adott gén promóterével, illetve a funkcionális vizsgálatok esetében a teljes hosszúságú genomi szekvencia által szabályozott

transzkripciós és transzlációs GFP konstrukciókat hordozó állatok fluoreszcens mikroszkópos megfigyelésével tanulmányoztam.

A doktori értekezés tézisei

Doktori kutatómunkám eredményeit az alábbiakban foglalom össze:

A TRA-1A transzkripciós faktor lehetséges célgénjeinek meghatározása során kapott eredmények:

- az eddig megismert TRA-1A célgének esetében leírt kötőhelyeket alapul véve egy TRA-1A konszenzus kötőszekvenciát határoztam meg: $TT^{A}/_{T}TCNNNNTG^{G}/_{T}G^{T}/_{A}GGTC$
- a konszenzus kötőszekvenciát kerestem a fonálféreg gének szabályozó régiójában
- a bioinformatikai analízis során 21 olyan célgént sikerült meghatároznom, amelyek esetében a TRA-1A kötőhely egy közeli rokon faj, a *C. briggsae* ortológ gének genomi környezetében is konzerváltan jelen volt

A *tra-1* és *xol-1* gének közötti kapcsolat molekuláris vizsgálata során kapott eredmények:

- Azonosítottam egy intakt kötőszekvenciát a *xol-1* gén promóter régiójában, 154 bázispárnyira a transzlációs starthely előtt
- Megállapítottam, hogy a *C. briggsae* és *C. remanei* fajok esetében is konzerváltan megtalálható a TRA-1A kötőhelyként prediktált szekvencia a *xol-1* gén ortológjainak genomi környezetében
- EMSA kísérletekkel igazoltam, hogy a teljes hosszúságú TRA-1A fehérje képes kötődni a *xol-1* promóterben található TRA-1A kötőhelyet tartalmazó régióhoz.
- A *xol-1* promóter TRA-1A kötőhelyének megváltoztatása négy konzervált nukleotid cseréjével történt. Ez a mutáns oligonukleotid nem volt képes fehérje–DNS interakcióra.
- A DNS-kötés specifikus voltát kompetíciós analízissel is igazoltam.

- Az *in vivo* kísérletek során a *tra-1* gén csendesítésének hatására a *pxol-1::gfp* (*yIs34*) transzgén ektopikusan expresszálódott a kezelt állatok XX embrióiban. Hasonló eredményt kaptam funkcióvesztéses *tra-1* mutáns állatokban is.
- A gátló kölcsönhatás további igazolására létrehoztam egy $p_{(mut)}$*xol-1::gfp* riporter transzgént, amelyben a TRA-1A kötőhelyének szekvenciája lett megváltoztatva. A mutáns riportert hordozó XX embriók GFP-pozitívak voltak, ami azt jelenti, hogy a hermafroditákban jelenlevő TRA-1A fehérje nem volt képes gátolni a *xol-1* transzgén expresszióját a kötőhely hiányában.

A *tra-1* és a dóziskompenzáció kapcsolatának vizsgálata során kapott eredmények:

- Megállapítottam, hogy a *tra-1* funkcióvesztéses egyszeres mutánsok önmagukban is jelentős embrionális letalitást mutatnak.
- Az életképtelenség additívnek bizonyult *tra-1(-); sex-1(-)* kettős mutáns állatokban.
- *tra-1* funkciónyerés jelentősen szuppresszálta a *sex-1(-)* mutációk által okozott embrionális életképtelenség.
- A *tra-1(-)* mutációk tovább fokozták a *dpy-21(-)* mutáns embriók XX letalitását (a DPY-21 a dóziskompenzációs komplex komponense).
- A *xol-1* gén csendesítése önmagában nem vezetett XO-specifikus pusztuláshoz, *sex-1(-)* és *tra-1(-)* mutánsokban viszont szignifikánsan szuppresszálta a XX-specifikus életképtelenségét.
- Hasonló hatást sikerült kimutatni a *xol-1* gént aktiváló autoszómás faktor, a *sea-2* gén RNSi-vel történő inaktiválása során is.
- A *him-8(e1489)* mutáns hermafrodita állatokban az utódok 35,7%-a hím (XO kariotípusú) állatá fejlődik. A *him-8(e1489)* törzsben tapasztalható hím arány jelentősen megnövekedett *tra-1* dsRNS kezelés hatására.
- *tra-1(RNSi)* hermafroditák és az X kromoszómára integrálódott GFP riporter konstrukciót hordozó hímek keresztezését követően az utódok 80%-ában azonosítottam a transzgénikus apától örökölt *gfp* gén jelenlétét. A *tra-1* RNSi okozta életképtelenség tehát az XX embriókat érintette.

A *tra-1* és *lin-39* gének közötti kapcsolat molekuláris vizsgálata során kapott eredmények:

- *in silico* analízis során kimutattam, hogy egy potenciális TRA-1A kötőhely található a *lin-39* gén promóterében. A LIN-39 egy HOX fehérje, amely a *C. elegans* vulvafejlődés központi szabályozó faktora.
- A *lin-39* gén promóterében található potenciális TRA-1A kötőhely funkcionális voltát *in vitro* termelt fehérje–DNS kötési teszttel (EMSA) igazoltam.
- Kimutattam, hogy *tra-1(e1488)* mutáns hermafrodíták és *tra-1(RNSi)* kezelt állatok jellegzetes vulvafejlődési defektust mutatnak.
- A *fem-3* gén (a *tra-1 upstream* represszora) inaktiválása szintén befolyásolta a vulva mintázatképződését.
- Egy funkcionális *gfp::tra-1* riporter expresszióját vizsgálva kimutattam, hogy a fehérje jelen van a VPC-kben a vulvafejlődés indukciója előtt és az indukció ideje alatt is.
- A riporter szintén megfigyelhető volt a VPC-k osztódásával létrejövő utódsejtekben, valamint a vulva felépítésében részt nem vevő, de a vulvafejlődés szabályozásában fontos szerepet játszó sejtekben (pl. a hipodermiszben) is.
- Megfigyeltem, hogy a *tra-1* inaktiválása a vulva prekurzorsejtek rendellenes mintázatképződését váltja ki azáltal, hogy gátolja a VPC-k és a hipodermális szincícium fúzióját.
- A *tra-1* gén inaktiválása továbbá *alae*-defektusokat, illetve a *seam* sejtek rendellenes sejtfúzióját eredményezte.
- Kimutattam, hogy a *tra-1* inaktiválása fokozott vulvaindukcióhoz vezet *synMuv AB* kettős mutáns állatokban és *Multivulva* fenotípust okoz *synMuv A* mutáns háttérben

Következtetések

Dolgozatomban a *tra-1* által közvetlenül szabályozott (cél)gének meghatározásával foglalkozom. A TRA-1A fehérje potenciális kötőhelyének genom-szintű meghatározásával új potenciális célgéneket azonosítottam és jellemeztem. A *C. elegans* genomban található potenciális TRA-1A célpontok azonosítása után a *lin-39* és *xol-1* gének esetében *in vitro* kísérletek alkalmazásával igazoltam a transzkripciós faktor szekvencia-specifikus nukleinsav-kötő képességét, valamint *in vivo* módszerekkel is kimutattam a szabályozó kölcsönhatást. Ezek a célgének más jelátviteli útvonalak ismert komponensei, eredményeim tehát közelebb vihetnek a *C. elegans*-ban működő genetikai útvonalak között ható bonyolult kölcsönhatások (*signalling crosstalk*) jobb megértéséhez.

Kimutattam, hogy a szex-detereminációs útvonal dóziskompenzációs hatással is bír, mivel a TRA-1A egy visszacsatolási (*feedback*) mechanizmuson keresztül stabilizálja az X kromoszómán található gének dózisát. Igazoltam, hogy a *tra-1* gén a *synMuv B* gének közé tartozik és hogy a *lin-39 Hox* gén transzkripciós gátlásán keresztül a szex-determinációs génkaszkád közvetlenül szabályozza a hermafrodita állatok párzószervének kialakulását, amely az állat tipikus ivar-specifikus szerve. Ezzel a *C. elegans* vulvaszövet kifejlődését szabályozó új genetikai útvonalat tártam fel.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

2010. január 15.

Szabó E*, Hargitai B*, Regős á, Tihanyi B, Barna J, Borsos É, Takács-Vellai K, Vellai T. TRA-1/GLI controls the expression of the *Hox* gene *lin-39* during *C. elegans* vulval development. *Dev Biol*. 2009 Jun 15;330(2):339-48. (* - megosztott első szerzők)

Hargitai B, Kutnyánszky V, Blauwkamp TA, Steták A, Csankovszki G, Takács-Vellai K, Vellai T. *xol-1*, the master sex-switch gene in *C. elegans*, is a transcriptional target of the terminal sex-determining factor TRA-1. *Development*. 2009 Dec 11;136(23):3881-7.