

Diss. ETH, No. 11989

**DEVELOPMENT OF TRANSGENIC *DROSOPHILA MELANOGASTER*
MODELS FOR STUDYING *IN VIVO* AND *IN VITRO* HOMOLOGOUS
RECOMBINATION BETWEEN DUPLICATED ALLELES**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY (ETH) ZURICH
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

Stephan Bärtsch
Dipl. sc. nat. ETH Zurich
born March 26, 1962
citizen of Mels SG

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. F. E. Würgler, examiner
Prof. Dr. U. Hübscher, co-examiner
PD Dr. C. Sengstag, co-examiner

Zurich, 1997

SUMMARY

With particular respect to human health, an interest in understanding the molecular basis for mutagenesis has been strongly stimulated by the discovery that mutations occurring in somatic cells can be important in the development of cancer and in understanding the origin of other diseases. Recombination between DNA repeats is such a source for mutations, i. e. for deletions of genetic information which can have deleterious consequences for the cell. Whereas deletions seem to play a minor role in the conversion of proto-oncogenes to oncogenes, they are relatively often involved in the inactivation of tumor suppressor genes. Several other human genetic disorders are associated with instability of DNA repeats caused by recombination. Little is known on how such deletions are caused in mammalian cells, although they occur spontaneously in culture and can sometimes be assigned to homologous recombination. To determine the importance of DNA repeats as a source of DNA deletions and other chromosomal aberrations in eukaryotes it is important to know the mechanisms that participate in DNA repeat recombination.

With the aim to further contribute to the knowledge of the mechanism of recombination we designed a transgenic *Drosophila* system for the study of recombination within test sequences in somatic cells. The test sequence consisted either of two defective bacterial neomycin resistance genes (*neo*) or β -galactosidase genes (*lacZ*). These particular alleles, 5' and 3' deletions of the corresponding gene, were arranged in the same orientation, were separated by about 5 kb and contained overlapping homologies of about 0.3 kb. Homologous recombination between the truncated *neo* alleles restored a functional *neo* gene conferring G418 (neomycin analog) resistance (Neo^+) therefore providing a direct selective marker, whereas in the *lacZ* based system recombination between truncated *lacZ* genes allowed the production of β -galactosidase (LacZ^+), providing a visual marker.

The frequency at which G418 resistant subclones appeared in a population of G418 sensitive cells was determined by a quantitative microtiter mutation assay. LacZ^+

cells were detected and quantitated by flow cytometry using fluorogenic substrates. Examination of recombination in transgenic *Drosophila* Schneider line 2 cells detected approximately 0.03% of G418 resistant or LacZ⁺ cells. Recombinants were confirmed by PCR analysis of Neo⁺ and LacZ⁺ cells. The observation that in cultures enriched for recombinants, DNA duplication products were frequently observed is consistent with models for gene amplification based on unequal sister chromatid exchange. DNA recombination occurs not only spontaneously. By additional experiments evidence was provided for a dose dependent induction of direct repeat recombination in *Drosophila* cells *in vitro* by exposure to model mutagens.

To study mitotic recombination in *Drosophila* flies *in vivo*, the lacZ based reporter construct has been inserted into a P element vector. When the recombination reporter cassette was stably introduced into the genome of *Drosophila* by P element mediated transformation β -galactosidase activity was detected in a few cells of dissected imaginal discs from transgenic larvae what was indicative for a recombination event that reconstituted a functional lacZ gene. Positively staining cells have been detected very rarely (0.0003%), arguing for a lower spontaneous recombination frequency *in vivo* than *in vitro*.

The transgenic cell lines and the flies that we have constructed open new experimental possibilities for studying recombination at the gene level in somatic cells of *Drosophila* *in vitro* and *in vivo*. Furthermore our data suggest that the lacZ based system is suitable for quantification of chemically induced recombination. Once appropriate fly strains defective for genes involved in recombinational DNA repair have been derived, the lacZ recombination substrate could be examined in such genetic background. Finally, the system should be adaptable to studies of direct repeat recombination in other cell types.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Entdeckung, dass Mutationen in somatischen Zellen wesentlich zur Entstehung von Krebs beitragen und den Ursprung anderer genetisch bedingter Krankheiten bilden, förderte stark das Interesse, die molekulare Grundlage der Mutagenese zu verstehen. Rekombination zwischen repetitiven DNS Elementen kann eine Ursache für Mutationen sein, wie zum Beispiel Deletionen, die zum Verlust genetischer Information führen. Obwohl Deletionen eine geringfügige Rolle bei der Umwandlung von Proto-Onkogenen zu Onkogenen zu spielen scheinen, bewirken Deletionen oft das Abschalten von Tumorsuppressor-Genen. Verschiedene andere menschliche, genetisch bedingte Krankheiten können mit einer Unbeständigkeit in der Zusammensetzung von repetitiver DNS als Folge von Rekombinationsereignissen in Zusammenhang gebracht werden. Wie solche Deletionen hervorgerufen werden, darüber ist sehr wenig bekannt, obwohl diese in Zellkulturen spontan entstehen und manchmal durch homologe Rekombination hervorgerufen werden können. Aus genannten Gründen ist es wichtig, den Mechanismus zu kennen, der zur Rekombination von repetitiver DNS führt.

Ziel dieser Arbeit war es, einen Beitrag zum Wissen über den Mechanismus der Rekombination zu leisten. Zu diesem Zweck wurde ein transgenes *Drosophila* System entwickelt in welchem in somatischen Zellen Rekombination zwischen Testsequenzen untersucht wurden. Diese Testsequenz besteht entweder aus zwei Allelen des bakteriellen Neomycin Resistenz Gens (*neo*) oder des β-Galactosidase Gens (*lacZ*). Die beiden Allele desselben Gens wurden jeweils in einem Abstand von 5 Kilobasenpaaren (kb) hintereinander und in gleicher Orientierung angeordnet. Das eine Allel war eine Deletion des 3' Endes des jeweiligen Gens, das andere Allel war am 5' Ende deletiert. Die Allele sind zueinander in einem Bereich von etwa 0.3 kb homolog. Homologe Rekombination zwischen Sequenzen der *neo* Allele stellte ein funktionelles *neo* Gen her, das Genprodukt verlieh der Zelle die Resistenz gegen das Antibiotikum G418 (ein Analog des Antibiotikums Neomycin) und lieferte somit einen selektierbaren Marker.

Im System, das auf dem *lacZ* Gen basierte, führte die Rekombination zwischen den homologen Sequenzen der *lacZ* Allele zum funktionellen *lacZ* Gen. Das erlaubte der Zelle das Enzym β -Galactosidase (LacZ^+) zu produzieren, dessen Aktivität durch histochemische Färbung festgestellt werden konnte und somit einen sichtbaren Marker darstellte.

Die Frequenz, mit welcher G418 resistente Subklone in einer Population von G418 sensitiven Zellen erschienen, wurde mittels einer Mikrotiterplatten-Methode bestimmt. Diese erlaubte eine quantitative Bestimmung der Rekombinationsfrequenzen. Die Anzahl LacZ^+ Zellen hingegen, wurde mit einem Fluoreszens aktivierenden Zell Sortierer (fluorescence activated cell sorter; FACS) bestimmt. Die Resultate dieser Untersuchungen zur Rekombination in den entsprechenden transgenen *Drosophila* Schneider line 2 Zell-Linien besagten, dass ungefähr 0.03% der Zellen entweder einen G418 resistenten oder LacZ^+ Phänotyp zeigten. Die Resultate einer Analyse der Neo⁺ und LacZ^+ Zellen mit der PCR-Technik besagten, dass solche Zellen in der Tat durch Rekombination entstanden sind. In Kulturen, angereichert mit Rekombinantien, wurden oftmals Rekombinationsprodukte beobachtet, die duplizierte DNS Sequenzen enthielten. Dies stimmt mit Modellen überein, die solche Genamplifikation mit einem ungleichen Austausch von DNS Sequenzen der Schwesterchromatiden (unequal sister chromatid exchange) erklären. Durch zusätzliche, sogenannte Induktions-Experimente wurde gefunden, dass die DNS Rekombination nicht nur spontan erfolgte. Das Ausmass der Induzierbarkeit der Rekombination zwischen repetitiver DNS stand in Abhängigkeit zur gewählten Konzentration mutagener Substanzen.

Um *in vivo* Studien in *Drosophila* zu ermöglichen, musste vorerst das Rekombinations-Reporter Konstrukt, das auf dem *lacZ* Gen basiert und welches in den *in vitro* Versuchen zur Anwendung kam, in einem sogenannten *P* Element Vektor untergebracht werden. Durch die Methode der *P* Element vermittelten Transformation konnte die Reportersequenz stabil in die Keimbahn von *Drosophila* eingeschleust werden. Der Nachweis von β -Galactosidase in wenigen Zellen der Imaginalscheiben

aus solchen *Drosophila* Larven, die transgen für den Reporter sind, deutete auf die Existenz eines *lacZ* Gens als Produkt eines Rekombinationsereignisses hin. Solche Zellen wurden nur sehr selten gefunden, was auf eine niedrige spontane Rekombinationsfrequenz (0.0003%) *in vivo* hinwies.

Diese konstruierten transgenen Zell-Linien und Fruchtfliegen eröffnen neue experimentelle Möglichkeiten zum Studium von Rekombination in somatischen *Drosophila* Zellen auf der Stufe der Gene *in vitro* und *in vivo*. Unserer Daten sprechen für die Eignung des *lacZ* Systems zur Quantifizierung chemisch induzierter Rekombination. Sollten einmal Fruchtfliegen zur Verfügung stehen, bei denen Gene defekt sind, welche für die DNA-Reparatur mittels Rekombination benötigt werden, wäre es möglich, Effekte in den entsprechenden Mutanten mit Hilfe des *lacZ* Substrates zu erfassen. Schliesslich ist auch eine Uebertragung dieses Systems auf andere Zelltypen denkbar.