

A *Drosophila melanogaster* *dtl* és *ada2a/rpb4* génjeinek szerkezeti és funkcionális vizsgálata

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Pápai Gábor

Témavezető: Dr. Boros Imre

Szeged, 2005

TARTALOMJEGYZÉK

A, ELŐSZÓ

B, IRODALMI BEVEZETÉS

<u>1. Transzkripció szabályozás</u>	4
<u>1.1. Alap promóter elemek</u>	5
<u>1.1.1. TATA box</u>	5
<u>1.1.2. Iniciátor</u>	6
<u>1.1.3. DNA Replication-related Element</u>	7
<u>1.1.4. Egyéb elemek</u>	8
<u>1.2. Génspecifikus transzkripció-szabályozó elemek és faktorok</u>	8
<u>1.2.1. Enhancerek és inzulátorok</u>	9
<u>1.2.2. Koaktivátorok</u>	10
<u>2. Kis RNS-ek</u>	11
<u>3. RNS degradáció</u>	12
<u>3.1. Nonsense-mediated decay</u>	13
<u>3.2. RNS interferencia</u>	14

C, CÉLKITŰZÉSEK

D, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

<u>1. DNS modifikációs technikák</u>	17
<u>2. RNS preparálás kifejtett ecetmuslicákból</u>	17
<u>3. cDNS-ek 5' végeinek klónozása</u>	18
<u>4. Southern hibridizáció</u>	19
<u>5. RT-PCR</u>	20
<u>6. Ecetmuslica szöveteinek festése</u>	20
<u>7. Schneider S2 sejtek transzfektálása és lumineszcencia mérés</u>	20
<u>8. Schneider S2 sejtmagi extraktum készítése</u>	21
<u>9. Gélretardáció</u>	21
<u>10. <i>Drosophila melanogaster</i> embrió kivonat készítése</u>	22
<u>11. RNS stabilitás vizsgálat</u>	22
<u>12. Formaldehides gélelektroforézis</u>	22
<u>13. Duplaszálú RNS kimutatás</u>	23
<u>14. Denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis</u>	23
<u>15. Immunprecipitáció</u>	23
<u>16. Northern hibridizáció</u>	24

<u>E, EREDMÉNYEK</u>	
<u>1. A <i>Drosophila melanogaster</i> <i>Ada2a/Rpb4</i> és <i>Dtl</i> gének szerkezeti analízise</u>	25
<u>1.1. Az <i>Ada2a/Rpb4</i> és <i>Dtl</i> gének 5' végeinek azonosítása</u>	25
<u>1.2. A két gén promóter régiójának <i>in vivo</i> analízise</u>	29
<u>1.2.1. Az <i>Ada2a/Rpb4</i> gén promóterének vizsgálata S2 sejtekben</u>	31
<u>1.2.2. A <i>Dtl</i> gén promóterének vizsgálata Schneider S2 sejtekben</u>	33
<u>1.2.3. Az <i>Ada2a/Rpb4</i> gén promóterének vizsgálata transzgenikus legyekben</u>	34
<u>1.2.4. A <i>Dtl</i> gén promóterének vizsgálata transzgenikus legyekben</u>	36
<u>1.3. A két gén promóter régiójának <i>in vitro</i> analízise</u>	37
<u>1.4. Az <i>Ada2a/Rpb4</i> és a <i>Dtl</i> gén között egy működő DRE elem található</u>	39
<u>2. Az <i>Ada2a/Rpb4</i> és <i>Dtl</i> gén RNS szintű szabályozása</u>	42
<u>2.1. Átfedő transzkriptumok a két génről</u>	42
<u>2.2. A két génről képződött RNS-ek specifikus degradációja</u>	44
<u>3. A <i>Dtl</i> gén funkcionális vizsgálata</u>	47
<u>3.1. Előzmények</u>	48
<u>3.2. A <i>Dtl</i> gén inaktiválásának hatása</u>	48
<u>3.3. A DTL fehérje funkciójához az 5' nemtranszlálódó régió is szükséges</u>	50
<u>3.4. A DTL részt vesz a kis RNS-ek érésében</u>	53

F, DISZKUZZIÓ

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

IRODALOMJEGYZÉK

FÜGGELÉKEK

SUMMARY

A, Előszó

A *Drosophila melanogaster*, vagy ecetmuslica egy ideális organizmus alapvető biológiai folyamatok tanulmányozására. Az életciklusa rövid (pár hét), és az idők folyamán széles arzenálja alakult ki a genetikai eszközöknek és technikáknak, melyek segítségével közelebb jutunk a célunk eléréséhez.

Munkánk során a cél két egymáshoz nagyon közeli gén jellemzése volt. Kezdetben nem sok információ állt rendelkezésünkre ezekről a génekről, valamint termékeikről, homológiai alapján is csak az egyik génről voltak sejtéseink, hogy vajon milyen szerepet tölthet be az ecetmuslica életében. Így rákényszerültünk, hogy tapogatózással próbáljuk megfejteni a gének funkcióját. Hogy egy lopott hasonlattal éljek, olyan volt, mikor egy sötét erdőben egy zseblámpa fényénél próbáljuk megfejteni az erdő nagyságát és mibenlétét. Természetesen belefutottunk több zsákutcába is, mire valami halvány sejtésünk kialakult a gének szabályozásáról és funkciójáról.

A munka előrehaladtával a kezdetben egyszerűbbnek tűnő géncsoport egyre bonyolultabbá és egyben izgalmasabbá vált. Egyre több szerkezeti és funkcionális finomságot fedeztünk fel, valamint felsejlett egy olyan szabályozási folyamat, amely mindkét gént egyaránt érinti. A dolgozatomban megpróbálom bemutatni azokat az erőfeszítéseket, amelyeket a gének leírása irányába tettünk. Mindenekelőtt azonban a könnyebb megértés érdekében egy rövid, de átfogó áttekintését szeretném adni a különböző szabályozási folyamatoknak, valamint támpontot nyújtani a funkció megértéséhez.

B, Irodalmi bevezetés

1. Transzkripció szabályozás

A többsejtű szervezetekben nagyon fontos, hogy melyik fehérje mikor és hol lép működésbe. Ennek szabályozására több alternatíva is létezik, például az inaktív fehérje-prekurzor aktívvá tétele valamilyen módosítás által, vagy a kérdéses fehérje eltávolítása a rendszerből, azaz lebontása. Az élőlények legismertebb szabályozási taktikája azonban a fehérjét kódoló hírvivő RNS (mRNS) keletkezésének, a transzkripciónak a kontrollálása. Ez a szabályozás az egyes gének promóterén keresztül valósul meg. Egy eukarióta RNS polimeráz II promóter több összetevőből áll. A génspecifikus aktivátorok és represszorok kötőhelyei, valamint ezek hatását szabályozó más elemek (pl. inzulátorok) több száz bázispár távolságra is elhelyezkedhetnek a gén transzkripció startpontjától. Ezek az elemek az egyes gének időbeli és/vagy térbeli kifejeződését szabályozzák. Ez génenként változó elemeket és azokhoz kötődő faktorokat jelent. Van viszont egy olyan promóter rész, az ún. alap vagy core promóter, amely már nem mutat ekkora variabilitást. *Drosophila melanogaster*-ben közel kétezer gén alap-promóterét megvizsgálva mintegy 10 olyan elemet azonosítottak, amelyek valamelyike majdnem mindegyik gén promóterében előfordul (1).

A mRNS-eket eukariótákban az RNS polimeráz II szintetizálja. A transzkripció egy jól definiált pontról indul, amelyet az egyes gének promótere határoz meg. Az RNS polimeráz II, bár DNS-kötő tulajdonsággal rendelkezik, egymagában mégsem képes megtalálni a gének előtti promóteret, ehhez különböző alap-transzkripció faktorokra van szüksége. Ezek a faktorok egy része jól meghatározott DNS szekvenciákat, ún. bazális promóter elemeket ismer fel, míg másik csoportjuk az RNS polimeráz II és a promóter DNS kötésért felelős fehérjék közötti kapcsolatot teremti meg. A génkifejeződést más faktorok, transzkripció aktivátorok vagy represszorok is szabályozzák. Ezek általában valamilyen, az alap promótertől távolabbi DNS szekvenciához (enhancerekhez) kötődnek, és onnan fejtik ki gátló vagy fokozó hatásukat.

1.1. Alap promóter elemek

Az alap promóter elemek olyan szekvenciák, amelyek szükségesek ahhoz, hogy az RNS polimeráz II képes legyen felismerni a promótort.

1.1.1. TATA box

A leggyakrabban előforduló promóter motívum a TATA box (TATAAA). *Drosophila melanogaster*ben a vizsgált 1941 promóter 33,9 %-ban megtalálható (1). A TATA box egy aszimmetrikus szekvencia, amelyhez a TFIID transzkripciós faktor kapcsolódik (2). A TFIID egy heteromer multiprotein-komplex (3). A tényleges TATA box kötő fehérjét (TBP, TATA box Binding Protein) először élesztőből azonosították (4), majd szekvencia homológia alapján más organizmusokban, így ecetmuslicában is (5). A TBP és a hozzá kapcsolódó ún. TBP asszociált faktorok (TAF-ok) alkotják a TFIID-t. Az így kialakult DNS-fehérje komplexhez kapcsolódik a TFIIA, TFIIB, az RNS polimeráz II/TFIIF, TFIIE és végül a TFIIH. Így együtt jelölik ki az RNS polimeráz II-nek, hogy hol található az a pont, ahonnan elkezdheti a mRNS szintézisét (6). Az egyes TAF-ok mindamellet, hogy részt vesznek a promóter felismerésében, rendelkeznek hiszton-acetiláz aktivitással, kináz aktivitással, de vannak köztük ubiquitin ligáló illetve konjugáló enzimek, vagy koaktivátorok is, amelyek biztosítják a génspecifikus transzkripciós faktorokkal a kölcsönhatást (7).

*Drosophila melanogaster*ben konszenzus TATA-box szekvencia a TATAAA, de ettől eltérő A/T gazdag szekvenciák is szolgálhatnak TBP felismerő helyként. G:C vagy C:G bázispár tartalmú szekvencia is előfordul mint TBP kötőhely, kivéve, ha azok a 5'-TATAAA-3' szekvencia 2., 4. és 5. pozíciójában foglalnak helyet (8). A TATA-box szekvenciája aszimmetrikus, egyes kísérletek arra utalnak, hogy ez is segít az RNS polimeráznak a transzkripció irányának meghatározásában (9), bár ez egy eléggé mérsékelt preferencia (10).

A transzkripció startpontja és a TATA-box közötti távolságot a TFIIB és az RNS polimeráz II együtt határozzák meg. A pontos mechanizmus még nem ismert, az egyetlen kapcsolatot az jelenti, hogy azokban a TFIIB mutánsokban, ahol megváltozik a startpont, a fehérje-komplex konformációs változást szenved (11).

1.1.2. Iniciátor

Korai promóterszekvencia összehasonlítások azt mutatták, hogy gyakran szerepel egy adenozin a startpontban (+1), egy citozin a -1-es pozícióban, és pár pirimidin (Py) veszi körül őket. Ha ezt a szakaszt eltávolították, akkor a transzkripció erőssége csökkent, és a kezdőpont is heterogén lett (12). Ezek a megfigyelések arra utaltak, hogy létezik egy olyan szekvencia, amely a TATA-box mellett felelős a promóter erősségéért, és az átíródás pontos kezdőpontjáért, ez az iniciátor (INR).

Az INR konszenzus szekvenciája *Drosophila melanogaster* esetében Py Py A(-1) N T/A Py Py. Ez pontosan megegyezik a gerincesekben megállapított konszenzus szekvenciával, jól példázva, hogy milyen fontos funkciót tölt be.

Az iniciátor és a TATA-box egymást erősítve funkcionál, ha köztük 25-30 bázispár található. Ha egyik, vagy másik elemet eltávolítjuk, a transzkripció alacsonyabb szinten valósul meg. Abban az esetben, ha a két elem között több mint 30 bázispár található a hatásukat külön-külön fejtik ki. Ha a kettő közötti távolság kevesebb mint 25 bázispár, a szinergikus hatás megmarad, de a transzkripció kezdőpontját a TATA-box diktálja (9). Habár az INR nem szimmetrikus, így a transzkripció irányára is hatással lehetne, az ebben való szerepe azonban minimális (9).

Az INR szekvenciát a TFIID komplex ismeri fel (13,14), de a felismeréshez valószínűleg szükséges a TFIIA is (13,15). Azokban a promóterekben, ahol az INR mellől hiányzik a TATA-box, a TBP vagy nem kötődik a promóterhez (16), vagy csak nagyon gyengén kötődik A/T gazdag szekvenciákhoz (17).

Az INR mellett gyakran fordul elő egy másik alap promóter elem, a DPE (Downstream Promoter Element). A DPE az INR-rel együtt fejt ki hatását, a két elem közötti távolság szigorúan szabályozott. Ecetmuslicában azt találták, hogy a DPE motívum az INR +1 nukleotidjához viszonyítva precízen +28 és +32 között helyezkedik el (18). Az INR és a DPE szinergikus működését erősíti, hogy a TFIID a két motívumot együtt ismeri fel és kapcsolódik hozzájuk. Ha nincs jelen az INR a DPE mellett, a TFIID nem képes kötődni.

A DPE-INR promóterek transzkripció aktiváció és/vagy represszió szintjén is elkülönülnek a TATA-box promóterektől. A TATA-box és a DPE tartalmú promóterek között egy fehérje-komplex képes különbséget tenni. Egy transzkripció szabályozó komplex, az NC2 komplex

represszálja a transzkripciót azokról a promóterekről, amelyek TATA-boxot tartalmaznak, míg a DPE-függő átíródást aktiválja (19).

1.1.3. DNA Replication-related Element

Léteznek olyan promóterek is, amelyeken a szekvencia felismerésért nem TFIID a felelős. A TBP mellett három másik fehérjét is azonosítottak, amelyek alap promóter szekvenciákhoz kötődnek, és a hozzájuk kapcsolódó faktorokkal együtt iniciálják a transzkripciót. Ezek a TRF1, TRF2 és TRF3 (TBP Related Factor). A TRF1-et eddig csak *Drosophila melanogaster*-ben azonosították, a TRF2-t számos organizmusból, a TRF3 csak gerincesekben fordul elő (20).

A TRF1 a gének egy szűk csoportjának átíródásában vesz részt, és nem csak az RNS polimeráz II függő gének, hanem az RNS polimeráz II függő kis RNS gének transzkripciójában is szerepet játszik (21).

A TRF3 az N-terminálison különbözik a TBP-től, minden vizsgált szövetben kifejeződött, de nem a TFIID komplex tagja (20).

A TRF2 sem a TFIID által mediált transzkripció iniciációban vesz részt. A fehérje kötődik egy alap promóter elemet felismerő faktorhoz, a DREF-hez (DRE binding Factor) (22). A DREF által kötött DRE elemet (DNA Replication-related Element) a DNS replikációjában résztvevő fehérjék génjeinek promóterében írták le először (23). A DRE konszenzus szekvencia egy szimmetrikus oktamer, amely áll egy ClaI restrikciós endonukleáz felismerő helyből (ATCGAT) és a két végén egy adeninből és egy timinből (TATCGATA). A DREF homodimerként kötődik a DRE motívumhoz (24).

A DREF fehérjéhez a TRF2-n kívül más faktorok is kötődnek. Leírták, hogy kapcsolódik hozzá a NURF (Nucleosome Remodelling Factor) és az ISWI (Imitation Switch), amelyek a kromatin szerveződésében játszanak szerepet (22). Ezek a fehérjék, és a hozzájuk kapcsolódó még nem azonosított faktorok játszanak szerepet a DRE tartalmú promóterekről induló transzkripcióban. A DREF elem nem csak abban vesz részt, hogy kötődve a DRE elemhez kijelöli az átírandó gén helyét, hanem a NURF és ISWI faktorok segítségével fellazítja a gén kromatin környezetét, így is segítve az RNS polimeráz II és a hozzá kapcsolódó faktorok kötődését a promóterhez. Ezen elmélet mellett szól az is, hogy a DREF fehérje képes versengeni inzulátor elemhez való kötődésért, mint ezt az scs' inzulátor elemnél kimutatták (25).

1.1.4. Egyéb elemek

Az alap promóterben számos más elem is előfordulhat. Létezik olyan promóterelem, a BRE (TFIIB Recognition Element), ahol nem a TFIID, vagy a TBP rokon faktorok kötődnek, hanem a TFIIB. A TFIIB a TFIID és az RNS polimeráz II között a kapcsolatot teremti meg. A TFIIB kötődve a BRE-hez gátló hatást fejt ki a transzkripcióra, viszont ez a kapcsolat és vele a gátló hatás a VP16 aktivációs domén tartalmú transzkripciós aktivátor jelenlétében felbomlik (26). Ez egy jó példa arra, hogy egy transzkripciós aktivátor képes módosítani az alap transzkripciós faktorok hatását.

A kis RNS-ek promóterében található egy olyan szekvencia elem, amely meghatározza a transzkripció startpontját, ez a PSE (Proximal Sequences Element). A PSE képes meghatározni a startpontot RNS polimeráz II, és RNS polimeráz III által átírt géneken is (27).

*Drosophila melanogaster*ben végzett promóter tanulmány további szekvencia motívumokat is feltárt, amelyek a transzkripciós startponthoz közel helyezkednek el számos promóterben (1). Még nem ismert, hogy ezekhez a motívumokhoz milyen fehérjék kötődnek, és milyen szerepet játszanak az egyes gének átíródásában.

1.2. Génspecifikus transzkripció-szabályozó elemek és faktorok

Az evolúció során megjelentek olyan élőlények, amelyek nem csak egyetlen sejtből álltak. A különböző sejtek, sejtsoportok szöveteket alkottak. Az élő szervezeteknek meg kellett oldaniuk a problémát, hogy bár a sejtek genetikai anyaga, a DNS állományuk ugyanaz, mégis más-más funkciót kell ellátniuk. A megoldás az egyes gének szövetspecifikus kifejeződése, azaz a különböző szöveteket alkotó sejtekben más és más géncsoport expresszálódik, ezáltal biztosítva a funkcionális diverzitást. A szövetspecifikus génkifejeződést a különböző transzkripciós aktivátorok és represszorok irányítják. Ezek a fehérjék, vagy fehérje komplexek a szabályozandó gének közelében található DNS szekvenciákhoz, az úgynevezett enhancerekhez kötődnek.

1.2.1. Enhancerek és inzulátorok

Az enhancerek kétféleképpen közvetíthetik a promóterek felé a transzkripciót szabályozó hatásukat: az egyik, hogy közvetlen kapcsolatot létesítenek az alap promóter „masinériával”, a másik, hogy megváltoztatják a promóter kromatin környezetét. Ezeket a hatásokat az enhancerekhez kötődő transzkripciós faktorok közvetítik, amelyek kapcsolódnak alap promóter elemekhez kötődő faktorokhoz, vagy kromatin módosító komplexekhez. Az enhancerek által közvetített génaktiváció is kétféleképpen valósulhat meg, egyes esetekben az enhancer megnöveli annak a valószínűségét, hogy a gén aktiválódik, anélkül, hogy az aktiváció mértékét befolyásolná, más esetekben az enhancer megnöveli a génexpresszió mértékét (28).

Egyes gének bonyolult időbeli és térbeli expressziós mintázata gyakran ugyancsak bonyolult moduláris szabályozó elemeket igényel. Ezek nem ritkán 300-700 bázispár hosszan is elnyúlhatnak, akár több 10 kbp-ra a szabályozandó promótortól. Ezek a gének általában az egyedfejlődésben játszanak szerepet, mint például a *hairy* és az *eve* „pair-rule” gének, ahol több elkülönült enhancer is található a szabályozó régiókban, aktiváló és represszáló hatást kifejtve (29,30).

Az enhancer szekvenciák kötő- és gyűjtőhelyként szolgálnak a hozzájuk kapcsolódó gének szabályozásában szerepet játszó transzkripciós faktorok számára. A statikus szerepen túl, képesek befolyásolni a hozzájuk kötődő faktorok transzkripció szabályozó hatását. Egyes enhancerek felerősítik a szabályozó jelet (31), mások aktiváló hatást represszor hatássá konvertálnak (32), megint mások gradients regulátorok hatását közvetítik (33). Az enhancerek funkcióinak szerteágazóságát két véglet közé lehet pozicionálni, az egyik véglet, mikor egy specifikus enhancerhez egyszerűen kötődik egy szövetspecifikus transzkripciós faktor, és így közvetíti a szövetspecifikus aktivációt (34), a másik véglet, mikor egy enhancerhez több aktiváló és represszáló faktor is kötődik egyidejűleg és a szabályozandó génre együttesen hatnak, az eredeti funkciójuktól eltérő módon (35,36).

Az enhancerek hatását a különböző promóterekre nem csak az enhancerhez kötődő transzkripciós faktorok határozzák meg, hanem a promóter maga is képes szabályozni. Az alap promóter „masinéria” egyes transzkripciós faktorok általi aktivációja függ attól, hogy a promóternek milyen a struktúrája. Például a *Drosophila melanogaster* Antennapedia génkomplexében a *fushi tarazu (ftz)* és *Sex combs reduced (Scr)* gének között található AE1 enhancer csak az *ftz* promótort aktiválja (37). Az *ftz* promóter TATA-boxot tartalmaz, míg az *Scr* promóter INR és DPE elemeket. Ez a megfigyelés arra a következtetésre vezet, hogy az AE1 enhancer specifikusan a TATA-boxot tartalmazó promótereket aktiválja, míg az INR-

DPE promóterekre nincs hatással. Léteznek olyan enhancerek is, amelyek nem tesznek különbséget a kétféle alap promóter osztály között, és mindkettőt képesek aktiválni (37).

Az enhancerek és promóterek közötti kölcsönhatás a kompatibilitáson és specificitáson túl egy további szinten is szabályozódik. Léteznek olyan elemek, amelyek blokkolják a kettő közötti kapcsolatot, ezek az inzulátorok. Ha egy inzulátor helyezkedik el az enhancer és a promóter között, akkor az képes blokkolni a kettő közötti kölcsönhatást, így például egy génkomplexben az inzulátorok az enhancer aktivitást be tudják határolni a gének csak egy részére (38). Az inzulátorok a heterokromatin terjedését is megakadályozzák (39). Az inzulátorok is speciális célszekvenciák, amelyekhez fehérjekomplexek kötődnek, és így fejtik ki blokkoló hatásukat.

Minden inzulátor képes enhancereket blokkolni, de a blokkoló hatásukban különbségek vannak. Például a *Fab-7* elem nem képes olyan effektíven gátolni az *fiz* enhancert, mint a *su(Hw)* kötőhelyek (40), vagy a *su(Hw)* képes blokkolni a *hairy* represszort, de nem képes gátolni a *dorsal* aktiváló hatását (41). Az inzulátorok blokkoló hatását befolyásolhatja az enhancer erőssége, egy kópiában hatásosan gátolt enhancer több kópiában képes az inzulátoron keresztül is aktiválni a célpromótert (42).

1.2.2. Koaktivátorok

A transzkripciós koaktivátoroknak vagy adaptoroknak két fő osztálya van, az adaptorok, amelyek az aktivátorokkal kapcsolódva segítik a transzkripciós „masinéria” összeszerelődését a promóteren, és a kromatin módosító komplexek. Az első csoportba a TFIID-t alkotó, a TBP-hez kötődő TAF-ok tartoznak, és az ún. mediátor komplexek. A különböző transzkripciós faktorok és a TFIID közötti kapcsolatért az egyes TAF-ok a felelősek, míg a mediátor komplexek az RNS polimeráz II C-terminális doménjéhez kapcsolódva vesznek részt a transzkripció szabályozásában (43).

A másik csoportot a kromatin módosító komplexek alkotják. Ide tartoznak az ATP-függő kromatin remodelling komplexek és a hiszton acetil-transzferáz komplexek. A kromatin remodelling komplexek ATP segítségével destabilizálják, és elmozdítják a hisztonoktamerékből álló nukleoszómákat, így fellazítják a kromatint, teret engedve a transzkripció iniciációjának (44). Több ilyen komplexet ismerünk, például az SWI/SNF komplexet, a NURF vagy a CHRAC komplexeket.

Az aktívan átíródó géneket összefüggésbe lehet hozni az acetilálódott hisztonokkal, míg az inaktív gének környezetében hipoacetilált hisztonokat figyeltek meg (45). Ennek megfelelően a transzkripciós koaktivátorok többségének van hiszton acetiláz funkcióval rendelkező tagja, míg a korepresszorok többsége hiszton deacetiláz funkciót is betölt. A hisztonok acetilációja megváltoztatja a töltésüket, és ezáltal gyengíti a nukleoszóma-DNS kölcsönhatást (46). Ennek fényében a hiszton acetiláz komplexekről, mint a transzkripciót elősegítő koaktivátorokról beszélhetünk.

A legalaposabban tanulmányozott hiszton acetiláz komplexek a SAGA és ADA komplexek. A SAGA komplex egy több mint 10 fehérjéből álló nagy komplex élesztőben, míg az ADA komplexnek csak 4 tagját azonosították (47), az Ada2-t, az Ada3-at, a Gcn5-öt és az Ahc1-et. Bár az Ada2, Ada3 és a Gcn5 ugyancsak tagja a SAGA komplexnek is, mégsem beszélhetünk úgy az ADA komplexről, mint a SAGA alegységéről, hiszen az Ahc1 nem tagja a SAGA komplexnek (48). A SAGA komplex a fenti három fehérjén kívül többek között tartalmaz még TAF-okat és Spt fehérjét is, amelyeken keresztül kapcsolódik a TBP-hez, mintegy hidat képezve a transzkripciós faktorok és a TFIID között (49). A tényleges hiszton acetiláz fehérje a Gcn5, a komplex további tagjai az acetiláció segítésében, a TBP kötésben és a komplex integritásának megőrzésében vesznek részt. Az élesztőhöz hasonlóan a *Drosophila melanogaster*ben is minimum két Ada/Gcn5 tartalmú hiszton acetiláz komplex van (50).

2. Kis RNS-ek

Léteznek olyan gének, amelyek nem fehérjét kódolnak, hanem a róluk átíródó RNS-ek töltenek be valamilyen funkciót a sejt életében. Ezek az RNS-ek a nemkódoló RNS-ek, ilyenek például a riboszómális RNS-ek (rRNS) vagy a transzfer RNS-ek (tRNS-ek). A nemkódoló RNS-ek közé tartoznak a kis magi RNS-ek (snRNS – small nuclear RNS) és nukleoláris RNS-ek (snoRNS – small nucleolar RNS) is.

Az snRNS-ek és snoRNS-ek vagy önálló génről íródnak át (51), vagy intronból vágódhatnak ki (52). Az érésük során egy részük kikerül a citoplazmába (53), ott az snRNS-ek kapcsolódnak a Survival of Motor Neurons (SMN) gerincű Sm fehérje-komplexhez (54). Az Sm-komplex a mRNS érését segítő snRNP-k összeszerelődésében játszik szerepet. A citoplazmában az RNS polimeráz II által átírt kis RNS-ek cap struktúrája is módosul, 7-monometil-guanozin-ról 2,2,7-trimetil-guanozinra (m^3G). Ez egy fontos módosulás, az mRNS érésben csak m^3G -cap tartalmú snRNS-ek képesek részt venni, ugyanis ez a módosulás

szükséges a sejtmagi transzportjukhoz (55). A kis RNS-ek ezek után visszakerülnek a sejtmagba, majd a Cajal-testbe vándorolnak, ahol metilálódhatnak vagy pszeudouridinálódhatnak (56).

Mind az snRNS-ek, mind az snoRNS-ek bonyolult másodlagos struktúrával rendelkeznek. Az snRNS-ek másodlagos struktúrája diverz, nem lehet különböző szerkezeti osztályokba sorolni őket. Az snoRNS-ek már mutatnak szerkezeti hasonlóságot, amely alapján két osztályba lehet őket sorolni. Az első a C/D box-szal rendelkező snoRNS-ek, a második a H/ACA box-szal rendelkezők (57). Ezek nem rigid osztályok, létezik olyan kis RNS, amely rendelkezik mind C/D, mind H/ACA box-szal is (58).

Az snRNS-ek kevés kivétellel a mRNS érésében játszanak szerepet. Az RNS-ek különböző fehérjékkel együtt alkotják az ún. snRNP-ket, amelyek a mRNS érés effektor molekulái, a precíz intron kivágásban játszanak fontos szerepet (59). Az snoRNS-ek főleg a tRNS-ek és rRNS-ek érésében vesznek részt, segítik a különböző RNS-ek 2'-O-metilációit és pszeudouridinilációit. A C/D box snoRNS-ek a 2'-O-metilációban vesznek részt, a H/ACA box snoRNS-ek az uridin pszeudouridinné alakítását irányítják (60). Egy külön csoportot alkotnak az ún. scaRNS-ek (small Cajal body-specific RNS), amelyek a Cajal-testekben akkumulálódnak, és szintén RNS módosításokban vesznek részt (61). Humán sejtekben a kromoszóma végek, a telomerek szintetizációjához nélkülözhetetlen RNS, a telomer RNS is szerkezetileg egy snoRNS (62).

3. RNS degradáció

Egy élő sejtben a mRNS-ek többféle úton és oknál fogva degradálódhatnak. A mRNS degradáció szolgálhat génexpresszió szabályozására, de bekövetkezhet aberráns mRNS-ek hatására is. A mRNS-ek kontrollálása a sejt elemi érdeke, hiszen csonka, vagy befejezetlen érésen átesett mRNS-ekről mutáns fehérje képződhet, és ez a sejt pusztulásához is vezethet. Éppen ezért a sejt több szinten is ellenőrzi, hogy tökéletesen processzált mRNS kerüljön a fehérje szintetizáló egységekhez, a riboszómákhoz.

A mRNS kontroll már a transzkripció szintjén elkezdődik, az RNS polimeráz II részt vesz abban, hogy a mRNS érést végző ún. splicing faktorok a szintetizálódó pre-mRNS-hez kapcsolódhassanak (63). A mRNS-ek 3' végének poliadenilációját végző CPSF (Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor) fehérje is kötődik alap promóter faktorhoz, mégpedig a TFIID-hez, és innen kerül át az RNS polimeráz II C-terminális doménjére (CTD). Ebből

adódóan a CTD nem csak a transzkripció elongációjában fontos, hanem a mRNS processzállásában is: a cap formációban, splicingban és a poliadenilációban (64). A nem megfelelően érett mRNS lebontásra kerül az exoszóma, vagy a Rat1p fehérje által. A mRNS érése után kikerül a citoplazmába. Az export is egy kontroll pont, a citoplazmába csak megfelelően processzállt mRNS-ek léphetnek ki (65). A végső ellenőrzés a transláció szintjén folyik, a citoplazmában csak megfelelő cap és 3' vég struktúrával rendelkező mRNS marad stabil, és csak így képes stimulálni a translációt (66). A helytelen cap vagy 3' struktúrával rendelkező mRNS-eket endo- és exonukleázok bontják le, így a translációban már nem vesznek részt. Azonban a transláció szintjén is létezik egy RNS degradációs mechanizmus, a Nonsense-mediated decay (NMD).

A mRNS degradációjában két olyan folyamat vesz részt, amelyiknél nagy molekulásúlyú fehérje-komplexek végzik a lebontásra ítélt mRNS felismerését és lebontását, az NMD és az RNS interferencia. Az RNS interferencia a génexpresszió szabályozásában is részt vesz, de főként duplaszálú RNS-ek, és velük homológ egyesszálú RNS-ek eliminációját végzi.

3.1. Nonsense-mediated decay

A sejt számára elengedhetetlenül fontos, hogy ép, megfelelő érésen átesett mRNS-ek kerüljenek a riboszómákhoz, ugyanis csak így tudja elkerülni, hogy mutáns fehérjék szintetizálódnak. Ha egy mRNS korai terminációs kodont tartalmaz, akkor csonka fehérje képződik, ami a sejt pusztulásával is járhat. Ennek kiküszöbölését végzi az NMD. Emellett segít a nem megfelelően érett mRNS-ek lebontásában is, abban az esetben, ha a visszamaradó intronban terminációs szignál van (67).

A korai terminációs kodont az NMD annak helyzetéből ismeri fel. Abban az esetben, ha egy stop kodon található több mint ötven nukleotiddal korábban, mint az utolsó exon-exon csatlakozás, az NMD működésbe lép, és a mRNS lebontásra kerül (68). Ennek megfelelően a gének nagy többségében a terminációs kód vagy az utolsó exonban van, vagy ötven bázispáron belül található az utolsó exon-exon csatlakozáshoz viszonyítva (69). A mRNS-en az exon-exon csatlakozástól 20-24 nukleotidra egy fehérje-komplex, az Exon-junction komplex (EJC) ül, amelynek egyes tagjai kikerülnek a mRNS-sel együtt a citoplazmába (70). Abban az esetben, ha az EJC a terminációs kodontól 3' irányban található, az Upf fehérje-komplex hidat képez az EJC és a translációt befejező ún. Translation release faktor között, és beindítja az NMD-t (71). Maga a mRNS degradációs folyamat *Drosophila melanogaster*ben

még nem tisztázott. *Saccharomyces cerevisiae*-ben az NMD során először a mRNS poliA farka, majd cap struktúrája hasítódik le, végül 5'-3' irányban exonukleázok bontják le a cap és poliA farkok nélküli mRNS-t (72).

3.2. RNS interferencia

A sejtbe bejutó, vagy ott kialakuló duplaszálú RNS-ek (dsRNS) gyors lebontásra kerülnek, és a velük szekvenciálisan azonos egyesszálú RNS-ek (ssRNS) is degradálódnak. Ez a folyamat az RNS interferencia (RNAi) (73). Az RNS interferenciát leírták számos organizmusban, köztük *Drosophila melanogaster*-ben is (74). Kezdetben azt feltételezték, hogy ez a mechanizmus a duplaszálú RNS vírusok eliminációját (75), a transzpozonok aktiválódásának gátlását (76), valamint idegen eredetű nukleinsavak, például transzgének csendesítését (77) szolgálja. Mára kísérleti bizonyítékok utalnak arra, hogy részt vesz a transzkripció szabályozásában is (78).

Az RNS interferencia több szinten is beleszól a génexpresszió szabályozásába. Mivel az RNAi során dsRNS hatására mRNS-ek bomlanak, ezért az RNS interferencia képes a mRNS szintjét befolyásolni a transzkripció után. A növényekben kimutatták, hogy dsRNS homológ DNS szekvenciák metilációját indukálja, így csökkenti a transzkripció iniciációját (79), valamint képes befolyásolni a homológ DNS kromatin környezetét (80).

Az RNS interferencia mechanizmusa kétlépcsős. Először a duplaszálú RNS-t egy RNáz-komplex rövid, 21-25 nukleotid hosszú fragmentekre darabolja, majd ezek a rövid RNS darabok irányítják a homológ egyesszálú RNS bontását egy másik nukleáz-komplex segítségével.

Az első lépésben a dsRNS-t egy RNázIII tartalmú komplex, a Dicer-komplex hasítja (81). A keletkező 21-25 nukleotid hosszú dsRNS fragmentumok a siRNS-ek (short-interfering RNS) (82). A siRNS-ek nem tökéletes duplaszálú RNS-ek, 2 nukleotidos 3' túlnyúló végük van, amely szükséges az effektor-komplexbe épüléshez (83). Az így keletkező siRNS-ek az RNS interferencia tulajdonképpeni effektor molekulái. Csak azok az RNS-ek degradálódnak, amelyekhez a siRNS-ek egyik szála hibridizálni képes. Az RNS bontást egy másik komplex, a RISC (RNA-Induced Silencing Complex) komplex végzi. A siRNS-ek a Dicer-komplexből az R2D2 fehérje segítségével átkerülnek a RISC-komplexbe (84). A RISC-komplexben a siRNS-ek ATP segítségével kitekerednek és denaturálódnak (85). A RISC ezek után hasítja a

homológ RNS-t a hasonlóságot mutató régió belül (86). A homológ RNS-ek eliminációjához fontos, hogy a siRNS komplementer szálának 5' vége foszforilálva legyen (85).

Az RNS interferencia szignál terjedését RNS-függő RNS polimeráz is segíti a legtöbb organizmusban (87). Bár *Drosophila melanogaster*ben is leírtak ilyen fehérjét (88), az RNS interferenciában való szerepét nem tudták alátámasztani (89).

A siRNS-ekhez hasonló miRNS-ek (micro RNS) is a Dicer-komplex segítségével hasítódnak ki dsRNS-ekből (pontosabban RNS hairpinekből) (90). A miRNS-ek is részt vehetnek RNS degradációs folyamatokban (91), de előidézhetik a célgének transzlációs gátlását is (92).

C, Célkitűzések

A disszertációmban két *Drosophila melanogaster* gén vizsgálatát tárgyalom. Az egyik gént termékének TAR RNS kötő tulajdonsága miatt *Dtl*-nek (*Drosophila tat like*) neveztük, a másik génről alternatív éréssel két fehérje képződik, amelyeket homológiák alapján az ADA2a és az RPB4 nevet kapták. A munka kezdetekor a *Drosophila* Genom Annotációs Program még éppen csak elkezdődött, nem állt rendelkezésünkre az *ecetmuslica* genomjának szekvenciája. Így először azt kívántuk kideríteni, hogy a két gén pontosan hol helyezkedik el, mekkora a kiterjedésük és milyen a szerkezetük.

Kíváncsiak voltunk, hogy hol helyezkedik el a két gén alap promótere, milyen elemek alkotják, valamint hol helyezkednek el egyéb szabályozó régiók. A vizsgálatok során kiderült, hogy a két gén nagyon szorosan helyezkedik el egymás mellett, és ez számos kérdést vetett fel. Többek között szeretnénk tudni, hogy együttesen szabályozódnak-e, és ha igen, ezt milyen folyamatok irányítják.

Természetesen szeretnénk volna meghatározni a két gén funkcióját is. A dolgozatban csak az eddig ismeretlen funkciójú DTL fehérjét kódoló gén funkcionális vizsgálatát ismertetem, mivel az *Ada2a/Rpb4* gén termékeit egy munkatársam írta le. Időközben az általam vizsgált fehérje élesztő és humán homológjait leírták mint trimetil-guanozin szintázt, felvetődött a kérdés, vajon az *ecetmuslica* fehérje is rendelkezik-e ilyen aktivitással.

D, Anyagok és módszerek

1. DNS modifikációs technikák

A restrikciós emésztéseket, ligálásokat és Klenow feltöltéseket Fermentas és New England Biolabs enzimekkel végeztük, a gyártó által leírt körülmények között. DNS fragmentum izolálást DNA Extraction Kittel (FermentasTM) végeztük. A PCR termékeket pTZ57R/T (FermentasTM) T-végű vektorba klónoztuk. Transzfekcióhoz tiszta DNS-t a Quiagen cég Plasmid Midi Kitjével nyertük.

A részletesen fel nem sorolt módszereket Sambrook és mtsai. Molecular Cloning című könyve által leírt módon végeztük.

A különböző plazmidkonstrukcióhoz használt primerek és adapterek:

dtIL: 5'-GGTAGTTCTCAAAGGCACAG-3'

MinR: 5'-CGAGGGTACCGCTCAGTTTGTAAAG-3'

MinF: 5'-GAGCGGTACCCGGAATGATAAA-3'

MinF2: 5'-GGCTGCAGGCTAGTGTGACCAACGTA-3'

3frSTOP: 5'-CTAGTCTAGACTAG-3'.

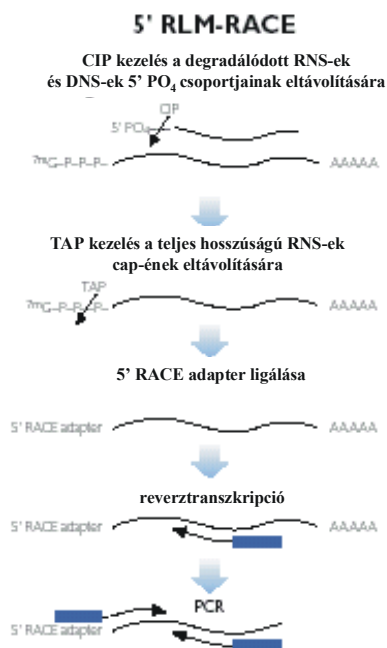
2. RNS preparálás kifejlett ecetmuslicákból

Az ecetmuslicákat 10 ml/g „D” pufferben (4 M guanidin-izotiocianát; 25 mM nátrium-citrát pH:7,0; 0.5% (w/v) sarcosyl; 100 mM β -merkaptóetanol) homogenizáltuk, majd 0,2 M nátrium-acetátot adtunk hozzá. Ezek után egy térfogat fenollal összekevertük, majd egyötöd térfogat kloroformot adtunk hozzá. 15 percig állt jégen, utána 10000 g-vel centrifugáltuk 10 percig 4°C-on. A felső fázist fenol/kloroformmal extraháltuk, majd ismét centrifugáltuk az előzőleg leírt módon. A felülúszóhoz azonos térfogat izopropanolt adtunk, és a kicsapódott RNS-t 10000 g-vel centrifugáltuk 30 percig 4°C-on. A csapadékot 70%-os (v/v) etanollal mostuk, amit ismét centrifugálás követett. Az RNS-t 0,1 ml Rnáz-mentes vízben vettük fel, majd 2,5 térfogat 96%-os (v/v) etanol és 0,1 térfogat 3 M nátrium-acetát pH: 5,2 hozzáadásával ismét kicsaptuk, és így tároltuk -20°C-on.

3. cDNS-ek 5' végeinek klónozása

A cDNS-ek 5' végeinek azonosításához az Ambion cég FirstChoice[®] RLM-RACE kitjét használtuk. Össz-RNS mintából indultunk ki. Fontos volt, hogy az RNS minél intaktabb legyen, mivel degradálódott RNS-ből kiindulva nem lehet megállapítani egy cDNS pontos 5' végét.

Az RNS-t először Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) enzimmel kezeltük, hogy az 5' végéről eltávolítsuk a foszfát csoportot. Ezt Tobacco Acid Pyrophosphatase kezelés követte, amellyel lehasítottuk a mRNS-ek cap szerkezetét. Ezek után egy RNS adaptert ligáltunk az így kezelt RNS-ekhez, és random primerek illetve reverz transzkriptáz segítségével cDNS-eket készítettünk belőlük. Ebből a cDNS elegyből adapter és génspecifikus primereket használva sokszorozítottuk az általunk kívánt 5' végi cDNS darabot. Az alábbi rajz az 5' RACE (Rapid Amplification of cDNA End) folyamatát szemlélteti.



A felhasznált adapterek és primerek:

5'RACE adapter:

5'-GCUGAUGGCGAUGAAUGAACACUGCGUUUGCUGGCUUUGAUGAAA-3'

5' RACE Outer Primer: 5'-GCTGATGGCGATGAATGAACACTG-3'

5' RACE Inner Primer: 5'-CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG-3'

Génspecifikus primerek:

Dtl

UBRT/21R: 5'-TTACGCGTGACTIONGGCATCACG-3'

UBRNACR: 5'-GTATTCGGGAAACCGCTTGTGCCA-3'

DtatR1: 5'-CTGCCAGAATTCTTTCC-3'

UBRVseq: 5'-AGAAAGCTACGTCAGATG-3'

UBAlt: 5'-TCGATCTTATGGGCCACACC-3'

UBRNACUP: 5'-CAAGTAGCGCGCTGAGATACT-3'

UBRNAex: 5'-CAAGTAGCGCGCTGAGATACT-3'

UBALT3': 5'-TGCTCTAGATGAAATTAATATATTTATTT-3'

Ada2a/Rpb4

A3950/20R: 5'-CATCCACCATATCCACGGGG-3'

R5874/20R: 5'-GCACCTCCGATATCAGCAGC-3'

ADA3: 5'-CTGCATCAGCAAGCTTCGAG-3'

ADARace1: 5'-GCCGATGGAACTGCTATT-3'

ADARace2: 5'-CCAAGTACCTGTGCAACGTG-3'

4. Southern hibridizáció

Southern hibridizációt *Dtl* és *Ada2a/Rpb4* genomi régióból származó DNS fragmentumokkal végeztünk. A DNS mintákat 0,5 µg/ml etidium-bromidot tartalmazó 1-1,5%-os (w/v) agaróz gélen választottuk el 1xTBE pufferben (90 mM Tris-borát; 2 mM EDTA). Az elektroforézis után 312 nm áteső ultraibolya fényben tettük láthatóvá és fényképeztük. A gélt röviden vízben mostuk, majd 20 percig denaturáló oldatban (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl), illetve 20 percig neutralizáló oldatban (0,5 M Tris-HCl pH:7,0; 1,5 M NaCl) áztattuk. Az így előkezelt gélt 20 percen át 20xSSC-ben (3 M NaCl; 0,3 M nátrium-citrát pH:7,0) áztattuk, utána a DNS-t kapilláris transzferrel Amersham Hybond™ nejlon membránon immobilizáltuk. A DNS-t a membránnal UV-vel keresztkötöttük, és 4 órát 2xSSC + 10xDenhardt (0,2% (w/v) fikoll; 0,2% (w/v) polivinilpirrolidon; 0,2% (w/v) BSA) oldatban előhibridizáltuk 65°C-on. A hibridizálást ugyanilyen összetételű oldatban, ³²P-jelölt próba hozzáadásával 65°C-on végeztük 16 órán át. A próbát Klenow polimeráz segítségével jelöltük. A hibridizáció után a membránt kétszer mostuk 65°C-on 20 percig 2xSSC + 0,1%

(w/v) SDS-ben, majd ugyancsak 65°C-on 20-20 percig 1xSSC + 0,1% (w/v) SDS illetve 0,3xSSC + 0,1% (w/v) SDS oldatokban áztattuk. Száradás után a membránt autoradiografáltuk.

5. RT-PCR

Össz-RNS-t random hexamer primer és M-MuLV reverz-transzkriptáz (Fermentas™) segítségével írtuk át cDNS-sé, majd az így kapott cDNS-t használtuk templátnak a PCR reakciókban.

A reakcióban használt primerek:

ADA1: 5' - GAACCCCGTGGATATGGTGG-3'

ADA2: 5' - CATGTGGCACACCGATTGGC-3'

ADA3: 5' -CTGCATCAGCAAGCTTCGAG-3'.

6. Ecetmuslica szöveteinek festése

L3-as stádiumú lárvák és kifejlett ecetmuslicák szöveteinek β -galaktozidáz expresszióját vizsgáltuk. Egy csepp fixáló oldatban (PBS+Mg; glutár-aldehid) boncoltuk az állatokat, majd 15 percig hagytuk fixálódni az oldatban. A fixálás után mikrotiter plate-ben mostuk háromszor 2 percig PBS+Mg pufferben (32 mM NaH₂PO₄; 168 mM Na₂HPO₄; 1 mM MgCl₂). Ezt követően festő oldatot (PBS+Mg; ferri-ferrocianid; 1,5 mg/ml 5-bromo-4-kloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosid (X-Gal)) mértünk a mintákra és sötétben 25°C-on inkubáltuk, míg a festődés kifejezett nem lett. A megfelelően festődött mintákat vízzel mostuk, majd glicerinben áztattuk 2 órán át. A szöveteket tárgylemezre raktuk és mikroszkóppal vizsgáltuk.

7. Schneider S2 sejtek transzfektálása és lumineszcencia mérés

A Schneider S2 sejteket Sigma Schneider's Insect Medium + 10 % (v/v) Fetal Calf Serum (Sigma) tápoldatban növesztettük. 35 mm-es petricsészékbe 3x10⁶ sejtet tettünk. A transzfekció előtt két órával lecseréltük a régi tápoldatot frissre. A transzfekciót kalcium-

foszfát csapadékkal végeztük. HEPES pH:6,9 és 0,25 M CaCl₂ oldatot, amely tartalmazta a transzfektálandó DNS-t is, csöpögtettünk össze enyhe rázatás mellett, majd 20 perc után a sejtekhez adtuk az így keletkezett csapadékos oldatot. 16 órával a transzfekció után a tápoldatot újra kicseréltük.

A mérést 48 órával a transzfekció után végeztük. A sejteket kétszer mostuk PBS-sel (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄; 1,4 mM KH₂PO₄), majd PBS-ben gumirendőrrel összegyűjtöttük. A sejteket 1000 g-vel ülepítettük 5 percig 4°C-on. Az extrahálást Promega Cell Culture Lysis Reagent segítségével végeztük. 20 µl lizátumhoz 25 µl luminolt adtunk és a lumineszcenciát SZBK-gyártmányú luminométerrel mértük.

8. Schneider S2 sejtmagi extraktum készítése

A sejteket kétszer mostuk PBS-sel, majd PBS-ben összegyűjtöttük, és 500 g-vel 10 percig ülepítettük őket. Ezt követően 5 térfogat PBS-sel mostuk, és ismét ülepítettük őket az előzőekben leírt módon. A csapadékot 5 térfogat „A” pufferben (10 mM HEPES pH:7,9; 1,5 mM MgCl₂; 10 mM KCl; 0,5 mM DTT) vettük fel, és meghatároztuk az összsejtszámot. Utána ismét centrifugáltuk a sejteket 500 g-vel 10 percig, 2 térfogat „A” pufferben szuszpendáltuk, és homogenizáltuk Dounce homogenizátorban. A homogenizátumot 500 g-vel centrifugáltuk 10 percig. A csapadékhoz 3 ml/10⁹ sejt „C” puffert adtunk (20 mM HEPES pH:7,9; 25% (v/v) glicerin; 0,42 M NaCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM EDTA; 0,5 mM PMSF; 0,5 mM DTT), és ismét homogenizáltuk Dounce homogenizátorral., majd jeges vízfürdőben kevertettük 30 percet. A mintát centrifugáltuk 10000 g-vel 20 percig, és a felülúszót dializáltuk „D” pufferrel szemben (20 mM HEPES pH:7,9; 20% (v/v) glicerin; 0,1 M KCl; 0,2 mM EDTA; 0,5 mM PMSF; 0,5 mM DTT).

9. Gélretardáció

A gélretardációhoz ³²P-jelölt DNS fragmentumot használtunk. A jelölt fragmentumot *Drosophila melanogaster* Schneider S2 sejtmagi extraktumban inkubáltuk 30 percig 1xGS pufferben (10 mM HEPES pH:7,9; 50 mM KCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 10% (v/v) glicerin) változó pdIdC koncentrációval. A reakciót GSstop pufferrel állítottuk le (1xGS; 0,05% (w/v) brómfenolkék), majd 4,5%-os nemdenaturáló poliakrilamid gélben futtattuk.

A kompetíciónál a nemjelölt duplaszálú oligonukleotidot adtuk először a sejtmagi kivonatba, majd 10 perc után adtuk hozzá a jelölt próbát.

A szupershift reakcióban poliklonális α -DREF ellenanyagot használtunk 1:200-as hígításban. Az ellenanyagot 15 perc előinkubálás után adtuk a reakcióelegyhez, majd további 15 percen át inkubáltuk. Az ellenanyag Dr. Rafael Garesse laboratóriumából származott.

10. *Drosophila melanogaster* embrió kivonat készítése

A 6 órán át gyűjtött Canton S embriókat vízzel felére hígított Clorox[®]-ban dechorionizáltuk, majd vízzel leöblítettük. A homogenizálást 1 ml/g homogenizációs pufferben (0,25 M szukróz; 20 mM Tris-HCl pH: 7,5; 1 mM CaCl₂; 2 mM EDTA; 100 mM NaCl; 1 mM dithiothreitol) végeztük Dounce homogenizátorban. A homogenizálás után 20 percig 18000 g-vel centrifugáltuk, a felülúszót a felhasználásig -80°C-on tároltuk.

11. RNS stabilitás vizsgálat

A radioaktívan jelölt RNS-eket *in vitro* transzkripcióval állítottuk elő. A templát DNS-eket pBLUESCRIPT II-KS vagy SK plazmidba klónoztuk, és T7 vagy T3 RNS polimerázzal ³²P-UTP jelenlétében RNS-t szintetizáltunk róluk. A jelölt RNS-eket 11 μ l embrió extraktumban inkubáltuk 25°C-on 30 percig, 0,1 μ l 100 mM ATP és 1 μ l RNáz inhibitor jelenlétében. Ez után 20 μ l 2xPK puffert (200 mM Tris-HCl pH:7,5; 25 mM EDTA; 300 mM NaCl; 2% (w/v) SDS) adtuk hozzá, amely 10 mg/ml koncentrációban proteináz K-t tartalmazott, és 2 órán át 65°C-os termosztátba tettük. Fenol/kloroformos extrakció után 2,5 térfogat 96%-os (v/v) etanollal és 1/10-ed térfogat 3 M Na-acetáttal pH:5,2 kétszer kicsaptuk 1 μ g tRNS jelenlétében. A mintákat formaldehidet tartalmazó 1,4%-os (w/v) agaróz gélben futtattuk, pozitívan töltött nejlón membránon immobilizáltuk és autoradiografáltuk.

12. Formaldehides gélelektroforézis

A formaldehid gélelektroforézist 1xPAE pufferben végeztük (10 mM nátrium-foszfát puffer pH:7,0; 5 mM Na-acetát; 1 mM EDTA). A gél tartalmazott a PAE pufferen kívül 0,8-2%

(w/v) agarózt és 2,2 M formaldehidet. A mintákat denaturáló pufferben oldottuk fel (1xPAE; 50% (v/v) formamid; 2,2 M formaldehid; 0,05% (w/v) xilencianol; 0,05% (w/v) brómfenolkék), 65°C-on denaturáltuk, és így futtattuk állandó kevertetés mellett.

13. Duplaszálú RNS kimutatás

In vitro transzkripcióval ³²P-jelölt RNS-t használtunk detekciós próbának. A templát DNS-t Promega RQ1 RNáz mentes DNázal távolítottuk el. Totál RNS kivonathoz hibridizációs pufferben (80% (v/v) formamid; 40 mM PIPES pH:6,4; 1 mM EDTA) hibridizáltuk a jelölt próbát 5 perc 85°C-os denaturálást követően 50°C-on 18 órát. Ezt követően RNáz oldatot (10 mM Tris-HCl pH:7,5; 5 mM EDTA; 0,3 M NaCl; RNáz A; RNáz T1) adtunk a mintákhoz és 30 percig inkubáltuk 30°C-on, majd SDS és Proteináz K hozzáadásával állítottuk le a reakciót. Fenol/kloroformos extrahálást követően 96%-os (v/v) etanollal kicsaptuk, és denaturáló poliakrilamid gélen vizsgáltuk.

14. Denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis

Az elektroforézist 0,5xTBE pufferben végeztük (45 mM Tris-borát; 1 mM EDTA). A gél 8-12% akrilamidot tartalmazott, amelyet 40% (w/v) akrilamid-2% (w/v) biszakrilamid oldatból hígítottunk. A polimerizációt 0,1% ammónium-perszulfát és N,N,N',N'-tetrametiléndiamin hozzáadásával idéztük elő. A mintákat szekvenáló pufferbe oldottuk vissza (80% (v/v) formamid; 1 mM EDTA; 50 mM Tris-borát pH: 8,3; 0,05% (w/v) xilencianol; 0,05% (w/v) brómfenolkék), majd denaturáltuk 3 percig 90°C-on. A gél a mintafelvitel előtt előfuttattuk 15 percet.

15. Immunprecipitáció

0,5 µg anti-2,2,3-trimetil-guanozin ellenanyagot (OncogeneTM) inkubáltunk 5 mg Protein-A szefarózzal NET-2 pufferben (50 mM Tris-HCl pH:7,4; 150 mM NaCl; 0,05% (v/v) Nonidet P-40 (NP-40)) 1 órán át 4°C-on. A szefaróz gyöngyöket háromszor mostuk NET-2 pufferrel, majd 40 µg totál RNS-t adtunk hozzá, és 2 órát inkubáltuk folyamatos kevertetés mellett 4°C-

on. A gyöngyöket 500 g-vel ülepitettük 5 percig, majd a felülúszóhoz proteináz K-t adtunk 2xPK pufferben. A csapadékot mostuk háromszor NET pufferrel (50 mM Tris-HCl pH:7,4; 400 mM NaCl; 0,05% (v/v) NP-40), majd ugyancsak Proteináz K-t adtunk hozzá. A mintákat fenol-kloroformos extrakció után 96% (v/v) etanollal kicsaptuk. A mintákat Northern hibridizációval vizsgáltuk.

16. Northern hibridizáció

A Northern hibridizációt formaldehides gélelektroforézist követően végeztük. U1, U2, U4, U5 és U6 specifikus DNS próbát használtunk. A próbákat PCR után T-végű klónozó vektorba ligáltuk, és innen hasítottuk ki restrikciós endonukleázok segítségével. A próbát Klenow polimeráz segítségével jelöltük. Az RNS-t Amersham HybondTM membránon immobilizáltuk. A hibridizációs körülmények azonosak voltak a Southern hibridizációnál leírtakkal.

A próbák készítésénél használt primerek:

U1fw: 5'-CGGATCCGATACTTACCTGGCGTAGA-3'

U1rv: 5'-CGAATTCCGCGAACGCCATTCCCG-3'

U2fw: 5'-CGGATCCATCGCTTCTCGGCCTTAT-3'

U2rv: 5'-CGAATTCAAATCCCGGCGGTACTGC-3'

U4fw: 5'-CGGATCCCTTAGCGCAGTGGCAATAC-3'

U4rv: 5'-CGAATTCCTCGTAAGGGCTTCCAAAA-3'

U5fw: 5'-CGGATCCCTCTGGTTTCTCTTCAATGT-3'

U5rv: 5'-CGAATTCTGGCCCAGTCTTGCGACA-3'

U6fw: 5'-CGGATCCTCTTGCTTCGGCAGAACAT-3'

U6rv: 5'-CGAATTCAAAAATGTGGAACGCTTCA-3'.

E, Eredmények

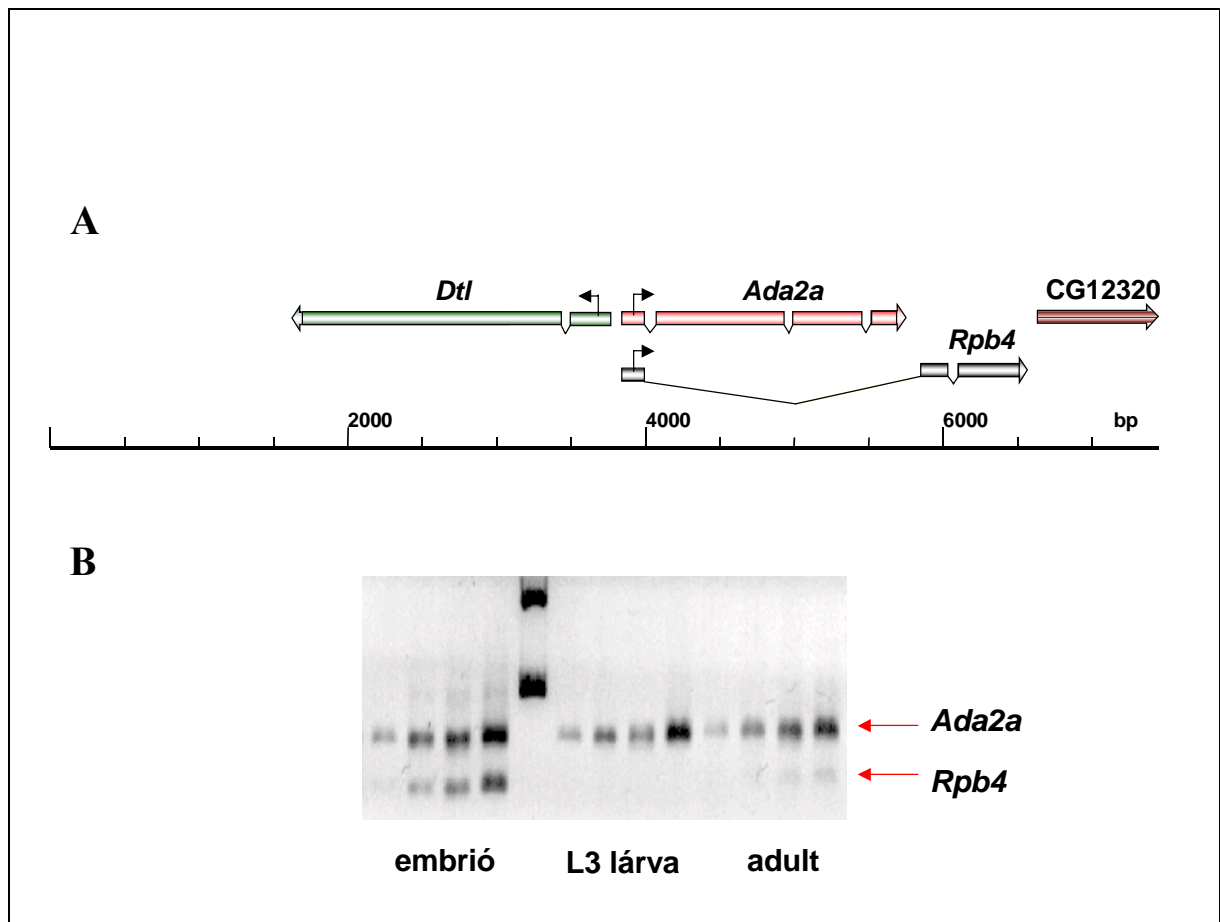
A disszertáció anyagát képező kísérletek java részét én végeztem, de mások is hozzájárultak. Selen Muratoğlu hozzájárulása a primer extenziós kísérleteknél és a mutáns törzsek előállításánál volt jelentős. Tóth Zsolt készítette a *Dtl* promóter konstrukciókat, Komonyi Orbán pedig a légygenetikai munkákat, a mutáns fenotípusok leírását, a promóter fragmentumokat tartalmazó transzgenikus legyeket és az immunhisztokémiai festéseket végezte, valamint a transzgenikus legyek β -galaktozidáz expressziójának kimutatásánál segített.

1. A *Drosophila melanogaster* *Ada2a/Rpb4* és *Dtl* gének szerkezeti analízise

1.1. Az *Ada2a/Rpb4* és *Dtl* gének 5' végeinek azonosítása

Udvardy Andor laboratóriumában egy alkalmas teszttel azonosították az *ada2a/rpb4* és *Dtl* géneket a *Drosophila melanogaster* 90F9-11-es citológiai régiójában. A tesztben a HIV-1 vírus szabályozó RNS-éhez, a TAR RNS-hez kötődni képes fehérjékre szelektáltak. A *Dtl* gén (CG31241) terméke a vírus TAT fehérjéjéhez hasonlóan képes volt kötődni a TAR RNS-hez, ennél fogva neveztük a fehérjét Drosophila TAT Like-nak (DTL). Az első szerkezeti vizsgálatok azt mutatták, hogy a *Dtl* génhez nagyon közel, azzal ellentétes irányba átíródva egy másik transzkripció egység helyezkedik el (**1. ábra A**). *In silico* analízis, és cDNS-ek vizsgálata arra mutatott, hogy erről a génről két fehérje íródik át. Az egyik egy transzkripció koaktivátorral, az élesztő ADA2-vel mutatott hasonlóságot, míg a másik lehetséges transzkriptum az RNS polimeráz II B4-es alegységével volt homológ (**1. függelék**). A két potenciális fehérjét ADA2a-nak és RPB4-nek neveztük el. Előzetesen homológiák alapján feltételeztük, hogy az *Ada2a/Rpb4* génről két fehérje képződik, felmerült a kérdés, hogy a fehérjéket kódoló mRNS-ek valóban léteznek-e. RT-PCR kísérletet végeztünk olyan primerekkel, ahol a forward primer közös volt, de a két reverz primer közül az egyik az ADA2 rokon fehérjét kódoló exonban volt, míg a másik az RPB4-et kódoló exonban (**1. ábra B**). A kapott termékek méretéből arra következtettünk, hogy nem egy mRNS-ről kaptuk őket, tehát mindkét transzkriptum létezik. Az is megfigyelhető volt, hogy a vizsgált egyedfejlődési

stádiumokban eltérés tapasztalható az ADA2a és az RPB4 expressziója között. Genomikus DNS kontamináció kiszűrése érdekében a primereket exon-exon határookra terveztük.



1. ábra

***Drosophila melanogaster* 90F10-11 citológiai régió részlet**

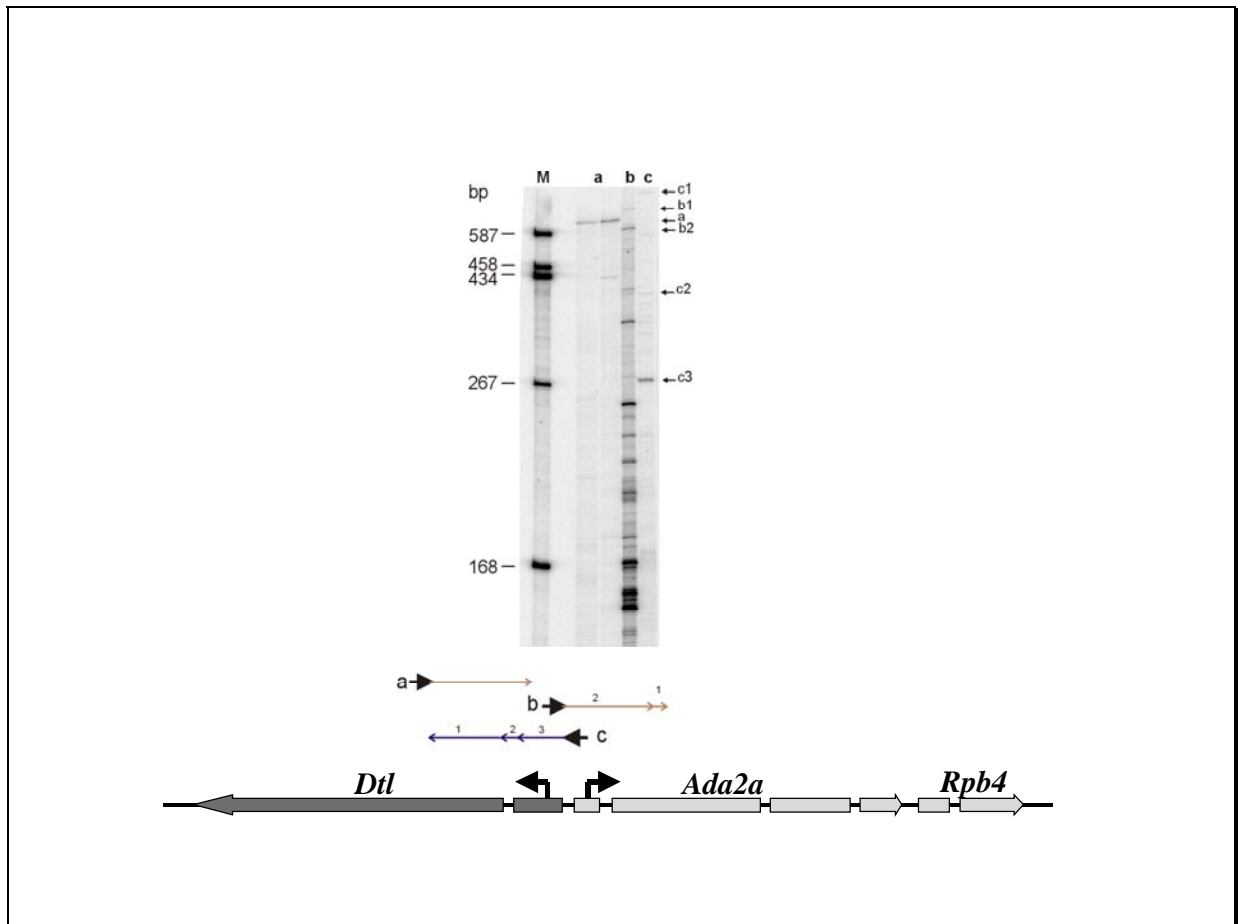
A: Az *Ada2a/Rpb4* és *Dtl* gének szerkezete és genomikus környezete; **B:** RT-PCR *Ada2a* és *Rpb4* specifikus primerekkel bizonyítja, hogy mindkét transzkriptum létezik.

Az első szerkezeti vizsgálatokban Cserpán Imre meghatározta a két gén 3' végét, és az exon-intron határokat. Ez alapján a *Dtl* gén 2 exonból áll, köztük egy 59 bázispárból álló intron foglal helyet. A *Drosophila melanogaster* genom annotáció szerint a gén 5' nemtranszlálódó régiója (UTR) meglehetősen hosszú, kb. 600 bázispár. Az *Ada2a/Rpb4* génnek 6 exonja van, amelyből az első exon közös, a második, harmadik és negyedik exon kódolja az ADA2a fehérjét, míg az ötödik és hatodik az RPB4-et (**1. ábra A**) (50). Tehát a két fehérjét kódoló mRNS-ek átíródása közös exonról indul, és alternatív éréssel képződnek.

Mivel az adatbázisokban található cDNS darabok, EST-k (Expressed Sequence Tag) ritkán reprezentálják a gén 5' végét, így célul tűztük ki a génekről induló transzkripció

kezdőpontjainak pontos meghatározását. Az is kérdésként merült fel, hogy az ADA2a-t és az RPB4-et kódoló RNS átíródása vajon ugyanazon a ponton kezdődik-e.

A kérdések megválaszolására primer extenziós kísérleteket végzetünk, amelyek arra utaltak, hogy a két gén átfedhet egymással (**2. ábra**). A primer extenziós kísérletben kapott termékek alapján az *Ada2a/Rpb4* gén kezdőpontja nagyon közel helyezkedik el a *Dtl* translációs startpontjához (**2. ábra c3**), míg a *Dtl* gén transzkripciója két pontról is indulhat. Az egyik 5' vég kb. 600 bázispárra helyezkedik el a *Dtl* translációs startpontjától (**2. ábra a**), míg a másik ennél jóval messzebb található (**2. ábra b1 és b2**). Az ábrán nem látszik, de a *Dtl* 5' végének azonosítására használt „b” jelű primer a primer extenzióban adott egy nagyon rövid, kb. 100 nukleotidos terméket is, amely ugyanoda jelöli ki a startpontot, mint az „a” jelű primerrel kapott termék.



2. ábra

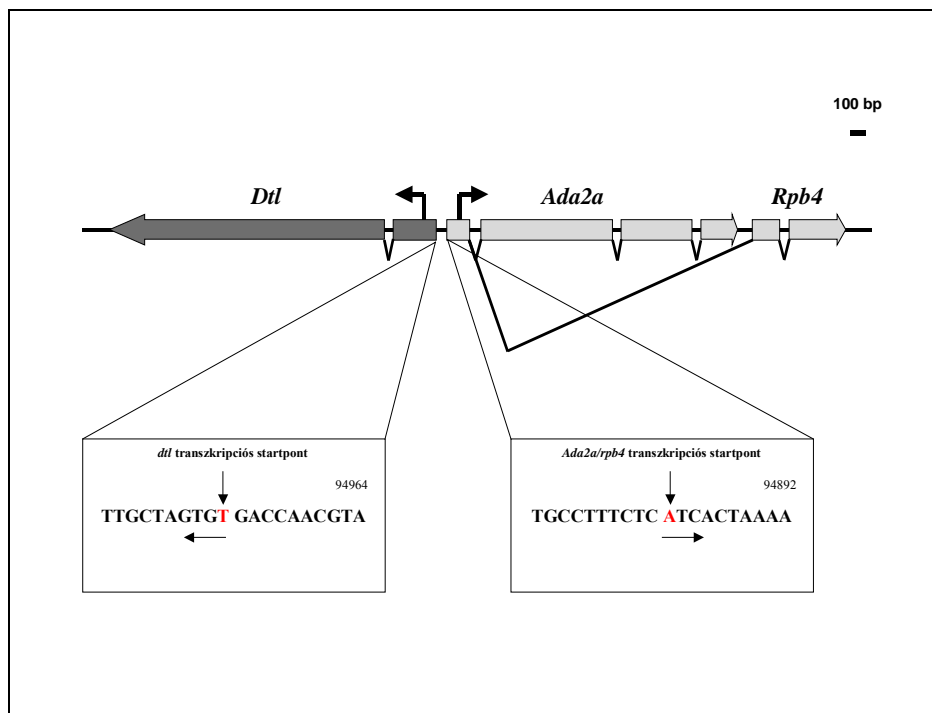
Primer extenzió *ada2a* és *Dtl* specifikus primerekkel

Primer extenziós kísérlettel meghatároztuk a Dtl és Ada2a/Rpb4 gének transzkripciós startpontjainak elhelyezkedését. Az a és b jelű primerek Dtl specifikusak, a c jelű primer Ada2a/Rpb4 specifikus volt. A b1, b2 valamint a c1, c2 és c3jelzés az ugyanazon primerrel kapott különböző hosszúságú termékeket jelöli mind a sematikus rajzon, mind az autoradiogrammon. Az ábra alján a gének sematikus rajza, és a kapott termékek végpontjainak helyzete található.

A két gén transzkripciós startpontjának pontos meghatározására 5'RACE (Rapid Amplification of cDNA End) kísérletet végeztünk. A kísérlet megbízhatóságát úgy sikerült növelni, hogy olyan kit-et használtunk, amelynél PCR termék csak akkor jöhetett létre, ha a mRNS cappelt volt. A módszer lényege, hogy az RNS-ekről először eltávolítottuk az 5'-foszfát csoportot, majd egy enzim segítségével lehasítottuk a cap struktúrát a mRNS-ek végéről és T4 RNS ligázzal RNS adaptert ligáltunk hozzájuk. Az adapter csak azokhoz az RNS-ekhez volt képes ligálódni, ahol az 5'-foszfát csoportot a cap védte. Ezek után a mRNS-eket random primerekkel átírtuk cDNS-sé, és klónoztuk, majd meghatároztuk a bázissorrendjüket.

Ezzel a módszerrel sikerült mind az *Ada2a/Rpb4* gén, mind a *Dtl* 5' végét klónozni, és bázispár pontossággal meghatározni (3. ábra). A *Dtl* gén ezzel a módszerrel megállapított 5' vége 597 bázispárra helyezkedik el az annotált transzlációs startponttól, ami jól korrelál a primer extenzióban kapott egyik transzkripció startponttal. Az *Ada2a/Rpb4* gén 5' vége 84 bázispárra található a gén transzlációs kezdőpontjától.

Ellentétben a primer extenzióanalízissel, arra az eredményre jutottunk, hogy a két gén nem fed át. *Ada2a* valamint *Rpb4* specifikus primereket használva megállapítottuk, hogy az ADA2a-t és az RPB4 fehérjét kódoló RNS-ek 5' vége megegyezik, a génről a transzkripció egy pontról indul. A *Dtl* és *Ada2a/Rpb4* gének 5' vége között 73 bázispár a távolság. Ez nagyon szoros elrendeződést jelent, hiszen egy eukarióta promóter általában több mint száz bázispár hosszúságú. A szoros elrendeződés azt feltételezi, hogy a szabályozó régiók átfednek.



3. ábra

Dtl és *Ada2a/Rpb4* gének 5' végeinek meghatározása 5'RACE-szel

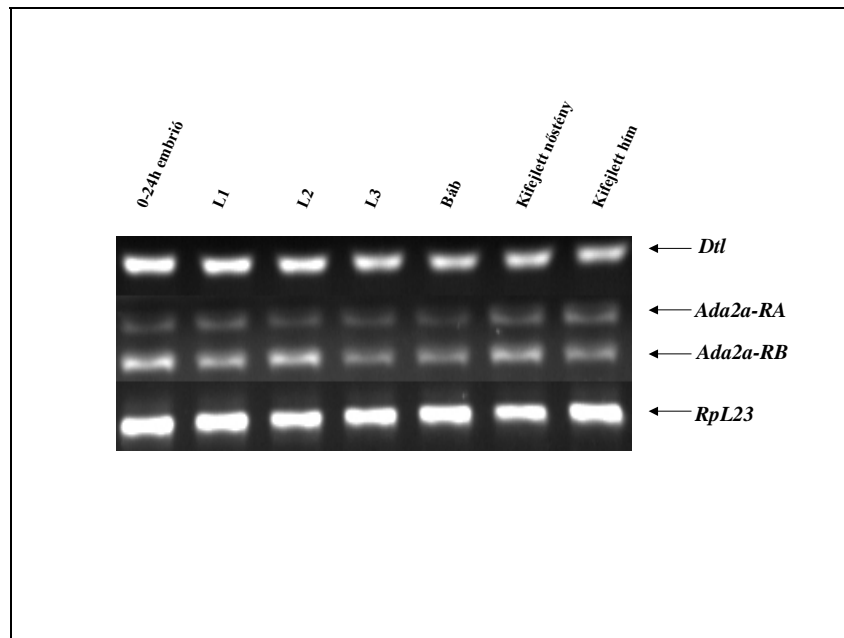
A tl és Ada2a/Rpb4 gének transzkripció startpontjainak pontos elhelyezkedése. Az Ada2a és Rpb4 mRNS átíródása egy pontról indul.

1.2. A két gén promóter régiójának *in vivo* analízise

Egy átlagos *Drosophila melanogaster* promóter kb. 70-80 bázispár hosszú, a transzkripció startponttól +40 és -40 bázispárra terjed ki (93). Más meghatározás szerint az alap promóter

több mint száz bázispárra kiterjed (1). A *Dtl* és *Ada2a/Rpb4* gének közötti távolság csupán 73 bázispár, ahol egy alap promóter is szűken fér el, nemhogy kettő. A két gén expressziójának mértéke az *ecetmuslica* fejlődési stádiumaiban eltér egymástól (4. ábra), így feltételezhető, hogy bár a gének szorosan helyezkednek el, a kifejeződésük mégis független egymástól.

A *Dtl* és *Ada2a/Rpb4* gének szoros elrendeződése felveti a kérdést, hogy a gének alap promótere és a szabályozásukban résztvevő cisz-elemek hol helyezkednek el. A kérdés megválaszolására Schneider S2 sejtekben végeztünk kísérleteket, ahol luciferáz riportergén kifejeződését vizsgáltuk. A szentjánosbogárból (*Photinus pyralis*) származó luciferáz használatát azért választottuk, mert jól kvantitálható, így érzékenyen mutatja a kifejeződésében tapasztalható esetleges eltéréseket. Egy promóter nélküli luciferáz riportergént tartalmazó vektorba (pA3Luc (94)) klónoztuk az egyes genomi DNS darabokat, a luciferáz gén elé.



4. ábra

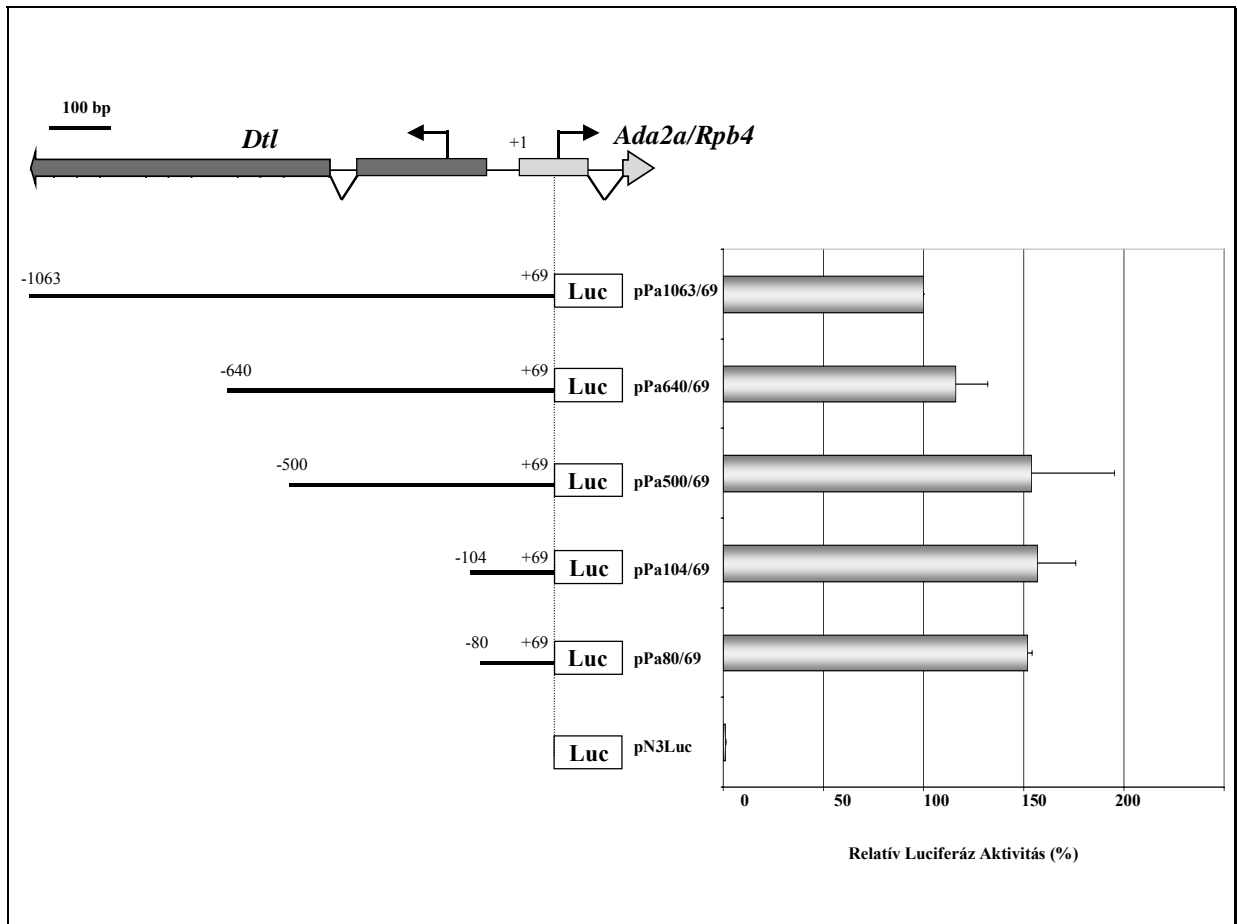
***Dtl* és *Ada2a* mRNS eloszlása különböző fejlődési stádiumokban**

RT-PCR az ecetmuslica fejlődési stádiumaiból, Dtl és két Ada2a izoforma specifikus primereket használva. Kontrollként RpL23 riboszómális fehérjét kódoló génre specifikus primereket alkalmaztunk.

1.2.1. Az *Ada2a/Rpb4* gén promóterének vizsgálata S2 sejtekben

A gén promóterének vizsgálatát olyan DNS szakasszal kezdtük, amelyről feltételeztük, hogy tartalmazza az összes szabályozó elemet. Ez egy 1142 bázispár hosszú szakasz volt, amelyet PCR segítségével állítottunk elő dtIL és MinR primereket használva. A klónozott PCR terméket EcoRI-BamHI emésztés és Klenow feltöltés után EcoRV hasítási helyre pBluescript II-SK vektorba klónoztuk. A vizsgálni kívánt DNS darabot a megfelelő orientációban tartalmazó konstrukcióból PstI-HindIII emésztés után az ugyanezen enzimekkel emésztett pA3Luc vektorba ligáltuk (pPa1063/69). A pPa640/69 és pPa500/69 plazmid konstrukciókat a pPa1063/69 plazmidból állítottuk elő. A pPa640/69-et a pPa1063/69 BssHII-SmaI emésztése, Klenow feltöltése és ligálása után kaptuk meg, a pPa500/69-et a pPa1063/69 EcoR52I-SmaI emésztése, Klenow feltöltése és ligálása után. A pPa104/69 plazmidot Tóth Zsolt készítette PCR segítségével a MinF és MinR primereket használva. A PCR terméket pBluescript II-KS vektorba klónoztuk, majd a megfelelő orientációjú plazmidból a kívánt DNS szakaszt PstI-HindIII emésztéssel ligálta hasonlóan hasított pA3Luc vektorba. A pPa80/69 konstrukciót hasonló módon állítottuk elő, a PCR reakcióban használt primerek a MinF2 és a MinR voltak.

Az így elkészített, az *Ada2a/Rpb4* gén promóter régióját különböző hosszúságban tartalmazó plazmid konstrukciókat Schneider S2 sejtekben transzfektáltuk, és mértük a luciferáz aktivitását, amiből a luciferáz fehérje mennyiségére következtettünk. Kontrollként pN3Luc plazmidot használtunk, amely a Schneider S2 sejtekben nem működő humán Hsp70 promótert tartalmazta. Minél jobban expresszáldott a rípotergén, annál jobban funkcionált promóterként az elé épített DNS szakasz.



5. ábra

Az *Ada2a/Rpb4* gén promóter régiójának analízise

Luciferáz riportergén elé klónozott Ada2a/Rpb4 promóter fragmentumok Schneider S2 sejtekben mért aktivitása. A fragmentumok kezdő- és végpontjait a gén transzkripció startpontjához viszonyítottuk.

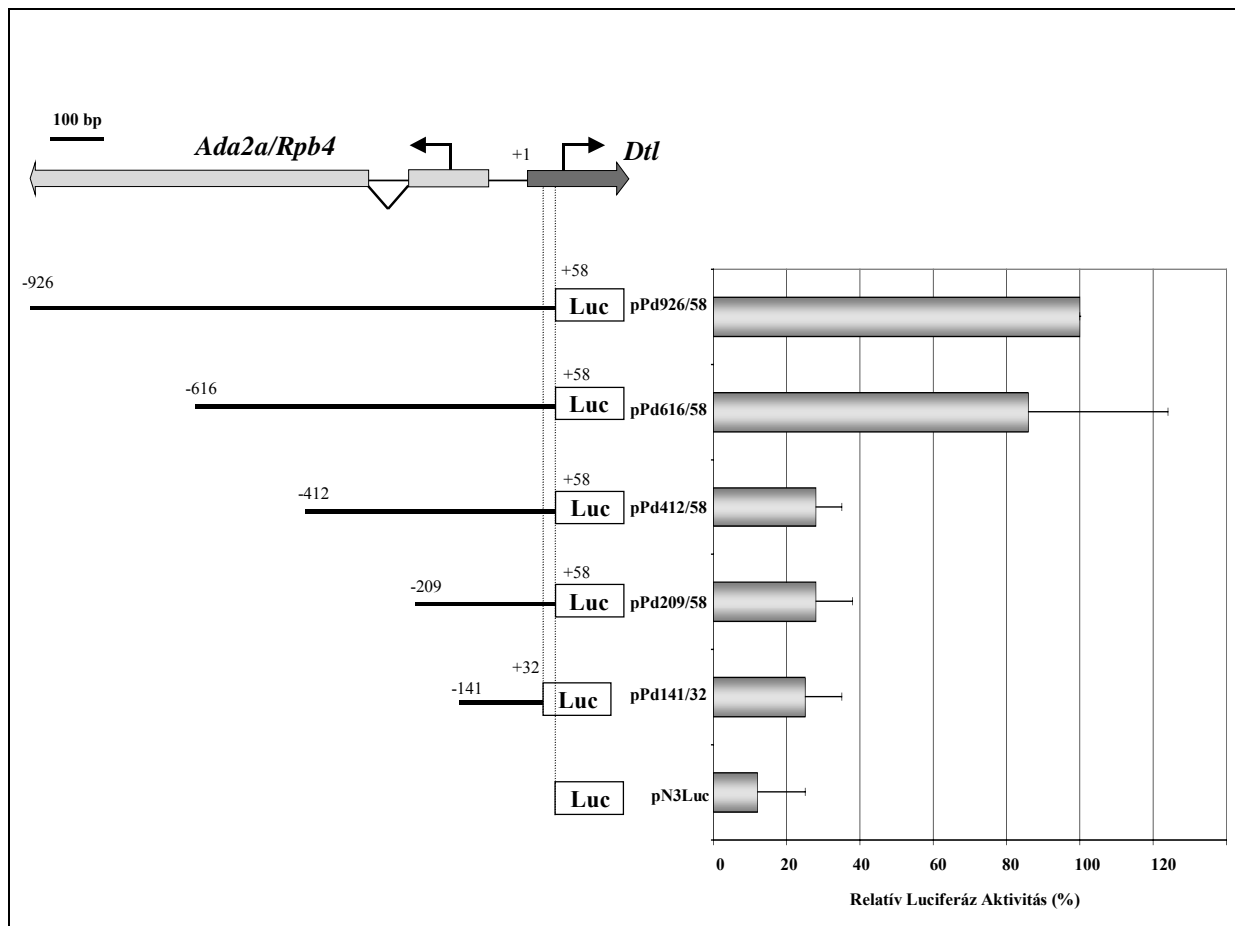
A mérési eredmények azt mutatták (5. ábra), hogy a legrövidebb DNS darabot tartalmazó plazmid (pPa80/69) is erős expressziót biztosított, a pPa1063/69-nek ~150%-át. Ez azért is meglepő, mivel itt már csak 80 bázispár található a transzkripció startpont előtt. A feltételezett promóter régiót tartalmazó plazmid (pPa1063/69), és annak deléciós származékai nem mutatnak szignifikáns eltérést a génextpresszió erősségére gyakorolt hatásukban. A mért relatív luciferáz aktivitás ugyan megnő, ha rövidebb szakasz van a transzkripció startpont előtt, de ez a másfélszeres változás összehasonlítva más gének promóter analízisével nem számottevő, nem tudható be egy gátló faktor kiesésének. Bár az *in silico* transzkripció faktor kötőhely vizsgálat számos kötőhelyet mutatott ebben a régióban, az általunk használt kísérleti körülmények között egyiknek sincs számottevő hatása a transzkripció erősségére. Az egyetlen számottevő változást a -500 és -640 közötti 140 bázispáros szakasz kiesése okozza, ami

másfélszeres aktivitásnövekedéshez vezetett (lásd pPa640/69 és pPa500/69 az 5. ábrán). Ezen a szakaszon egy Hairy nevű represszor fehérje kötőhelyét prediktálta a számítógépes program.

1.2.2. A *Dtl* gén promóterének vizsgálata Schneider S2 sejtekben

A *Dtl* gén promóter analíziséhez luciferáz riportergén elé építettünk különböző hosszúságú genomikus DNS darabokat a *Dtl* gén feltételezett promóter régióját lefedve. A pPd926/58 előállításához pBluescript II-KS vektorba klónozott promóter fragmentumot hasítottunk ki. Innen HindIII-SmaI emésztés után hasonlóan emésztett pA3Luc vektorba ligáltuk a promóter szakaszt. A pPd616/58, pPd412/58 és pPd209/58 a pPd926/58 deléciós származékai. A pPd141/32 ugyanazt a DNS szakaszt tartalmazza, mint a pPa104/69, csak fordított orientációban. A plazmidokat Schneider S2 sejtekbe transzfektáltuk, majd mértük a képződött luciferáz aktivitását. Kontrollként pN3Luc plazmidot használtunk.

A mért értékek (**6. ábra**) azt mutatták, hogy a pPd616/58 és pPd412/58 között egy jelentős aktivitáscsökkenés volt. A pPd926/58 és pPd616/58 körülbelül ugyanakkora aktivitást mutatott, és a pPd412/58-nak, a pPd209/58-nak és a pPd141/32-nek is összehasonlítható volt az aktivitása. Az aktivitáscsökkenés a transzkripció startponttól számított –412. és –616. közötti szakasz kiesésekor volt tapasztalható. Ha ez a 204 bázispár már nincs jelen a promóterben, akkor a promóter aktivitása 70%-kal csökken. A további rövidülések már nem jelentenek változást a promóter aktivitásában. Az eredményekből arra következtettünk, hogy az aktivitáscsökkenést okozó 204 bázispáros szakaszon nagy valószínűséggel transzkripció aktivátor kötőhely vagy kötőhelyek helyezkednek el. Ezen a szakaszon internetes adatbázisok alapján prediktálni lehet transzkripció faktor kötőhelyeket, ezeket a későbbiek során fogom tárgyalni.



6. ábra

Dtl gén promóter régiójának analízise

Luciferáz riportergén elé klónozott Dtl promóter fragmentumok Schneider S2 sejtekben mért aktivitása. A fragmentumok kezdő- és végpontjait a gén transzkripció startpontjához viszonyítottuk.

1.2.3. Az *Ada2a/Rpb4* gén promóterének vizsgálata transzgenikus legyekben

Mivel a luciferáz riportergén analízisben a pPa104/69 mutatta a legerősebb transzkripció aktiváló hatást, ezért ezt a promóter fragmentumot használtuk a transzgenikus legyek előállítására. A fragmentumot egy P-elem alapú vektorba, a pCaSpeR-AUG- β -gal vektorba (95) építettük. A *LacZ* gén csak akkor fejeződik ki, ha az elé inszertált DNS-nek promóter aktivitása van.

Négy olyan független törzset vizsgáltunk, ahol a transzgén csak egy kópiában épült be a genomba. A törzsek a transzgén inszerciós helyében tértek el egymástól. Az inszerció helye nagyon fontos, ugyanis a genomi környezet alapvetően befolyásolja az expresszió erősségét.

A négy törzsben más-más erősséggel expresszáldott a β -galaktozidáz fehérje, viszont a szöveti eloszlásuk egy törzs kivételével megegyezett, ebben az egy törzsben mindenhol tapasztaltunk expressziót. Specifikus festődést észleltünk az L3-as lárvális stádiumú lárváknak a gonádjában, a szemdiszkuszukban és az agyukban (7. ábra). A kifejlett állatoknak csak a gonádjai festődtek, így a hímek heréi, és a nőstények ováriumai mutattak β -galaktozidáz aktivitást.

Mivel a génről két, a homológiák alapján valószínűleg szélesebb körben kifejeződő fehérje íródik át, így a vizsgált promóter szakaszról feltehetően hiányoznak egyes szövetspecifikus transzkripciós-faktor kötőhelyek.

		Kifejlett légy					Lárva								
		N.gonád	H.gonád	Malpighi	Zsírtest	N.válmirigy	bél	Agy	Diszkusz	Gonád	Epiderm.	Malpighi	Gvűrű m.	Izom	Végtagok
d926/58	1	+++	+++	0	0	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+
	2	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+
	3	+	+	0	0	0	0	+	0	+	+	0	+	+	+
	4	+	+	0	0	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+
	5	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+
d141/32	1	+++	+++	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	+	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0
	4	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	+	+	0	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+

+++
 ++
 +

7. ábra

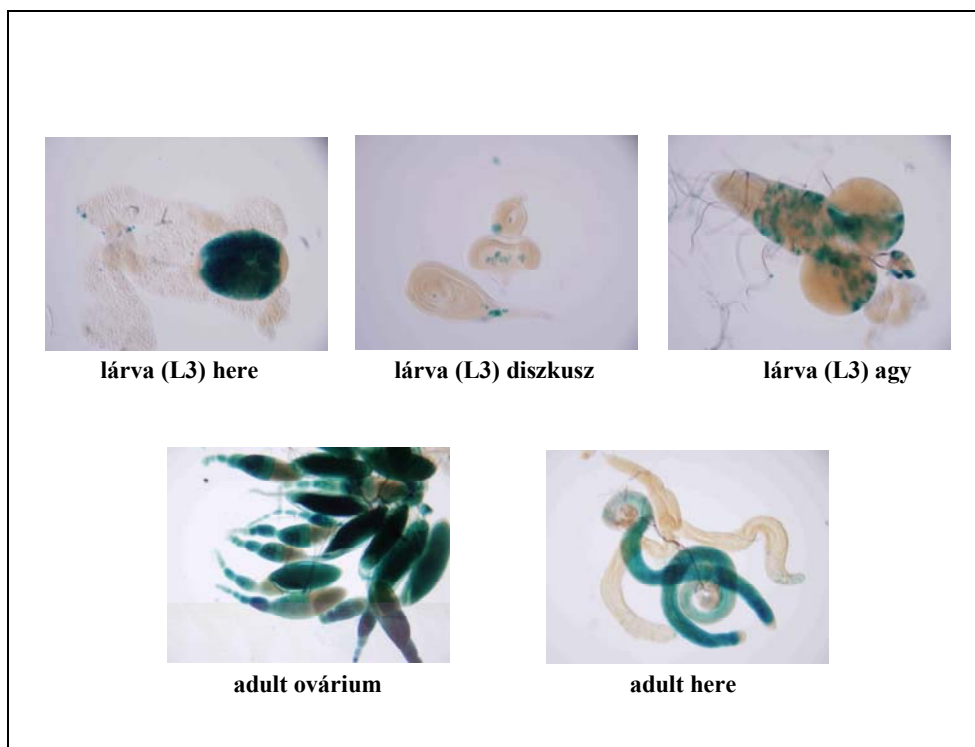
Dtl transzgének β -galaktozidáz aktivitása ecetmuslica lárvákban és kifejlett egyedekben
 Egy kb. 1000 (d926/58) és egy 170 bázispár (d141/32) hosszúságú Dtl promóter szakaszt juttattunk mint transzgént *Drosophila melanogaster*-be. A promóter fragmentumnak megfelelő β -galaktozidáz kifejeződés erősségét az egyes mezők színintenzitása mutatja.

1.2.4. A *Dtl* gén promóterének vizsgálata transzgenikus legyekben

A *Dtl* gén szöveti eloszlását két különböző konstrukcióval vizsgáltuk. Az első 926 bázispárt tartalmazott a transzkripció start előtt, míg a másik csak 141-et (a pPd926/58 és a pPd141/32 plazmid promóter fragmentumát). A második promóter fragmentum megegyezett az *Ada2a/Rpb4* génnél vizsgált DNS darabbal, csak fordított orientációban építettük a lacZ gén elé.

A kísérlet eredményét a **8. ábra** foglalja össze. Mindkét konstrukciót tartalmazó transzgenikus törzsekből ötöt-ötöt vizsgáltunk. Az eredmény azt mutatta, hogy a *Dtl* promóter által meghajtott transzgén kifejeződik a kifejlett egyedek gonádjaiban, a vizsgált lárvák esetében a központi idegrendszerben, az epidermiszben, a Malpighi csövekben, az izmokban és szintén a gonádokban. A rövidebb promóter szakaszt tartalmazó transzgenikus legyek nyálmirigye és belei is mutattak festődést. Itt a kb. 1000 bázispáros promóter fragmentumot (d926/58) tartalmazó legyekben nem, vagy csak csekély mértékben tapasztaltunk β -galaktozidáz kifejeződést.

Az észlelt különbséget a hosszabb fragmentumon lévő esetleges gátló szövetspecifikus transzkripció faktor kötőhelyek okozhatják.



8. ábra

Az *Ada2a/Rpb4* promóter aktivitása lárvális és kifejlett légy szövetekben
 Egy kb. 170 bázispár (a104/69) hosszú *Ada2a/Rpb4* promóter szakaszt vizsgáltunk mint transzgént ecetmuslicában. A promóter fragmentumnak megfelelő β -galaktozidáz aktivitást az ábrán a szövetek kék elszíneződése mutatja.

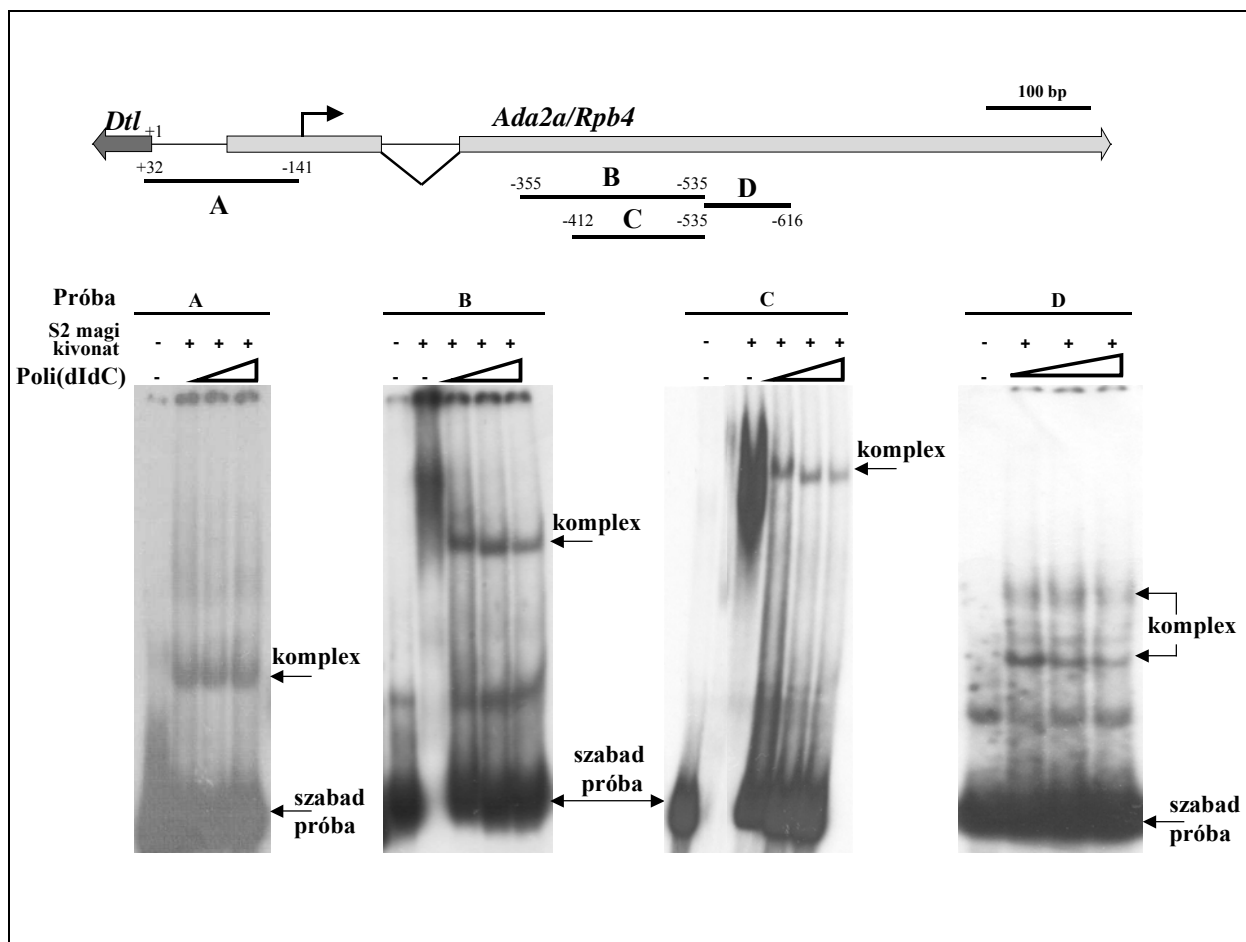
1.3. A két gén promóter régiójának *in vitro* analízise

Kíváncsiak voltunk, hogy a tapasztalt luciferáz aktivitásváltozásokat valóban valamilyen gátló vagy aktiváló faktor okozza-e, ezért *in vitro* kötési tesztben megvizsgáltuk a *Dtl* promóter régióját. Erre a legalkalmasabb módszernek a gélretardációs technikát találtuk. A technika lényege, hogy radioaktívan jelölt DNS fragmentum nem-denaturáló körülmények között lassabban fut, ha fehérje kapcsolódik hozzá. A kimutatásra poliakrilamid gélelektorforézist alkalmaztunk, és autoradiográfiával vizualizáltuk a ^{32}P -jelölt fragmentumok helyzetét. A gélretardációhoz Schneider S2 sejtmagi fehérjekivonatot használtunk.

Mint említettem, a szövettenyészetbeni kísérletekben a (-412)-(-616) közötti 204 bázispáros szakasz eltávolításával kb. 70%-os aktivitáscsökkenést tapasztaltunk. DNS-fehérje komplexeket mutattunk ki a (-355)-(-616)-os régióban (**9. ábra**), ahol a +1 a *Dtl* gén transzkripció startponját jelöli. Mivel a kötést nem tudtuk megszüntetni nonspecifikus DNS-sel (poly(dIdC)), ezért ezek a fehérjék szekvenciaspecifikusan kötődtek ebben a régióban.

Sikerült leszűkíteni (-412)-(-616)-ra azt a promóter szakaszt, ahol a fehérjék kötődnek (**9. ábra C és D fragmentum**). Ez az eredmény jól összevethető a luciferáz aktivitás változásokban tapasztaltakkal. A luciferáz riportergén kísérletekben a pPd616/58 és a pPd412/58 konstrukciók aktivitása között tapasztaltunk egy nagyfokú (kb. 70%-os) csökkenést. A pPd412/58 plazmidból a (-412)-(-616) promóterszakaszt távolítottuk el, így az itt *in vitro* körülmények között tapasztalt szekvenciaspecifikus fehérje-DNS komplexeknek bizonyára hatásuk van a promóter működésére. In silico analízis három különböző transzkripciós faktor kötőhelyet prediktált a kérdéses régióban, a Tramtrack 69K, a Fushi Tarazu és a Suppressor of Hairless transzkripciós faktorok kötőhelyeit.

A Tramtrack 69K transzkripciós represszor (96), míg a Fushi Tarazu és a Suppressor of Hairless (nevével ellentétben) aktivátor fehérjék (97)(98). A Tramtrack 69K egy represszor, a GAGA-aktivációt, valamint a test-szegmentációért felelős „pair-rule” géneket gátolja. A Fushi Tarazu a test-szegmentációban vesz résztvevő „pair-rule” gének egyike, az antennapedia-komplex tagja, a Suppressor of Hairless a Notch receptorral kapcsolódva fejt ki hatását. Ez utóbbi represszorfehérjéket aktivál, amelyek részt vesznek az idegrendszer, a szárny, a láb, a csáp és az izmok kialakulásában, valamint az oogenezisben. Feltételezésünk szerint a két aktivátor közül valamelyik, vagy mindkettő szerepet játszik a *Dtl* gén expressziójában.



9. ábra

Specifikus fehérjekötések a két gén promóter régiójában

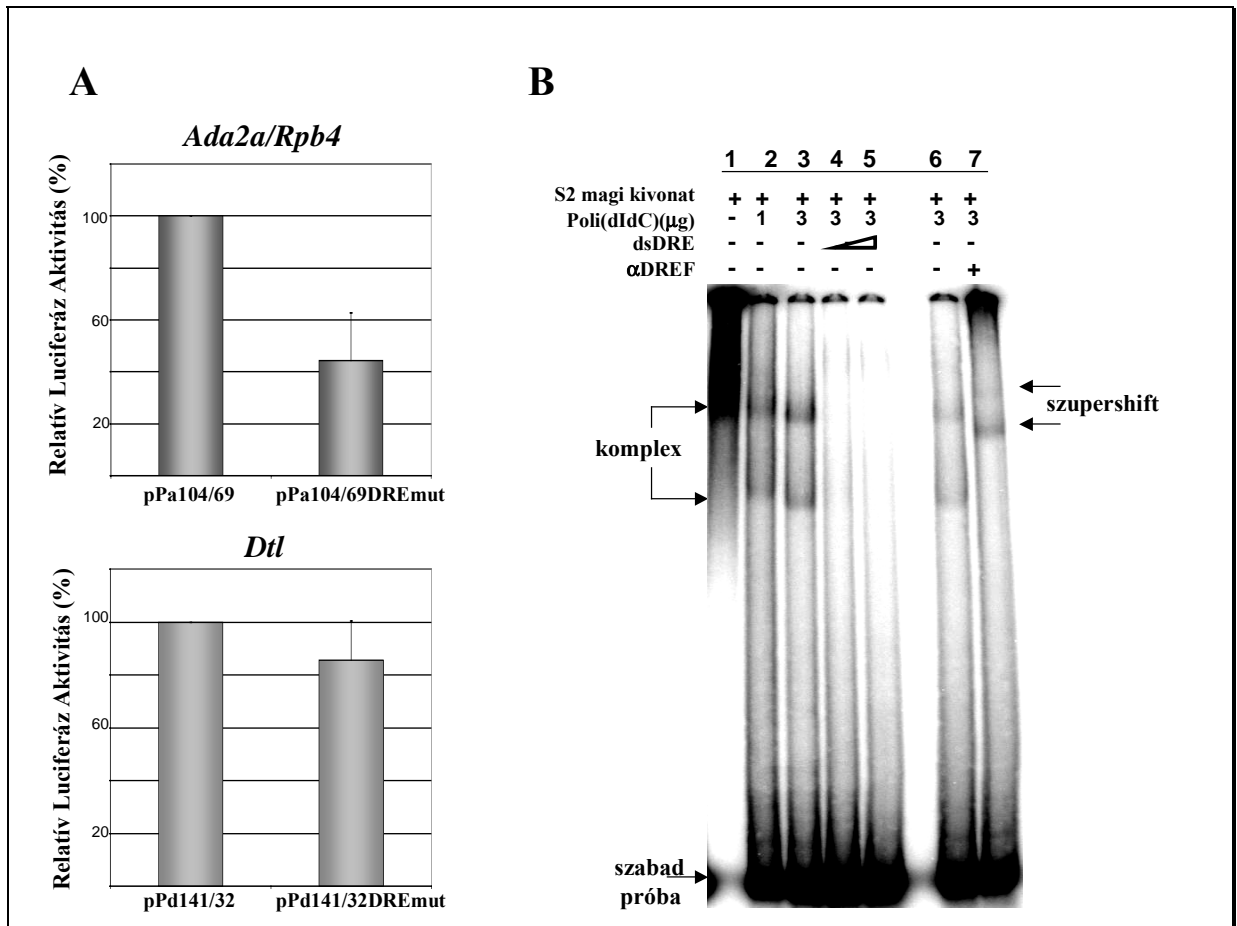
Gélretardációs technikával specifikus DNS-fehérje komplexeket detektáltunk az *Ada2a/Rpb4* és *Dtl* gén promóter régiójában. A sematikus rajzon a két gén egy részlete látható. Az A, B, C és D jelű próbák végpontjait a *Dtl* gén transzkripciós startpontjához viszonyítva adtam meg. A nyilak a detektált DNS-fehérje komplexeket, valamint a szabad próbák helyzetét mutatják. A háromszög a poli(dIdC)koncentráció növekedésének irányát jelzi (0,1; 0,3 és 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

1.4. Az *Ada2a/Rpb4* és a *Dtl* gén között egy működő DRE elem található

A gélretardációs kísérletekben specifikus fehérje kötődést figyeltünk meg az *Ada2a/Rpb4* és a *Dtl* gén közötti rövid szakaszon (9. ábra A fragmentum). Az *in silico* analízis egy DRE (DNA Replication-related Element) elemet prediktált a régióban. A DRE-t sejtosztódásban, és a DNS replikációban résztvevő fehérjék génjeinek promótereiben figyelték eddig meg, és a DREF fehérje (DRE binding Factor) kötődik hozzá. A DRE pontosan a két gén között található 72 bázispárnyi szakasz közepén helyezkedik el. Mivel ez egy palindrom elem, kérdéses volt, hogy a DRE mindkét, vagy csak az egyik gén esetén vesz részt a transzkripció szabályozásában, ha valóban részt vesz.

Először megvizsgáltuk, hogy a géletardációs kísérletben valóban a DRE elem okozza-e a hatást. Megpróbáltuk megszüntetni a már megfigyelt DNS-fehérje komplexet. Olyan nem jelölt, duplaszálú oligonukleotidot adtunk a rendszerbe, amely csak a DRE elemet tartalmazta. Azt tapasztaltuk, hogy a kötés megszűnt (**10. ábra B panel**), tehát a DRE elemet tartalmazó oligonukleotid leszorítja a jelölt próbát. Ez egy erős indikáció arra, hogy az észlelt kötést a DREF okozza.

Annak érdekében, hogy meggyőződjünk arról, hogy valóban a DREF felelős az észlelt DNS kötésért, poliklonális α -DREF ellenanyaggal szupershift kísérletet végeztünk. A retardált fragmentum mobilitása megváltozik – lassabb lesz, ha a hozzá kötődő fehérjéhez ellenanyag is kapcsolódik. Ilyen megváltozott mobilitású fragmentumot észleltünk akkor, ha a Schneider S2 sejtmagi kivonathoz α -DREF poliklonális ellenanyagot is adtunk (**10. ábra B panel**). Ez igazolta, hogy a géletardációt okozó fehérje, valóban a DREF.



10. ábra

Működő DRE elem a két gén promóter régiójában

A: A *Dtl* és *Ada2a/Rpb4* gén közötti DRE helyben létrehozott mutáció hatása a két gén átíródásának erősségére. A DRE hely a közepén található *ClaI* restrikciós hasítóhely feltöltésével elrontottuk. **B:** Gélretardáció a *d141/32* promóter fragmentumot használva (ez megegyezik az *a104/69* fragmentummal). A 2. és 3. sávban növekvő poli(*dIdC*) mellett DNS-fehérje komplex detektálható, amely DRE helyet tartalmazó duplaszálú oligonukleotid adásával eltűnik (4. sáv 1 pmol; 5. sáv 0,1 pmol). A komplex vándorlási sebessége α -DREF ellenanyag hozzáadásával megváltozik (7. sáv).

Luciferáz riportergén esszével próbáltuk bizonyítani, hogy a DRE elem funkcionálisan is részt vesz az *Ada2a/Rpb4* és a *Dtl* gén promóterének működésében. Abban a két konstrukcióban mutáltattuk a DRE helyet, amelyek ugyanazt a DNS szakaszt tartalmazták, csak míg az egyik az *Ada2a/Rpb4* irányában volt a luciferáz gén elé beültetve, a másik a *Dtl* irányában. A DRE hely tulajdonképpen egy *ClaI* hasítási hely egy-egy plusz bázispárral az elején és a végén (TATCGATA). Mi a *ClaI* hely közepére két bázispárt inszertáltunk, amelyről már leírták, hogy hatékonyan elrontja a DREF közvetítette aktivációt (99). A kísérlet azt mutatta (10. ábra A panel), hogy a mutáció mintegy 45%-os visszaesést jelentett az

Ada2a/Rpb4 irányú promóteraktivitásban, míg a *Dtl* irányban nem okozott szignifikáns változást.

Az eredmény meglepő volt, mivel a DRE elem a két gén között pontosan közepén helyezkedik el és szimmetrikus szekvencia. A két promóter között viszont van egy kis különbség. A *Dtl* gén promóterében a +6-tól –5-ig terjedő szakaszon van egy motívum, amely okozhatja a különbséget, de a tényleges mechanizmus még felderítésre vár.

2. Az *Ada2a/Rpb4* és *Dtl* gén RNS szintű szabályozása

A fehérjék keletkezését nem csak a transzkripció szintjének szabályozásával tudja egy sejt befolyásolni, hanem az őt kódoló mRNS szintjén is. A mRNS élettartamától függően eltérő mennyiségű fehérje keletkezhet. Különböző RNS degradációs mechanizmusok léteznek. Például, ha aberráns mRNS molekula képződik, akkor az úgynevezett „Nonsense-Mediated Decay” bontja le az RNS-t. Abban az esetben viszont, ha átfedő, ellentétes irányú RNS transzkriptumok léteznek, és ezek duplaszálú RNS-t formálnak, akkor az RNS interferencia folyamata felelős a megfelelő RNS-ek bontásáért.

2.1. Átfedő transzkriptumok a két génről

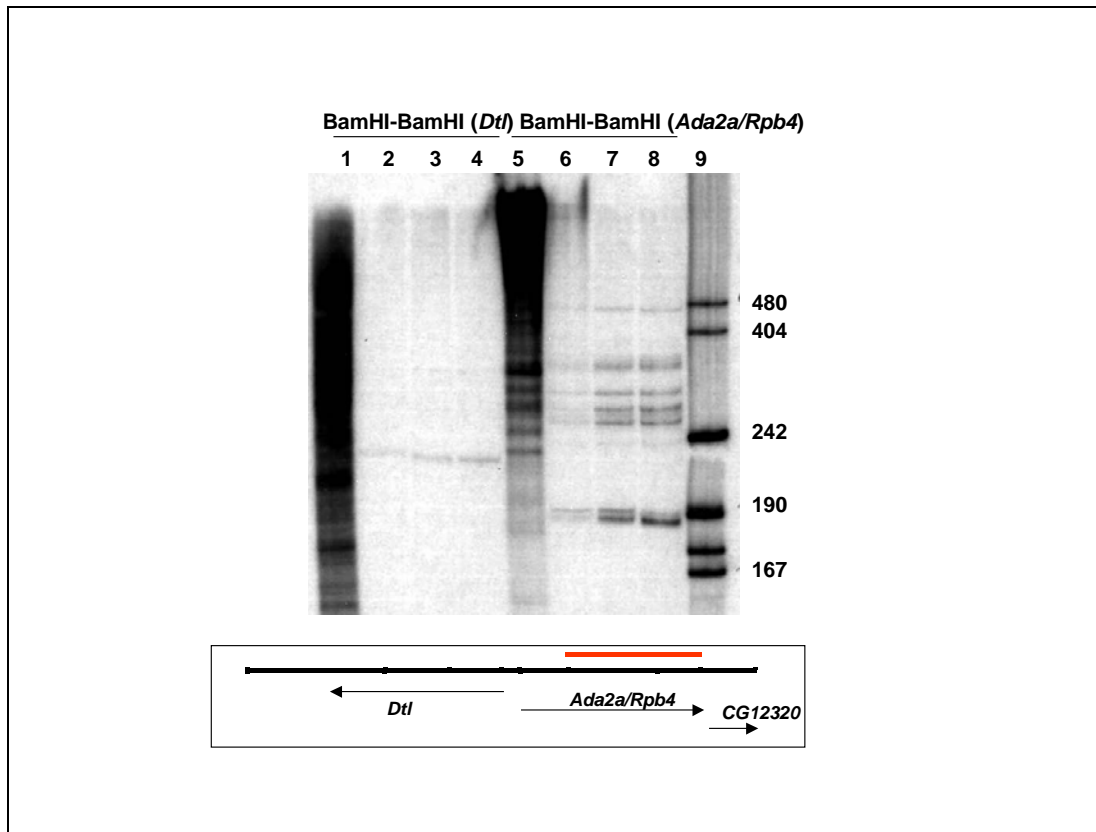
A *Dtl* génről induló primer extenziós kísérletekben megfigyeltük, hogy a már leírt transzkripció startponton kívül létezhet egy másik, távolabb lévő startpont is (**2. ábra b2**), mivel a transzkripció startponttól +103 bázispárra elhelyezkedő primerrel egy kb. 600 nukleotidos terméket is kaptunk. Ebből arra következtettünk, hogy létezhetnek átfedő RNS transzkriptumok a két gén régiójában.

RNáz protekciós kísérleteket végeztünk, hogy megbizonyosodjunk az átfedő RNS-ek létezéséről. A módszer lényege, hogy két olyan ribonukleázt használtunk (az RNáz A-t és RNáz T1-et), amelyek csak az egyesszálú RNS-eket képesek bontani, így ha olyan jelölt RNS-t adunk ecetmuslicából nyert totál RNS mintához, amelynek létezik a komplementere, akkor duplaszálú RNS-t képezvén rezisztens marad a ribonukleáz kezelésre, és denaturáló poliakrilamid gélben megfuttatva detektálható lesz. Azok a jelölt RNS-ek, amelyeknek nem létezik komplementer RNS-e a totál RNS mintában degradálódik, és nem lesz detektálható ilyen módon.

A két gén régiójából származó DNS fragmentumok mindkét száláról ³²P-jelölt RNS-t készítettünk, és próbaként használtuk az RNáz protekciós esszéiben. Ezzel a módszerrel

átfedő, ellentétes irányú transzkripciót detektáltunk az *Ada2a/Rpb4* gén (+850)-(+2795) szakaszán (**11. ábra**). Az *Ada2a/Rpb4* génnel ellentétes irányú transzkriptum mellett, a gén különböző exonjait is sikerült detektálnunk, ezzel megerősítve a módszer megbízhatóságát.

Az a tény, hogy átfedő, egymással ellentétes irányban átíródó RNS-eket detektáltunk, felveti a kérdést, hogy vajon létrejön-e duplaszálú RNS erről a régióról, mutat-e a régióról származó RNS specifikus degradációt és az RNS interferencia részt vesz-e a két gén szabályozásában.



11. ábra

RNáz védési kísérlet átfedő transzkriptumok detektálására

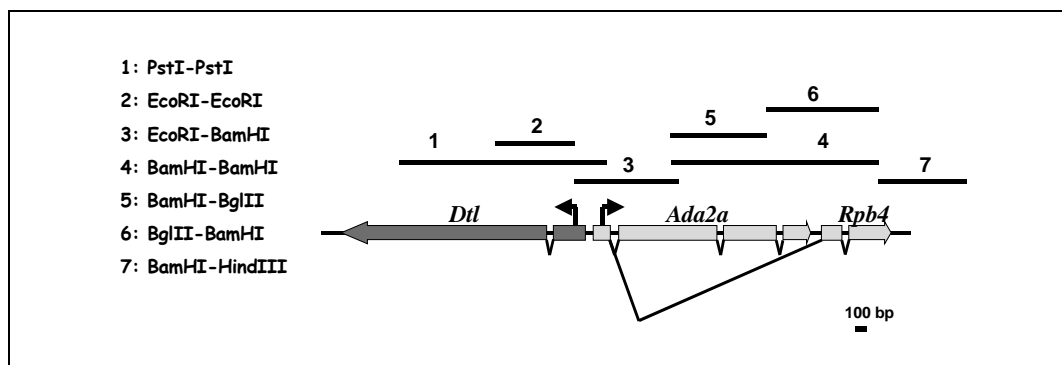
Az *Ada2a/Rpb4* génből származó BamHI-BamHI genomikus fragmentum mindkét száláról készült radioaktívan jelölt RNS-sel komplementer RNS-t detektáltunk. A jobb oldalon látható több termék az *ada2a* és az *rpb4* mRNS különböző exonjait reprezentálja. 1-4. sáv a BamHI-BamHI fragmentum *Dtl* irányban átíródott RNS-eket detektálja, 5-8. sáv a BamHI-BamHI fragmentum *Ada2a/Rpb4* irányban átíródott RNS-eket. 1. és 5. sáv: 0 $\mu\text{g/ml}$ RNáz A + 0 $\mu\text{g/ml}$ RNáz T1; 2. és 6. sáv: 2,5 $\mu\text{g/ml}$ RNáz A + 0,025 $\mu\text{g/ml}$ RNáz T1; 3. és 7. sáv: 5 $\mu\text{g/ml}$ RNáz A + 0,5 $\mu\text{g/ml}$ RNáz T1; 4. és 8. sáv: 10 $\mu\text{g/ml}$ RNáz A + 1 $\mu\text{g/ml}$ RNáz T1; 9. sáv molekulásúly kontroll.

2.2. A két génről képződött RNS-ek specifikus degradációja

RNáz protekciós kísérletekkel átfedő, egymással ellentétes irányban átíródó RNS-eket detektáltunk, ennél fogva megvizsgáltuk, hogy a régióról képződő RNS-ek mutatnak-e degradációt. A vizsgálatokat olyan *Drosophila melanogaster* embrió kivonatban végeztük, amelyből csak a sejtmembránt és egyéb törmelékeket távolítottuk el, tehát a fehérje-komplexek jelen voltak benne. A feltételezésünk az volt, hogy ha a régióról képződik duplaszálú RNS, akkor azt a Dicer nevű RNáz III típusú enzim 21-22 nukleotidos siRNS fragmentumokra bontja, az beépül a RISC effektor-komplexbe, amely a megfelelő mRNS-eket hasítja, és degradálja. Ennél fogva, ha a feltételezés igaz, a siRNS-ek által már „élesítődött” az RNS interferencia az embriókban, és az átfedő szakaszokról származó mRNS-ek degradálódni fognak. Ezáltal, ha mi kívülről egyesszálú RNS-t juttatunk a rendszerbe, az lebomlik abban az esetben, ha a duplaszálú RNS-sel megegyező a szekvenciája.

A hipotézisünk tesztelésére ^{32}P -jelölt *in vitro* szintetizált egyesszálú RNS-eket inkubáltunk embrió extraktumban, majd formaldehides agaróz-gélelektrofézissel vizsgáltuk. Kontrollnak a szomszédos génről átírt RNS-t használtuk, mivel ott RNáz protekciós kísérletekben átfedő transzkripciót nem detektálunk (az adatot nem mutatom), így feltételeztük, hogy ebben a kísérleti rendszerben intakt marad.

Az egyes szintetizált, radioaktívan jelölt RNS-eket a **12. ábra** foglalja össze. A két génről összesen 6 DNS fragmentumot választottunk, és a róluk átírt RNS-eket teszteltük. Azért választottunk szélesebb körből RNS-eket, mint ahol az átfedő transzkripciót tapasztaltuk, mert ha valóban lebomlik a megfelelő mRNS ebben a stádiumban, akkor a detektálásának is csekély a valószínűsége. Következésképpen a primerextenziós vagy a 5'RACE kísérletekben nem tudjuk detektálni.



12. ábra

In vitro RNS készítésére használt genomikus fragmentumok

Az *Ada2a/Rpb4* és a *Dtl* gén régiójából származó RNS-ek egy kivételével mind lebomlottak a kísérleti rendszerben, míg a kontroll RNS intakt maradt (**13. ábra A panel**). Bár az EcoRI-EcoRI fragmentumról átvitt RNS mennyisége is lecsökkent, ám míg a BamHI-BamHI fragmentumról származó RNS degradációja megbízhatóan reprodukálható volt a kísérleti rendszerünkben, az EcoRI-EcoRI RNS-ről ez már nem volt elmondható.

Az eredményből két dologra lehetett következtetni: 1. vagy a bomlást mutató RNS-ek valamilyen szerkezeti okból instabilak az embrió kivonatban és a *Dtl* génről származó EcoRI-EcoRI fragmentum stabilis a kontrollal együtt, 2. vagy a degradálódott RNS-eket egy nagy molekulásúlyú fehérje-komplex bontja, ami valamilyen szabályozási folyamatra utal. A kísérletben degradálódott RNS-ek (BamHI-BglII, BamHI-EcoRV és BamHI-EcoRI) az RNáz protekciós esszében átfedő transzkripciót mutató régióból és annak közvetlen környezetéből származnak.

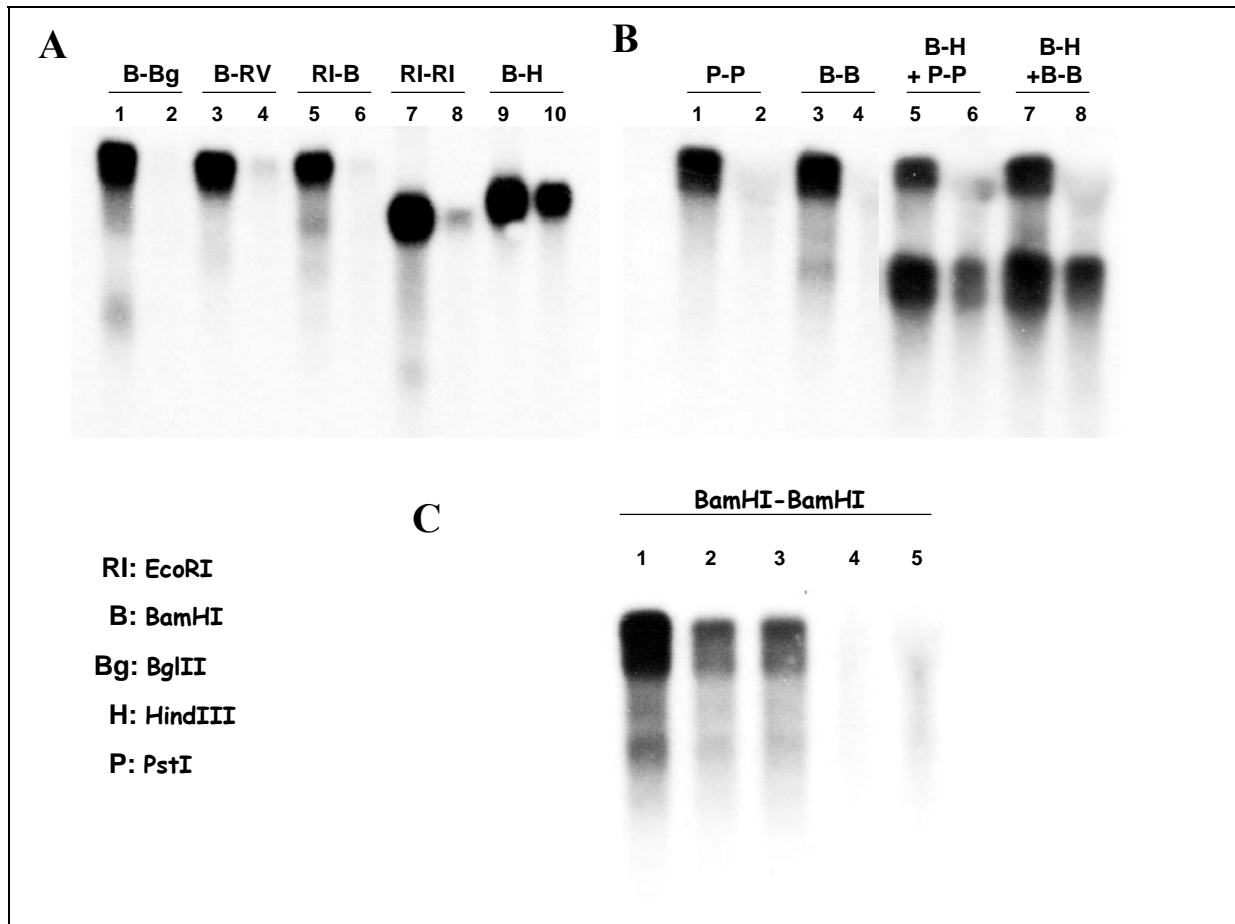
Annak bizonyítására, hogy a megfigyelt RNS bomlás specifikus, kevert mintákat teszteltünk. A két leghosszabb degradálódó RNS-t (PstI-PstI és BamHI-BamHI) összekevertük a kontroll RNS-sel, és így inkubáltuk az embrió kivonatban (**13. ábra B panel**). Az eredmény azt mutatta, hogy míg az előző kísérletben is instabilis RNS-ek degradálódtak, a kontroll intakt maradt. Így kizártuk, hogy az RNS bomlást valamilyen technikai problémái miatt észleltük volna.

Nyitott volt még a kérdés, hogy vajon a degradációt nonspecifikus ribonukleázok okozzák, vagy valamilyen nagy molekulásúlyú fehérje-komplex. A kérdés megválaszolásához egy olyan embrió kivonatot készítettünk, amelyet 100'000 g-vel üleptítettünk, így a felülúszóban nem voltak nagy molekulásúlyú fehérje-komplexek, csak a szolubilis nonspecifikus

ribonukleázok. Ebben az extraktumban inkubáltuk ezek után a legerősebb degradációt mutató BamHI-BamHI RNS-t (**13. ábra C panel**).

Miközben a nagy molekulatömegű fehérje-komplexeket is tartalmazó embrió kivonatban a BamHI-BamHI RNS lebomlott, abban az extraktumban, amelyben csak a szolubilis RNázok voltak, a jelölt RNS intakt maradt. Következésképpen a megfigyelt RNS instabilitást valamilyen enzim-komplex okozza.

Egyrészt, ha ugyanezt a jelölt RNS-t mint próbát használtuk RNáz protekciós esszében, átfedő transzkriptumokat detektáltunk, másfelől ez az RNS egy nagy molekulatömegű fehérje-komplex által degradációt szenved *Drosophila melanogaster* embrió kivonatban. Mivel a rendszerben olyan duplaszálú RNS is előfordulhat, amely erről a régióról keletkezik, és a templát DNS-en nincs semmilyen olyan szekvencia motívum amely más ismert RNS degradációs mechanizmust indítana be (pl. nonsense-mediated decay-t), valószínű, hogy az RNS interferencia felelős az észlelt RNS bomlásért.



13. ábra

RNS stabilitás

A: A *Dtl* és *Ada2a/Rpb4* gének régiójából származó genomikus fragmentekről *in vitro* átírt radioaktív RNS-ek stabilitását vizsgáltuk 18'000g-vel ülepitett *Drosophila melanogaster* embrió kivonatban. A 2., 4., 6., 8. és 10. minta 11 µl 0-6 órás embrió kivonatot tartalmazott + 1mM ATP + 1U RNasine (Fermentas), míg az 1., 3., 5., 7. és 9. minta nem tartalmazott embrió kivonatot. **B:** A bomló RNS mintákat összekevertük a stabil kontroll RNS-sel, és így vizsgáltuk az előbbi embrió extraktumban. Az 1., 3., 5. és 7. minta nem tartalmazott embrió lizátumot, míg a 2., 4., 6. és 8. minta tartalmazta az A részben is alkalmazott embrió kivonatot. **C:** 100'000 g-vel ülepitett embrió lizátumban a BamHI-BamHI fragmentum stabil volt. 1. sáv kontroll, nem tartalmazott embrió kivonatot, a 2. és 3. sávban 100'000 g-vel ülepitett embrió kivonatot, a 4. és 5. sávban 18'000 g -vel ülepitettet használtunk.

3. A *Dtl* gén funkcionális vizsgálata

Az *Ada2a/Rpb4* és a *Dtl* gén termékei közül a DTL fehérje funkciójára fókuszálok a dolgozat harmadik részében. Az ADA2a és RPB4 fehérjék funkcionális vizsgálatát mások végezték, én a DTL fehérje működésének vizsgálatában vettem részt.

3.1. Előzmények

A DTL fehérjének az adatbázisokban az élesztőtől a fonálférgeken át az emberig mindenhol megtalálható a homológja (**2. függelék**). A hasonlóság a fehérje C-terminális részére esik, ahol egy konzervált S-adenozil-metionin kötőhely található. A *Drosophila melanogaster* fehérjén végzett vizsgálataink közben más laboratóriumok leírták a humán és az élesztő homológját.

A humán homológot mint magi receptor koaktivátorral kölcsönható fehérjét írták le (100). A Peroxiszóma proliferátor-aktiválta receptor gamma (PPAR γ) egy transzkripciós faktor, amely több koaktivátor komplex-szel is kölcsönhat. A DTL humán homológja (PIMT-PRIP-Interacting protein with Methyltransferase domain) kölcsönhat a PRIP-pel (Peroxisome proliferators-activated Receptor (PPAR γ)-Interacting Protein), és így mint összekötő fehérjék funkcionálnak a PPAR γ két koaktivátor komplexe, a CBP/p300 és a PBP között (101).

Egy másik csoport a DTL élesztő homológját (TGS1) mint trimetil-guanozin cap szintetáz azonosította (102). A kis magi és nukleoláris RNS-ek egy részének rendhagyó a cap struktúrája, a monometil-guanozin helyett trimetil-guanozin található az 5' végükön. Ez szükséges a működésükhöz, ugyanis ha nincs trimetil-guanozin cap a snRNS végén, a funkciókat ellátó snRNP-k nem képesek összeszerelődni. A TGS1 a kis RNS-ek cap struktúrájának trimetilálásában vesz részt mint metiltransferáz. A humán DTL homológáról, a PIMT-ről is leírták ugyanezen funkciót, bár ők hTGS1-nek nevezték a fehérjét (103).

3.2. A *Dtl* gén inaktiválásának hatása

A fehérjék funkcióinak megértése irányába tett első lépés általában az, hogy megvizsgálják, hogyan reagál egy élő szervezet az adott fehérje hiányára. Szerencsénkre a *Drosophila melanogaster* az egyik legjobban jellemzett eukarióta modellszervezet, a genetikája jól ismert. Rengeteg mutáns törzs áll a kutatók rendelkezésére, így hiánymutáns állatot létrehozni viszonylag egyszerű. Léteznek olyan mutáns törzsek, amelyek P-elem inszerciókat hordoznak valamelyik kromoszómájukon.

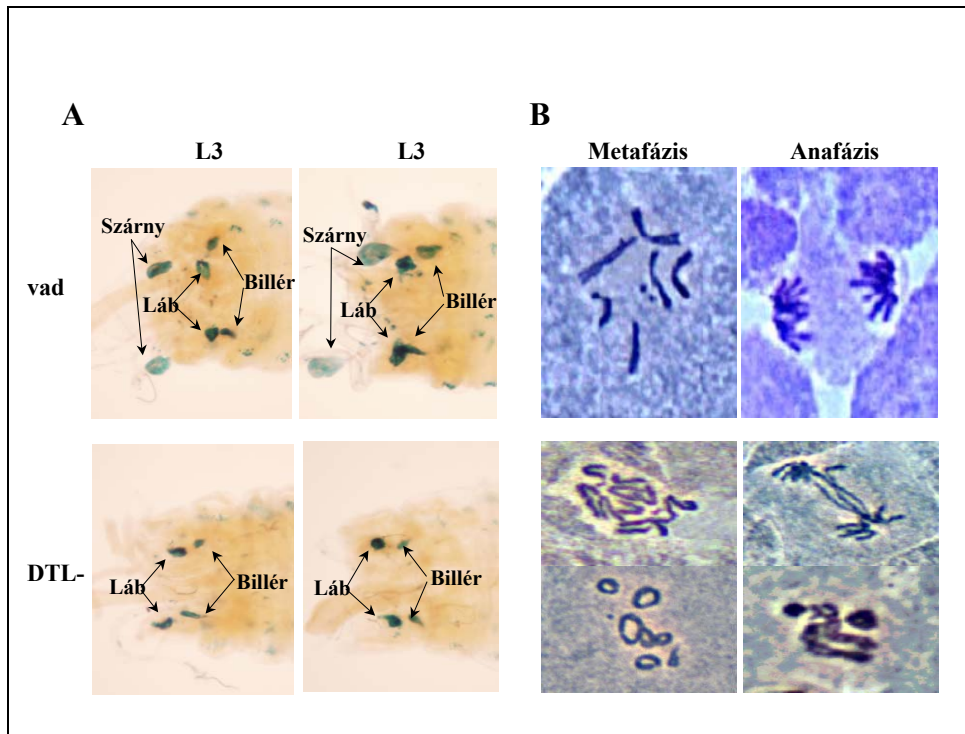
A helyzetünket megkönnyítette, hogy a Szegedi Törzsközpontban volt egy olyan törzs (I(3)S967/13), amelyben a P-elem a *Dtl* gén 5' nemtranszlálódó régiójában ült, az 5' végétől 35 bázispárra. Az inszerciónak, amely feltehetőleg *Dtl* mutációt okozott, letális fenotípusa volt. A P-elem remobilizálásával különböző deléciós mutánsokat hoztunk létre, és Southern hibridizációs technikával határoztuk meg a deléció nagyságát. Olyan törzseket választottunk ki, amelyekben a P-elem maradéktalanul eltávozott a *Dtl* 5' végéről, és kromoszómális DNS-t

is vitt magával. Így deléció keletkezett vagy csak a *Dtl* génben, vagy az *Ada2a/Rpb4* génben is.

Három olyan törzset választottunk, amelyek a fenti kritériumnak megfeleltek, az 58-as, a 192-es és a 189-es számút. Az 58-as és a 192-es jelűben a P-elem mobilizálásakor a *Dtl* génben képződött deléció, a 189-ben mindkét gén deléciót szenvedett. Az 58-as törzsben egy nagy deléció képződött, amely eltávolította az egész *Dtl* gént, viszont a deléció annyira nagy, hogy elképzelhető belenyúlik a szomszédos génbe is, amely kb. 10 kilobázispárra helyezkedik el a *Dtl*-től. A 192-es deléciós törzsben a deléciót izoláltuk PCR-ral, és szekvenálással megállapítottuk a pontos helyét és kiterjedését. Eszerint 772 bázispár hiányzik a *Dtl* génből, ami az annotált translációs startpont elvesztésével jár. A szekvencia elemzésekor kiderült, hogy a 192-es törzsben a deléciót szenvedett *Dtl* génről képződhet egy csonka fehérje, mivel a gén promotere sértetlen maradt, és található más ATG is a DTL fehérjét kódoló nyitott leolvasási keretben az eredeti ATG-hez képest downstream. Immunoblot kísérletben valóban detektáltunk egy keresztreagáló rövidebb fehérjét α -DTL poliklonális ellenanyaggal. A 189-es törzsben is megállapítottuk a deléció pontos helyét és kiterjedését. Itt 822 bázispár deletálódott, ami érintette mind a két gén promotér régióját, és az *Ada2a/Rpb4* első és második exonját. Ebben a törzsben nem keletkezik sem *Dtl* sem *Ada2a*, sem *Rpb4* mRNS.

Mindhárom deléciós törzs letális fenotípussal rendelkezik. Az 58-as és a 192-es mutáns légy az L2-L3 lárvális stádiumok közti átmenetben pusztul el, míg a 189-es L1 lárvális stádiumban. Mivel az 58 és 192 deléciós törzsek fenotípusa megegyezett, ezért úgy gondoltuk, hogy a 192-es törzsben sem működik a DTL fehérje, vagy legalábbis az a funkciója, amely a fenotípust okozza.

Mind a 192, mind az 58-as mutáns törzsben a lárvák imágókorongjai a vadtypushoz képest csökevényesek voltak. Ez a fenotípus fokozatosan alakult ki, a korai lárvális stádiumban még nem detektálható, de mire eléri az L3-as egyedfejlődési stádiumot az imágókorongok, amelyekből kialakulnak a felnőtt egyed szervei, elsovadnak. Mindemellett a központi idegrendszerükben mitotikus rendellenességeket tapasztaltunk. Az osztódó sejtekben a kromoszómák összeragadtak, anafázis során lemaradó kromoszómákat és kromoszóma hidakat észleltünk. Ennek következtében politén sejtek is kialakultak, túlkondenzált kromoszómákkal, ami mitotikus gátlásra utal (**14. ábra**).



14. ábra

***Drosophila melanogaster* DTL hiányos fenotípusa**

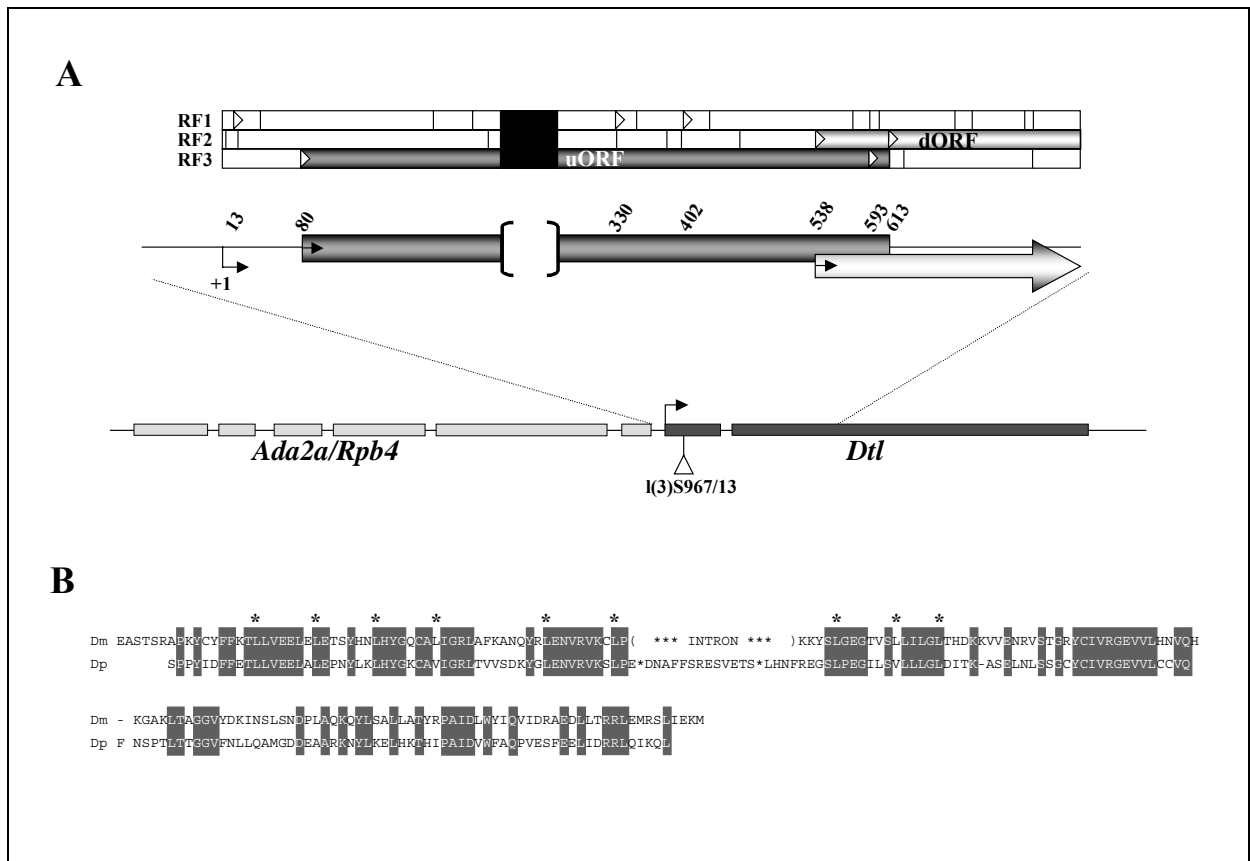
A: L3 lárvális fejlődési stádiumban a DTL hiányos állatok (192-es törzs) imágókorongja elcsökevényesedik. **B:** Az L3-as lárvák agyi preparátumában mitotikus rendellenességek észlelhetők. A metafázisban összetapadt, gyűrű alakú kromoszómák láthatók, míg anafázisban kromoszóma hidak, lemaradó, valamint túlkondenzálódott kromoszómák figyelhetők meg.

Abban az esetben, ha a *Dtl* gént mint transzgént visszajuttatjuk a mutáns törzsbe (menekítés), a vad típusú *Drosophila melanogaster*re jellemző fenotípus visszaáll. Ez bizonyítja, hogy az észlelt DTL- fenotípust csak a *Dtl* gén mutációja okozza, és nem a P-elem mobilizálásakor keletkező esetleges másik mutáció. Így megállapítottuk, hogy a DTL fehérje hiánya letális, mégpedig az L2-L3 lárvális stádiumok közti átmenetkor pusztulnak el a mutáns legyek. A 189-es mutáns törzs felhasználásával menekítéssel kíséreltek kimutatni, hogy az ADA2a fehérje hiánya korai bábállapotban az állatok pusztulásához vezet, míg az RPB4 hiánya már L1-es lárvastádiumban letális.

3.3. A DTL fehérje funkciójához az 5' nemtranszlálódó régió is szükséges

A *Drosophila* Genom Annotációs programban a *Dtl* gént egy meglehetősen hosszú, 597 bázispáros 5' nemtranszlálódó régióval írták le. Ebben a régióban is található egy nyitott leolvasási keret, amelyik belenyúlik a DTL fehérjét kódoló nyitott leolvasási keretbe, és egy 179 aminosavból álló potenciális polipeptidet kódol (DTLu) (15. ábra A panel). Bár ennek a

polipeptidnek az adatbázisokban csak a *Drosophila pseudoobscura*-ban találtunk homológiát, azonban tartalmaz funkcionális domént (15. ábra B panel), egy leucin-cippzár motívumot, így nem zárhatjuk ki a valószerűségét, hogy ez a fehérje létezik, és sejtfunkcióval is rendelkezik. Ennek fényében indokoltnak találtuk, hogy megvizsgáljuk a *Dtl* gén melyik terméke okozza a mutáns fenotípust.



15. ábra

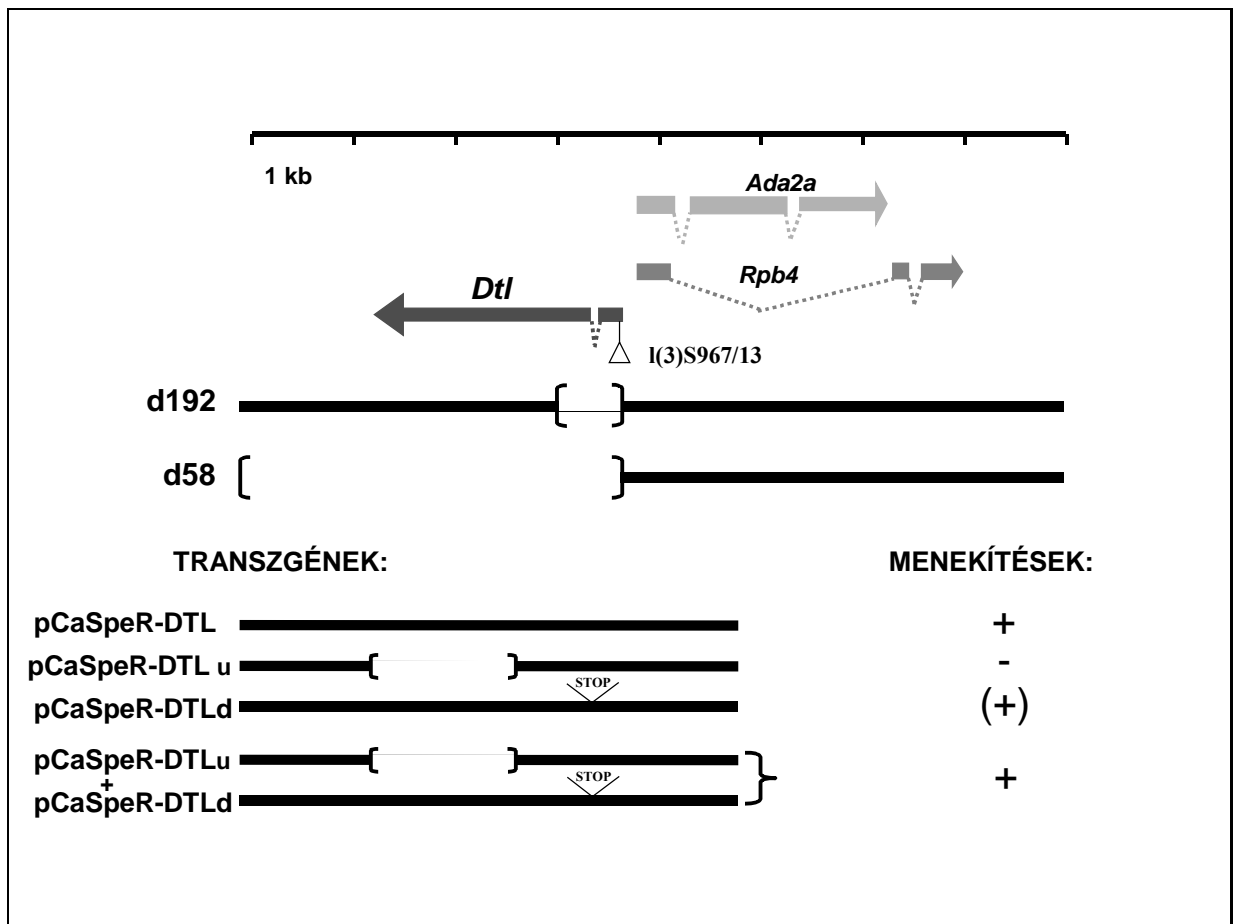
A *Dtl* génről potenciálisan két fehérje képződhet

A: A sematikus rajzon alul a *Dtl* és *Ada2a/Rpb4* gén szerkezete, a felső kinagyított részen a *Dtl* gén első ORF-ének három nyitott leolvasási kerete (ORF) látható, valamint a két ORF átfedő régiója. A háromszögek az ATG kodonokat, a számok az ATG pozícióját a transzkripciós startponthoz viszonyítva, a vonalak a stop kodonokat jelzik. **B:** A DTLu és *Drosophila pseudoobscura* homológiájának összehasonlítása. A csillagok a leucinokat jelzik a leucin-cippzár motívumban.

Mint korábban említettem, ha a *Dtl*-t mint transzgént visszajuttatjuk a 192-es mutáns törzsbe, a vad-típusra jellemző fenotípus visszaáll. Olyan menekítő transzgén-konstrukciókat készítettünk, amelyekben vagy a *Dtl* gén első nyitott leolvasási keretét rontottuk el (pCaSpeR-DTLd), vagy a DTL-t kódoló másodikat (pCaSpeR-DTLu). A pCaSpeR-DTLd esetében az

első ORF-et megszakítottuk stop kódokat tartalmazó adapterrel az ATG után 480 bázispárral, így az csak a második ORF-et tartalmazta, a pCaSpeR-DTLu-nál deletáltunk közel ezer bázispárnyi részt a második ORF-ből, így az csak az első ORF-et tartalmazta (**16.ábra**). Abban az esetben, ha az első nyitott leolvasási kerettel (DTLu) menekítettük a 192-es mutánst, a mutáns fenotípus kissé eltolódott, ha a másodikkal (DTLd), akkor az eredeti fenotípus megváltozott. Az első ORF hiányában az állatok egyedfejlődése a bábállapotig is elért, de a bábokból már nem voltak képesek kikelni. A két konstrukciót ha együtt juttattuk a 192 mutáns állatokba, akkor a vad típusra jellemző fenotípus tökéletesen helyreállt.

Tekintettel arra, hogy a *Dtl* gén két nyitott leolvasási keretéből származó polipeptidek külön-külön nem voltak képesek menekíteni a DTL-fenotípust, logikusnak tűnik a megállapítás, hogy mindkét géntermékre szükség van az *ecetmuslica* egyedfejlődésekor.



16. ábra

A DTL hiányos fenotípus menekítésére használt transzgenikus konstrukciók

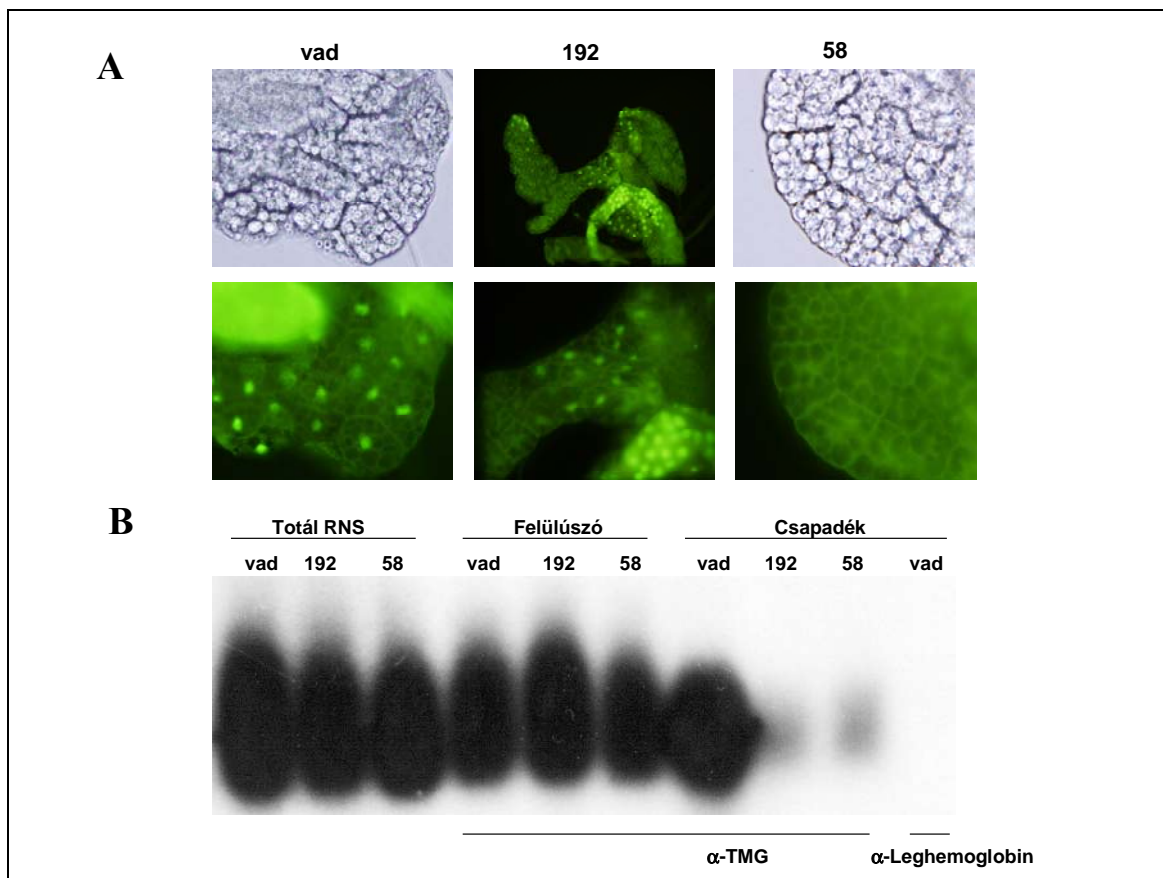
A felső részen a sematikus rajz a két deléció elhelyezkedését mutatja zárójellel közbezárván. Az alsó felében a menekítésre használt genomikus fragmentumok láthatók. A zárójel deléciót jelent, a stop jelzés helyére egy mindhárom leolvasási keretben stop kódot tartalmazó 14 bázispár hosszú adaptert építettünk. A menekítő transzgenikus konstrukciónál a + a teljes menekítést, a (+) a részleges menekítést, a – jel kis vagy semmilyen mértékű menekítést jelent.

3.4. A DTL részt vesz a kis RNS-ek érésében

A kis magi és nukleoláris RNS-ek érésük során több változáson mennek keresztül. Egy részük 5' végi cap struktúrája további metiláción esik át, és 2,2,7-trimetil-guanozin nukleotid lesz az 5' végükön. Mouaikel és szerzőtársai (102) az élesztő, és később a humán DTL homológáról leírták, hogy a kis RNS-ek trimetilációjáért felelős fehérjék. Indokoltnak tartottuk, hogy megvizsgáljuk, a DTL vajon szerepet játszik-e ebben a folyamatban.

Első lépésben a vad típusú és a *Dtl* mutáns lárvákat hasonlítottunk össze monoklonális 2,2,7-trimetil-guanozin ellenes ellenanyaggal. A lárvák zsírtestében a sejtmagok festődnek immunhisztokémiai reakcióban, mivel a kis magi és nukleoláris RNS-ek ott helyezkednek el.

A vadtípusú lárvák sejtmagjai szépen festődtek, míg a *Dtl* mutáns lárvák sejtmagjai csak alig, vagy egyáltalán nem (17.ábra A panel). A 192-es törzsben néhány sejtmag még mutat festődést az ellenanyaggal, az 58-as törzsnél viszont a sejtmagok egyáltalán nem festődnek. A két törzs közötti festődésben mutatkozó különbséget az okozhatja, hogy a 192-es törzsben keletkező csonka fehérje még valamennyire el tudja látni a feladatát, így a trimetil-guanozin cap-et tartalmazó kis RNS-ek később tűnnek el a sejtmagokból, de okozhatja az is, hogy a 192-es lárvák még valamivel fiatalabbak lehettek, és azért van még trimetil-guanozin cap-et tartalmazó kis RNS a zsírtest sejtmagvaiban.



17. ábra

A DTL fehérje részt vesz a kis RNS-ek érésében

A: α -TMG ellenanyaggal L3 lárvális stádiumú lárvák sejtmagjainak immunhisztokémiai festődése látható. A trimetil-guanozin cap tartalmú RNS-ek zölden festődnek. B: Oregon R és a két mutáns törzsből készített RNS mintákon α -TMG ellenanyaggal immunprecipitációt végeztünk, és a kis RNS-eket U1, U2, U4, U5 és U6 specifikus próbával Northern hibridizációval detektáltuk. Kontrollként burgonya leghemoglobin ellenanyagot használtunk.

Kíváncsiak voltunk, hogy vajon ez a fenotipikus változás csak a zsírtestre korlátozódik-e, vagy megfigyelhető minden szövetben. Ezért immunoprecipitációt végeztünk a 2,2,7-trimetil-

guanozin ellenes ellenanyaggal, majd Northern hibridizációval megvizsgáltuk, hogy az így kicsapott trimetil-guanozin tartalmú RNS-ek között képviseltetik-e magukat a különböző kis RNS-ek (**17.ábra B panel**). Próbának U1, U2, U4, U5 és U6 cDNS-eket használtunk. Azt tapasztaltuk, hogy míg a vad típusú lárvákból nagymennyiségű trimetil-guanozin cap végű snRNS-t tudtunk kimutatni, addig a 192-es és az 58-as mutáns lárvákból csak elenyésző mennyiségűt. Az eredmény arra enged következtetni, hogy a DTL fehérje hiányában 2,2,7-trimetil-guanozin cap 5' végű kis RNS-ek nem képződnek a mutáns állatokban. Az általunk detektált kis mennyiség valószínűleg még anyai eredetű, ugyanis a *Drosophila melanogaster* nőténye a petékbe a tápanyagok mellett nagy mennyiségű RNS-t is juttat.

F, Diszkusszió

Dolgozatomban a *Drosophila melanogaster* 90F9-11-es citológiai régiójában található két gént vizsgáltuk. A gének szerkezetét, szabályozását és az egyik gén termékének funkcióját próbáltuk felderíteni. A munka kezdetekor még nem azonosították egyik gént sem, így nekünk adatott meg a lehetőség erre. Sikerült megállapítanunk mindkét gén pontos elhelyezkedését és exon-intron struktúráját. Homológiák alapján elneveztük a két gént, az egyiket *Dtl*-nek, a másikat *Ada2a/Rpb4*-nek. Az *Ada2a/Rpb4* génről megállapítottuk, hogy alternatív éréssel két mRNS képződik róla, míg a *Dtl* gén két nyitott leolvasási keretet tartalmaz. Szövettenyészetben végzett kísérletekkel és transzgenikus legyek felhasználásával megtettük a kezdeti lépéseket a cisz szabályozó elemek felderítésében. RNS stabilitási kísérleteink arra utalnak, hogy a két gén szabályozása RNS szinten is megvalósul. Mutáns ecetmuslicák felhasználásával meghatároztuk a *Dtl* gén hiánymutánsának fenotípusát, és bizonyítottuk, hogy ezt a fenotípust mindkét nyitott leolvasási keretről képződő polipeptid hiánya okozza. Végül bizonyítottuk, hogy a DTL fehérje szerepet játszik a kis RNS-ek érésében.

A *Drosophila melanogaster* genomszekvenciájának megfejtése befejeződött, így hozzájuthattunk pontos szekvenciális adatokhoz. A csupasz DNS bázispár-sorrenden prediktálták, hogy hol helyezkednek el az egyes gének, és azoknak mi a funkciójuk. A gének elhelyezkedését a róluk képződő mRNS-ek alapján határozták meg. A mRNS-ről reverz-transzkripcióval cDNS-t készítettek és behatárolták a genomi DNS-en való elhelyezkedését. Így meglehetősen pontosan meg tudták határozni egy gén exon-intron szerkezetét, és 3' végét. A transzkripció startpont meghatározása már nem ilyen egyszerű, ugyanis a cDNS-eket általában a mRNS 3' végéről a poliA farokról indítva szintetizálják, és így fennáll a veszélye, hogy a mRNS instabilitása miatt csonka, az 5' végén hiányos cDNS-t kapnak. Ezért döntöttünk úgy, hogy 5'RACE-szel meghatározzuk a két gén pontos 5' végét. Természetesen a transzkripció kezdőpont ismerete elengedhetetlen a promóter analízishez.

Az *Ada2a/Rpb4* génről képződő két mRNS-nek ugyanott kezdődik a transzkripciója. Ez azt jelenti, hogy a két mRNS ugyanarról a promóterról íródik át, egy pre-mRNS-ből képződnek alternatív éréssel. A két fehérje közös szabályozódásának ellentmond, hogy mint az 4. ábrán is látszik, különböző egyedfejlődési stádiumokban a génexpresszióban különbségek

mutatkoznak. Mivel ez már mRNS szinten is megmutatkozik, feltehető, hogy vagy a mRNS érésében van eltérés, vagy egyik vagy másik mRNS egyes egyedfejlődési stádiumban instabil.

A két gén pontos elhelyezkedésének térképezésekor megállapítottuk, hogy az 5' végük csupán 73 bázispárra van egymástól. Egyes megállapítások szerint egy átlagos *Drosophila melanogaster* promóter 70-80 bázispár kiterjedésű (93), míg mások ezt több mint száz bázispárra teszik (1). A két gén meglehetősen közeli elhelyezkedése felveti annak a lehetőségét, hogy a promóterek részben, vagy teljesen átfednek. Az is elképzelhető, hogy egyes regulátor szakaszok a másik gén kódoló régiójában foglalnak helyet.

Az *Ada2a/Rpb4 in vivo* promóter analízise azt mutatta, hogy a transzkripció iniciációjához szükséges promóter elemek egy rövid, 79 bázispáros szakaszon vannak. Schneider S2 sejtekben szövetspecifikus transzkripciós faktorokat nem tudunk detektálni, mivel ez egy embrionális eredetű sejttenyészet, a kifejlett egyedekben tapasztalható szövetspecifikus génkifejeződés itt nem érvényesül. Ezért ebben a rendszerben csak a transzkripció erősségét befolyásoló általános faktorok, és az embrióban is működő transzkripciós faktorok hatását lehet kimutatni. *In silico* analízis számos kötőhelyet jósolt a vizsgált promóter régióra, de számottevő hatása egynek sem volt. Az egyedüli aktivitásnövekedés a (-640)-(-500)-ig tartó szakasz kiejtésével volt tapasztalható, itt egy Hairy kötőhelyet prediktált a program, de ez is csak mintegy másfélszeres aktivitásnövekedést eredményezett. A Hairy egy „pair-rule” gén, az ecetmuslica test szegmentációjának kialakításában vesz részt (104). Már ez a tény is ellene szól annak, hogy részt vesz vagy az ADA2a vagy az RPB4 expressziójának szabályozásában, hiszen az egyik egy transzkripciós koaktivátor, míg a másik az RNS polimeráz II alegysége. Ezt a feltételezést megerősítette, hogy egy 2004 júliusában közölt tanulmányban Hairy célgéneket azonosítottak, és az *Ada2a/Rpb4* gén nem volt köztük (105).

Transzgenikus legyekben az *Ada2a/Rpb4* promóter mutat szövetspecifikus expressziót, ugyanis lárvákban csak az agyban, a herében és az imágó korongokban észleltünk promóter működésre utaló β -galaktozidáz expressziót, míg a kifejlett egyedeknek csak a gonádjai festődtek. A transzgenikus állatok létrehozására a második legrövidebb promóter fragmentumot használtuk (a104/69), hiszen a szövettényészetben itt is hasonló jelet kaptunk, mint a leghosszabb (a1063/69) esetén. Így arra következtettünk, hogy ezen a rövid szakaszon megtalálhatók a gén kifejeződéséhez szükséges cisz elemek. Mivel az ADA2a egy általános koaktivátor, és az RPB4 az RNS polimeráz II alegysége, valószínű, hogy az észlelt génkifejeződés más szövetspecifikus enhancerek hiányában jöhetett létre. Az eredmény viszont megerősíti, hogy a vizsgált promóter fragmentumon megtalálhatók a transzkripció iniciációjához szükséges alap-promóter elemek.

A *Dtl* gén promóterét Schneider S2 sejtekben analizálva megállapítottuk, hogy a vizsgált promóter szakaszon a transzkripció erősségét jelentősen befolyásoló cisz elem(ek) található(k). Ezen elem, vagy elemek helyzetét luciferáz riportergén esszével a transzkripció startponttól számított (-412)-(-616)-os promóter szakaszra lokalizáltuk. Mivel a további rövidítések már nem hoztak aktivitáscsökkenést vagy növekedést, ezért azt feltételezzük, hogy a vizsgált promóter fragmentumon más olyan cisz elem nem található, amely hatással van a *Dtl* gén expressziójára. A szabályozó cisz elem(ek) az *Ada2a/Rpb4* gén kódoló régiójában található(k), nem pedig intronban. Az exonokban található enhancer szekvenciák általában az RNS érésben vesznek részt, és nem a transzkripció erősségének szabályozásában (106).

Természetesen a *Dtl* gén promóterét is megvizsgáltuk transzgenikus ecetmuslicák segítségével, itt két promóter szakaszt is vizsgáltunk (d926/58 és d141/32). Az eredmény azt mutatta, hogy hasonlóan az *Ada2a/Rpb4* promóternél tapasztaltakkal, itt is limitált szöveti kifejeződést észleltünk, bár ez sokkal szélesebb körű volt, mint az *Ada2a/Rpb4* esetében. Különbség mutatkozott viszont a vizsgált két promóter szakasz között. A hosszabb fragmentum (d926/32) nem mutatott olyan kifejezett expressziót a lárvák nyálmirigyében és belében. Az észlelt különbség oka lehet, hogy a hosszabb promóter fragmentumon elhelyezkedhet olyan cisz elem, amely ezekben a szövetekben fejt ki represszálo hatását.

A Schneider S2 sejtekben tapasztaltak alapján azt feltételeztük, hogy a *Dtl* gén szabályozó régiója belenyúlik az *Ada2a/Rpb4* gén kódoló régiójába. Ezt a feltételezést próbáltuk alátámasztani *in vitro* DNS-fehérje kötési vizsgálatokkal, amely megerősítette, hogy a (-412)-(-616)-os promóter szakaszhoz specifikus DNS-kötő fehérjék kapcsolódnak. A régiót felbontva a (-412)-(-535)-ig terjedő, valamint a (-535)-(-616)-ig terjedő szakaszon fehérje kötésre utaló, megváltozott mobilitású fragmentumokat észleltünk. Ezen a szakaszon *in silico* vizsgálatok három transzkripció faktor kötőhelyet jósoltak, a Tramtrack, a Fushi Tarazu és a Suppressor of Hairless fehérjékét. A Tramtrack 69K transzkripció represszor, míg a Fushi Tarazu és a Suppressor of Hairless aktivátor fehérjék. A Tramtrack 69K egy represszor, a test-szegmentációért felelős „pair-rule” géneket gátolja (96), valamint a GAGA-aktivációt (107). A Fushi Tarazu a test-szegmentációban résztvevő „pair-rule” gének egyike (97), az antennapedia-komplex tagja. A Suppressor of Hairless a Notch receptorral kapcsolódva fejt ki hatását (98). Ez represszorfehérjéket aktivál, amelyek részt vesznek az idegrendszer, a szárny, a láb, a csáp és az izmok kialakulásában, valamint az oogenezisben. A *Dtl* nem „pair-rule” gén, és a promóter régiójában nem található sem GAGA kötőhely, sem CSL transzkripció faktor kötőhely, amelyhez kapcsolódva fejt ki a Notch receptor a hatását (108). Az *in silico* módszerrel azonosított faktorok *Dtl* gén expressziójában játszott szerepe még nem tisztázott.

Specifikus DNS-fehérje komplexet detektáltunk EMSA-val a két gén transzkripció startpontja közötti szakaszon (a104/64 illetve d1441/32). Ezen a rövid 73 bázispáros szakaszon két konzervált alap promóter elem, valamint egy szövetspecifikus transzkripció faktor kötőhely (E74A) található. Az alap promóter elem egyike a DRE (DNA Replication-related Element), a másik egy nemrég azonosított elem, a szekvenciája: TGGTCACACTA (1). A DRE elemet a sejtproliferációban és a DNS replikációjában szerepet játszó fehérjék génjeinek promóterében mutatták ki, a DREF fehérje kötődik hozzá (109). Egyre inkább úgy tűnik, hogy a DRE által szabályozott gének csoportja számosabb (1).

A luciferáz riportergén esszé alapján az E74A transzkripció faktor valószínűleg nem játszik szerepet az *Ada2a/Rpb4* gén kifejeződésében Schneider S2 sejtekben, mivel a pPa80/69-es konstrukció, ahol az E74A kötőhelyet deletáltuk, ugyanolyan aktivitást mutatott, mint a hosszabb pPa104/69 konstrukció. Szintetikus duplaszálú oligó, és α -DREF ellenanyag segítségével bizonyítottuk, hogy a DNS-fehérje kölcsönhatásért DRE elem a felelős. DRE mutáns promóterszekvenciát tartalmazó konstrukciókkal kimutattuk, hogy a DRE elem szerepet játszik az *Ada2a/Rpb4* gén expressziójában, miközben a *Dtl* expressziója a mutáció hatására nem változott. A mutáció hatására az *Ada2a/Rpb4* kifejeződése nem szűnt meg, de megközelítőleg 60%-kal csökkent. A DRE szekvencia mutáltatásával hozzánk hasonlóan mások is azt kapták, hogy nem teljesen szűnik meg a promóter aktivitás, ha a ClaI hely közepén két plusz bázispárt építenek be, csak jelentősen visszaesik, 34%-ra (110), 14%-ra (111), valamint 6%-ra (112). Ugyanez a mutáció *in vivo* kísérletekben hatástalan. Ehhez a mutáns szekvenciához is kötődik a DREF fehérje, csak gyengébben (111), és ez lehet az oka, hogy az aktivitás csökken, de nem szűnik meg. A harmadik elem (TGGTCACACTA) szerepe a két gén kifejeződésében még nem tisztázott.

RNáz protekciós vizsgálatokkal az *Ada2a/Rpb4* gén utolsó négy exonját tartalmazó genomikus régióban ellentétes irányú, átfedő RNS transzkriptumot detektáltunk, valamint erről a régióról *in vitro* transzkripcióval átírt radioaktív RNS specifikus bomlást mutatott. A további vizsgálatok kiderítették, hogy a bomlásért egy nagy molekulatömegű enzim-komplex a felelős, ugyanis a 100'000 g-vel ülepített embrió kivonat felülúszójában már csak a szolubilis RNázok vannak jelen. Az RNS interferencia effektor molekulája, a RISC komplex sincs jelen az így kapott felülúszóban(114). Két olyan RNS degradációs folyamat okolható a megfigyelt jelenségért, ahol ilyen nagy molekulatömegű enzim-komplexek végzik az RNS bontását, ez a Nonsense-mediated Decay (NMD) és az RNS interferencia. Az RNS interferenciára az a tény terelte gyanút, hogy a régióról duplaszálú RNS is képződhet az átfedő transzkripció révén, és a kísérletekhez használt *Drosophila melanogaster* embrió

kivonatról bizonyították, hogy benne az RNS interferencia lejátszódik (113). Az NMD-ről leírták, hogy az aktiválódásához szükséges, hogy az Exon-junction komplex (EJC) a normálistól eltérő pozícióban legyen a mRNS-en (71). Ha a mRNS-en nincs EJC, rezisztens lesz az NMD-vel szemben (115). Mivel az embrió lizátum citoplazmatikus volt, és az EJC a sejtmagban kapcsolódik az exon-exon határokhoz, így a vizsgált radioaktív RNS-ekhez nem kapcsolódhatott, így a megfigyelt bomlást valószínűleg nem a Nonsense-mediated Decay okozza.

Meg kell jegyeznem, hogy az átfedő transzkriptumokat tartalmazó genomikus szakaszon kívül egy másik régióból származó RNS is instabil volt a kísérleti rendszerünkben, a PstI-PstI RNS. Ez az instabilitás eredhet abból, hogy ezen a szakaszon is létezik átfedő transzkripció, bár ezt nem tudtuk detektálni. Ennek oka lehet, hogy mivel az RNS instabil, a komplementer RNS-e is az, így a kimutatására használt módszer nem volt elég érzékeny, hogy esetlegesen nagyon kis mennyiségben jelen levő RNS-t is detektálni tudjunk.

Egy ismeretlen funkcióval rendelkező fehérje, esetünkben a DTL fehérje szerepét vizsgálni nem könnyű feladat. Két úton próbáltunk meg elindulni. Egyik, hogy más organizmusokban fellelhető homológjainak funkciója, vagy feltételezett funkciója alapján próbáltunk következtetni az *ecetmuslica* fehérje szerepére, másik, hogy hiánymutáns állatok fenotípusából teszünk kísérletek a DTL működésének felderítésére. Az adatbázisokban számos organizmusban található DTL rokon fehérje, az élesztőtől az emberig. Ezek a fehérjék nagyban különböznek méretben, míg az élesztő homológ 315 aminosav hosszú, addig a humán fehérje eléri a 853 aminosav hosszúságot. A homológia egyetlen konzervált régióra korlátozódik a fehérjék C-terminális részén, máshol nagy variabilitás tapasztalható. Ez a konzervált régió egy RNS-metiltransferáz domén. A DTL fehérje funkciójának meghatározása közben az élesztő és humán homológját mint trimetil-guanozin cap szintetázát azonosították (102). Egy másik csoport a humán homológot mint magi receptor koaktivátorral kölcsönható fehérjét írta le (100).

Az *ecetmuslica* DTL fehérje működésének megértésére hiánymutáns állatokat hoztunk létre, és megállapítottuk, hogy DTL hiányában a legyek L2-L3 lárvális stádiumban elpusztulnak. Ez jelentheti azt is, hogy ebben a fejlődési stádiumban van szükség a fehérje funkciójára, de azt is, hogy az anya által az embriókba juttatott DTL fehérje és RNS akkorra fogyott ki a lárvákból. P-elem mobilizációval két mutáns törzset hoztunk létre, amelyikből az egyikben (192) képződik egy csonka fehérje, amely a 491 aminosav hosszú vad típusú DTL-lel szemben csak 421 aminosavból áll. Ezt a szekvenciális adatokon felül immuno-blot kísérletek is

alátámasztják. A két mutáns törzs fenotípusa megegyezik, így arra következtettünk, hogy a csonka fehérje nem képes ellátni a funkciót.

Immun-hisztokémiai és immunprecipitációs kísérletek alapján DTL hiányában az *ecetmuslica* kromoszómái rendellenesen szegregálódnak a mitózis folyamán, és a kis RNS-ek végei nem trimetilálódnak. A mutáns törzseket különböző transzgénekkel való menekítéses kísérletek azt mutatták, hogy a mutáns fenotípust a DTL fehérje, és a gén 5' végén található másik nyitott leolvasási keret (DTLu) együttes hiánya okozza. A csoport újabb eredményei alapján valószínű, hogy a mitotikus rendellenességért a DTLu, a trimetiláció hiányáért a DTL maga a felelős. A DTL fehérjén az RNS-metiltranszferáz doménon kívül található még egy feltételezett RNS kötő motívum is, ennek a két motívumnak a szerepe a mutáns fenotípus kialakításában még nem tisztázott. A DTLu-nak eddig csak egy rokon élőlényben a *Drosophila pseudoobscura*-ban találtunk homológját, pontos funkciójának meghatározása még várat magára.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Boros Imrének, hogy lehetővé tette számomra, hogy csatlakozhassam a csoportjához. Hálás vagyok a szakmai irányításért, és hogy türelemmel viseltetett irányomban.

Köszönettel tartozom Udvardy Andornak is a jóindulatáért, türelméért, a rengeteg segítségéért, valamint hogy lehetővé tette számomra, hogy a laboratóriumában dolgozhassam.

Ezúton is szeretném megköszönni Komonyi Orbán segítségét és munkáját az ecetmuslicákkal végzett kísérletekben,. Selen Muratoğlunak és Izzet Enünlünek is hálás vagyok a szakmai segítségükért és barátságukért.

Hálás vagyok Ökrösné Katalin segítségéért, amellyel hozzájárult a munkámhoz. Az ő tapasztalata és segítése elengedhetetlen volt a gördülékeny munkához.

Feleségemnek, Ősz Juditnak, valamint Tímár Editnek köszönöm a dolgozatom gondos átolvasását és kritikáikat.

A munkához a jó hangulatot és a megfelelő légkört a csoport többi tagja teremtette meg, köszönet illeti őket.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a családomnak a támogatását.

Irodalomjegyzék

- 1: Ohler U, Liao GC, Niemann H, Rubin GM. *Computational analysis of core promoters in the Drosophila genome*. Genome Biol. 2002;**3**(12):RESEARCH0087.
- 2: Matsui T, Segall J, Weil PA, Roeder RG. *Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II*. J Biol Chem. 1980; **255**(24):11992-6.
- 3: Nakajima N, Horikoshi M, Roeder RG. *Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: purification, genetic specificity, and TATA box-promoter interactions of TFIID*. Mol Cell Biol. 1988; **8**(10):4028-40.
- 4: Buratowski S, Hahn S, Sharp PA, Guarente L. *Function of a yeast TATA element-binding protein in a mammalian transcription system*. Nature. 1988; **334**(6177):37-42.
- 5: Hoey T, Dynlacht BD, Peterson MG, Pugh BF, Tjian R. *Isolation and characterization of the Drosophila gene encoding the TATA box binding protein, TFIID*. Cell. 1990; **61**(7):1179-86.
- 6: Woychik NA, Hampsey M. *The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function*. Cell. 2002; **108**(4):453-63.
- 7: Albright SR, Tjian R. *TAFs revisited: more data reveal new twists and confirm old ideas*. Gene. 2000; **242**(1-2):1-13.
- 8: Patikoglou GA, Kim JL, Sun L, Yang SH, Kodadek T, Burley SK. *TATA element recognition by the TATA box-binding protein has been conserved throughout evolution*. Genes Dev. 1999; **13**(24):3217-30.
- 9: O'Shea-Greenfield A, Smale ST. *Roles of TATA and initiator elements in determining the start site location and direction of RNA polymerase II transcription*. J Biol Chem. 1992; **267**(2):1391-402.
- 10: Liu Y, Schepartz A. *Kinetic preference for oriented DNA binding by the yeast TATA-binding protein TBP*. Biochemistry. 2001; **40**(21):6257-66.
- 11: Fairley JA, Evans R, Hawkes NA, Roberts SG. *Core promoter-dependent TFIIB conformation and a role for TFIIB conformation in transcription start site selection*. Mol Cell Biol. 2002; **22**(19):6697-705.
- 12: Corden J, Wasylyk B, Buchwalder A, Sassone-Corsi P, Kedinger C, Chambon P. *Promoter sequences of eukaryotic protein-coding genes*. Science. 1980; **209**(4463):1406-14.
- 13: Emami KH, Jain A, Smale ST. *Mechanism of synergy between TATA and initiator: synergistic binding of TFIID following a putative TFIIA-induced isomerization*. Genes Dev. 1997; **11**(22):3007-19.
- 14: Purnell BA, Emanuel PA, Gilmour DS. *TFIID sequence recognition of the initiator and sequences farther downstream in Drosophila class II genes*. Genes Dev. 1994; **8**(7):830-42.
- 15: Oelgeschlager T, Chiang CM, Roeder RG. *Topology and reorganization of a human TFIID-promoter complex*. Nature. 1996; **382**(6593):735-8.
- 16: Martinez E, Zhou Q, L'Etoile ND, Oelgeschlager T, Berk AJ, Roeder RG. *Core promoter-specific function of a mutant transcription factor TFIID defective in TATA-box binding*. Proc Natl Acad Sci USA. 1995; **92**(25):11864-8.
- 17: Zenzie-Gregory B, Khachi A, Garraway IP, Smale ST. *Mechanism of initiator-mediated transcription: evidence for a functional interaction between the TATA-binding protein*

- and DNA in the absence of a specific recognition sequence. *Mol Cell Biol.* 1993; **13**(7):3841-9.
- 18: Kutach AK, Kadonaga JT. *The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in Drosophila core promoters.* *Mol Cell Biol.* 2000; **20**(13):4754-64.
 - 19: Maldonado E, Hampsey M, Reinberg D. *Repression: targeting the heart of the matter.* *Cell.* 1999; **99**(5):455-8.
 - 20: Persengiev SP, Zhu X, Dixit BL, Maston GA, Kittler EL, Green MR. *TRF3, a TATA-box-binding protein-related factor, is vertebrate-specific and widely expressed.* *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; **100**(25):14887-91.
 - 21: Hochheimer A, Tjian R. *Diversified transcription initiation complexes expand promoter selectivity and tissue-specific gene expression.* *Genes Dev.* 2003 Jun 1; **17**(11):1309-20.
 - 22: Hochheimer A, Zhou S, Zheng S, Holmes MC, Tjian R. *TRF2 associates with DREF and directs promoter-selective gene expression in Drosophila.* *Nature.* 2002; **420**(6914):439-45.
 - 23: Hirose F, Yamaguchi M, Handa H, Inomata Y, Matsukage A. *Novel 8-base pair sequence (Drosophila DNA replication-related element) and specific binding factor involved in the expression of Drosophila genes for DNA polymerase alpha and proliferating cell nuclear antigen.* *J Biol Chem.* 1993; **268**(3):2092-9
 - 24: Hirose F, Yamaguchi M, Kuroda K, Omori A, Hachiya T, Ikeda M, Nishimoto Y, Matsukage A. *Isolation and characterization of cDNA for DREF, a promoter-activating factor for Drosophila DNA replication-related genes.* *J Biol Chem.* 1996; **271**(7):3930-7.
 - 25: Hart CM, Cuvier O, Laemmli UK. *Evidence for an antagonistic relationship between the boundary element-associated factor BEAF and the transcription factor DREF.* *Chromosoma.* 1999; **108**(6):375-83.
 - 26: Evans R, Fairley JA, Roberts SG. *Activator-mediated disruption of sequence-specific DNA contacts by the general transcription factor TFIIB.* *Genes Dev.* 2001; **15**(22):2945-9.
 - 27: Hernandez N. *Small nuclear RNA genes: a model system to study fundamental mechanisms of transcription.* *J Biol Chem.* 2001; **276**(29):26733-6.
 - 28: Blackwood EM, Kadonaga JT. *Going the distance: a current view of enhancer action.* *Science.* 1998; **281**(5373):61-3.
 - 29: Hooper KL, Parkhurst SM, Ish-Horowicz D. *Spatial control of hairy protein expression during embryogenesis.* *Development.* 1989; **107**(3):489-504.
 - 30: Fujioka M, Emi-Sarker Y, Yusibova GL, Goto T, Jaynes JB. *Analysis of an even-skipped rescue transgene reveals both composite and discrete neuronal and early blastoderm enhancers, and multi-stripe positioning by gap gene repressor gradients.* *Development.* 1999; **126**(11):2527-38.
 - 31: Biggin MD, McGinnis W. *Regulation of segmentation and segmental identity by Drosophila homeoproteins: the role of DNA binding in functional activity and specificity.* *Development.* 1997; **124**(22):4425-33.
 - 32: Valentini SA, Chen G, Shandala T, Fernandez J, Mische S, Saint R, Courey AJ. *Dorsal-mediated repression requires the formation of a multiprotein repression complex at the ventral silencer.* *Mol Cell Biol.* 1998; **18**(11):6584-94.
 - 33: Hewitt GF, Strunk BS, Margulies C, Priputin T, Wang XD, Amey R, Pabst BA, Kosman D, Reinitz J, Arnosti DN. *Transcriptional repression by the Drosophila giant protein: cis element positioning provides an alternative means of interpreting an effector gradient.* *Development.* 1999; **126**(6):1201-10.

- 34: Sheng G, Thouvenot E, Schmucker D, Wilson DS, Desplan C. *Direct regulation of rhodopsin 1 by Pax-6/eyeless in Drosophila: evidence for a conserved function in photoreceptors.* Genes Dev. 1997; **11**(9):1122-31.
- 35: Guss KA, Nelson CE, Hudson A, Kraus ME, Carroll SB. *Control of a genetic regulatory network by a selector gene.* Science. 2001; **292**(5519):1164-7.
- 36: Small S, Blair A, Levine M. *Regulation of two pair-rule stripes by a single enhancer in the Drosophila embryo.* Dev Biol. 1996; **175**(2):314-24.
- 37: Ohtsuki S, Levine M, Cai HN. *Different core promoters possess distinct regulatory activities in the Drosophila embryo.* Genes Dev. 1998; **12**(4):547-56.
- 38: Bell AC, West AG, Felsenfeld G. *Insulators and boundaries: versatile regulatory elements in the eukaryotic genome.* Science. 2001; **291**(5503):447-50.
- 39: Roseman RR, Pirrotta V, Geyer PK. *The su(Hw) protein insulates expression of the Drosophila melanogaster white gene from chromosomal position-effects.* EMBO J. 1993; **12**(2):435-42.
- 40: Hagstrom K, Muller M, Schedl P. *Fab-7 functions as a chromatin domain boundary to ensure proper segment specification by the Drosophila bithorax complex.* Genes Dev. 1996; **10**(24):3202-15.
- 41: Barolo S, Levine M. *Hairy mediates dominant repression in the Drosophila embryo.* EMBO J. 1997; **16**(10):2883-91.
- 42: Scott KC, Taubman AD, Geyer PK. *Enhancer blocking by the Drosophila gypsy insulator depends upon insulator anatomy and enhancer strength.* Genetics. 1999; **153**(2):787-98.
- 43: Naar AM, Lemon BD, Tjian R. *Transcriptional coactivator complexes.* Annu Rev Biochem. 2001; **70**:475-501.
- 44: Kingston RE, Narlikar GJ. *ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity.* Genes Dev. 1999; **13**(18):2339-52.
- 45: Hebbes TR, Thorne AW, Crane-Robinson C. *A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin.* EMBO J. 1988; **7**(5):1395-402.
- 46: Allfrey VG. *Structural modifications of histones and their possible role in the regulation of ribonucleic acid synthesis.* Proc Can Cancer Conf. 1966; **6**:313-35.
- 47: Roth SY, Denu JM, Allis CD. *Histone acetyltransferases.* Annu Rev Biochem. 2001; **70**:81-120.
- 48: Eberharter A, Sterner DE, Schieltz D, Hassan A, Yates JR 3rd, Berger SL, Workman JL. *The ADA complex is a distinct histone acetyltransferase complex in Saccharomyces cerevisiae.* Mol Cell Biol. 1999; **19**(10):6621-31.
- 49: Sterner DE, Grant PA, Roberts SM, Duggan LJ, Belotserkovskaya R, Pacella LA, Winston F, Workman JL, Berger SL. *Functional organization of the yeast SAGA complex: distinct components involved in structural integrity, nucleosome acetylation, and TATA-binding protein interaction.* Mol Cell Biol. 1999; **19**(1):86-98.
- 50: Muratoglu S, Georgieva S, Papai G, Scheer E, Enunlu I, Komonyi O, Cserpan I, Lebedeva L, Nabirochkina E, Udvardy A, Tora L, Boros I. *Two different Drosophila ADA2 homologues are present in distinct GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes.* Mol Cell Biol. 2003; **23**(1):306-21.
- 51: Hernandez N. *Small nuclear RNA genes: a model system to study fundamental mechanisms of transcription.* J Biol Chem. 2001; **276**(29):26733-6.
- 52: Tollervy D, Kiss T. *Function and synthesis of small nucleolar RNAs.* Curr Opin Cell Biol. 1997; **9**(3):337-42.
- 53: Hamm J, Mattaj IW. *Monomethylated cap structures facilitate RNA export from the nucleus.* Cell. 1990; **63**(1):109-18.

- 54: Raker VA, Plessel G, Luhrmann R. *The snRNP core assembly pathway: identification of stable core protein heteromeric complexes and an snRNP subcore particle in vitro.* EMBO J. 1996; **15**(9):2256-69.
- 55: Huber J, Cronshagen U, Kadokura M, Marshallsay C, Wada T, Sekine M, Luhrmann R. *Snurportin1, an m3G-cap-specific nuclear import receptor with a novel domain structure.* EMBO J. 1998; **17**(14):4114-26.
- 56: Jady BE, Darzacq X, Tucker KE, Matera AG, Bertrand E, Kiss T. *Modification of Sm small nuclear RNAs occurs in the nucleoplasmic Cajal body following import from the cytoplasm.* EMBO J. 2003; **22**(8):1878-88.
- 57: Kiss T. *Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs.* EMBO J. 2001; **20**(14):3617-22.
- 58: Jady BE, Kiss T. *A small nucleolar guide RNA functions both in 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation of the U5 spliceosomal RNA.* EMBO J. 2001; **20**(3):541-51.
- 59: Jurica MS, Moore MJ. *Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins.* Mol Cell. 2003; **12**(1):5-14.
- 60: Kiss T. *Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions.* Cell. 2002; **109**(2):145-8.
- 61: Richard P, Darzacq X, Bertrand E, Jady BE, Verheggen C, Kiss T. *A common sequence motif determines the Cajal body-specific localization of box H/ACA scaRNAs.* EMBO J. 2003; **22**(16):4283-93.
- 62: Mitchell JR, Cheng J, Collins K. *A box H/ACA small nucleolar RNA-like domain at the human telomerase RNA 3' end.* Mol Cell Biol. 1999; **19**(1):567-76.
- 63: Cramer P, Caceres JF, Cazalla D, Kadener S, Muro AF, Baralle FE, Kornblihtt AR. *Coupling of transcription with alternative splicing: RNA pol II promoters modulate SF2/ASF and 9G8 effects on an exonic splicing enhancer.* Mol Cell. 1999; **4**(2):251-8.
- 64: Hirose Y, Manley JL. *RNA polymerase II and the integration of nuclear events.* Genes Dev. 2000; **14**(12):1415-29.
- 65: Nakielny S, Dreyfuss G. *Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus.* Cell. 1999; **99**(7):677-90.
- 66: Mitchell P, Tollervey D. *mRNA stability in eukaryotes.* Curr Opin Genet Dev. 2000; **10**(2):193-8.
- 67: Mitrovich QM, Anderson P. *Unproductively spliced ribosomal protein mRNAs are natural targets of mRNA surveillance in C. elegans.* Genes Dev. 2000; **14**(17):2173-84.
- 68: Zhang J, Sun X, Qian Y, LaDuca JP, Maquat LE. *At least one intron is required for the nonsense-mediated decay of triosephosphate isomerase mRNA: a possible link between nuclear splicing and cytoplasmic translation.* Mol Cell Biol. 1998; **18**(9):5272-83.
- 69: Nagy E, Maquat LE. *A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance.* Trends Biochem Sci. 1998; **23**(6):198-9.
- 70: Le Hir H, Izaurralde E, Maquat LE, Moore MJ. *The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions.* EMBO J. 2000; **19**(24):6860-9.
- 71: Lykke-Andersen J, Shu MD, Steitz JA. *Communication of the position of exon-exon junctions to the mRNA surveillance machinery by the protein RNPS1.* Science. 2001; **293**(5536):1836-9.
- 72: Decker CJ, Parker R. *A turnover pathway for both stable and unstable mRNAs in yeast: evidence for a requirement for deadenylation.* Genes Dev. 1993; **7**(8):1632-43.
- 73: Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans.* Nature. 1998; **391**(6669):806-11.

- 74: Kennerdell JR, Carthew RW. *Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway.* Cell. 1998; **95**(7):1017-26.
- 75: Voinnet O. *RNA silencing as a plant immune system against viruses.* Trends Genet. 2001; **17**(8):449-59.
- 76: Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, Fire A, Mello CC. *The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in C. elegans.* Cell. 1999; **99**(2):123-32.
- 77: Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. *Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans.* Plant Cell. 1990; **2**(4):279-289.
- 78: Aravin AA, Naumova NM, Tulin AV, Vagin VV, Rozovsky YM, Gvozdev VA. *Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the D. melanogaster germline.* Curr Biol. 2001; **11**(13):1017-27.
- 79: Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, Sanger HL. *RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants.* Cell. 1994; **76**(3):567-76.
- 80: Pal-Bhadra M, Leibovitch BA, Gandhi SG, Rao M, Bhadra U, Birchler JA, Elgin SC. *Heterochromatic silencing and HPI localization in Drosophila are dependent on the RNAi machinery.* Science. 2004; **303**(5658):669-72.
- 81: Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference.* Nature. 2001; **409**(6818):363-6.
- 82: Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. *RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs.* Genes Dev. 2001; **15**(2):188-200.
- 83: Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. *Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate.* EMBO J. 2001; **20**(23):6877-88.
- 84: Liu Q, Rand TA, Kalidas S, Du F, Kim HE, Smith DP, Wang X. *R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the Drosophila RNAi pathway.* Science. 2003; **301**(5641):1921-5.
- 85: Nykanen A, Haley B, Zamore PD. *ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway.* Cell. 2001; **107**(3):309-21.
- 86: Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. *An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells.* Nature. 2000; **404**(6775):293-6.
- 87: Smardon A, Spoerke JM, Stacey SC, Klein ME, Mackin N, Maine EM. *EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in C. elegans.* Curr Biol. 2000; **10**(4):169-78.
- 88: Lipardi C, Wei Q, Paterson BM. *RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs.* Cell. 2001; **107**(3):297-307.
- 89: Roignant JY, Carre C, Mugat B, Szymczak D, Lepesant JA, Antoniewski C. *Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoform-specific RNAi in Drosophila.* RNA. 2003; **9**(3):299-308.
- 90: Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. *A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA.* Science. 2001; **293**(5531):834-8.
- 91: Hutvagner G, Zamore PD. *A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex.* Science. 2002; **297**(5589):2056-60.
- 92: Olsen PH, Ambros V. *The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in Caenorhabditis elegans by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation.* Dev Biol. 1999; **216**(2):671-80.

- 93: Butler JE, Kadonaga JT. *The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression*. Genes Dev. 2002; **16**(20):2583-92.
- 94: Maxwell IH, Harrison GS, Wood WM, Maxwell F. *A DNA cassette containing a trimerized SV40 polyadenylation signal which efficiently blocks spurious plasmid-initiated transcription*. Biotechniques. 1989; **7**(3):276-80.
- 95: Thummel C, Boulet A, Lipshitz H. *Vectors for Drosophila P-element-mediated transformation and tissue culture transfection*. Gene. 1988; **74**(2):445-56.
- 96: Brown JL, Wu C. *Repression of Drosophila pair-rule segmentation genes by ectopic expression of tramtrack*. Development. 1993; **117**(1):45-58.
- 97: Duncan I. *Control of bithorax complex functions by the segmentation gene fushi tarazu of D. melanogaster*. Cell. 1986; **47**(2):297-309.
- 98: Bailey AM, Posakony JW. *Suppressor of Hairless directly activates transcription of Enhancer of split Complex genes in response to Notch receptor activity*. Genes Dev. 1995; **9**(21):2609-22.
- 99: Yamaguchi M, Hayashi Y, Nishimoto Y, Hirose F, Matsukage A. *A nucleotide sequence essential for the function of DRE, a common promoter element for Drosophila DNA replication-related genes*. J Biol Chem. 1995; **270**(26):15808-14.
- 100: Zhu Y, Qi C, Cao WQ, Yeldandi AV, Rao MS, Reddy JK. *Cloning and characterization of PIMT, a protein with a methyltransferase domain, which interacts with and enhances nuclear receptor coactivator PRIP function*. Proc Natl Acad Sci USA. 2001; **98**(18):10380-5.
- 101: Misra P, Qi C, Yu S, Shah SH, Cao WQ, Rao MS, Thimmapaya B, Zhu Y, Reddy JK. *Interaction of PIMT with transcriptional coactivators CBP, p300, and PBP differential role in transcriptional regulation*. J Biol Chem. 2002; **277**(22):20011-9.
- 102: Mouaikel J, Verheggen C, Bertrand E, Tazi J, Bordonne R. *Hypermethylation of the cap structure of both yeast snRNAs and snoRNAs requires a conserved methyltransferase that is localized to the nucleolus*. Mol Cell. 2002; **9**(4):891-901.
- 103: Verheggen C, Lafontaine DL, Samarsky D, Mouaikel J, Blanchard JM, Bordonne R, Bertrand E. *Mammalian and yeast U3 snoRNPs are matured in specific and related nuclear compartments*. EMBO J. 2002; **21**(11):2736-45.
- 104: Ingham PW, Pinchin SM, Howard KR, Ish-Horowicz D. *Genetic analysis of the hairy locus in Drosophila melanogaster*. Genetics 1985; **111**: 463–486.
- 105: Bianchi-Frias D, Orian A, Delrow JJ, Vazquez J, Rosales-Nieves AE, Parkhurst SM. *Hairy transcriptional repression targets and cofactor recruitment in Drosophila*. PLoS Biol. 2004; **2**(7):E178.
- 106: Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. *Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing*. Nat Rev Genet. 2002; **3**(4):285-98.
- 107: Pagans S, Ortiz-Lombardia M, Espinas ML, Bernues J, Azorin F. *The Drosophila transcription factor tramtrack (TTK) interacts with Trithorax-like (GAGA) and represses GAGA-mediated activation*. Nucleic Acids Res. 2002; **30**(20):4406-13
- 108: Lai EC. *Notch signaling: control of cell communication and cell fate*. Development. 2004; **131**(5):965-73.
- 109: Smale ST, Kadonaga JT. *The RNA polymerase II core promoter*. Annu Rev Biochem. 2003; **72**:449-79.
- 110: Ryu JR, Choi TY, Kwon EJ, Lee WH, Nishida Y, Hayashi Y, Matsukage A, Yamaguchi M, Yoo MA. *Transcriptional regulation of the Drosophila-raf proto-oncogene by the DNA replication-related element (DRE)/DRE-binding factor (DREF) system*. Nucleic Acids Res. 1997; **25**(4):794-9.

- 111: Yamaguchi M, Hayashi Y, Nishimoto Y, Hirose F, Matsukage A. *A nucleotide sequence essential for the function of DRE, a common promoter element for Drosophila DNA replication-related genes.* J Biol Chem. 1995; **270**(26):15808-14.
- 112: Ohno K, Hirose F, Sakaguchi K, Nishida Y, Matsukage A. *Transcriptional regulation of the Drosophila CycA gene by the DNA replication-related element (DRE) and DRE binding factor (DREF).* Nucleic Acids Res. 1996; **24**(20):3942-6.
- 113: Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA. *Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro.* Genes Dev. 1999; **13**(24):3191-7.
- 114: Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. *An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells.* Nature. 2000; **404**(6775):293-6.
- 115: Maquat LE, Li X. *Mammalian heat shock p70 and histone H4 transcripts, which derive from naturally intronless genes, are immune to nonsense-mediated decay.* RNA. 2001; **7**(3):445-56.

Függelékek

1. Függelék

```
Ada2 At a9sfd5 : GNERKPGLYCQNYQDKDLSGLVREKCAVCG--MDFDLCECESVGVVLELN---RHKNSHPYRVMNDLSFSIVT : 108
Ada2 At o23486 : GAEGGGKYNDYQOKDITIGKTRIKCAVCG--PDFDLCECEMVGCAFIT---PEIKCDHPYRVMGNLTFPIIC : 88
Ada2 Zm aw055700 : -----
Ada2 Pf a9u611 : EEDIFDSNYHEDTGNKDIHTHTIRTRCAEC--VDFDLVNCVSTGKFMKSDKCEYNYNYNIPPKYDFPIYK- : 143
Ada2 Sp a9b717 : MPPOKYFQNVQADITRSHTIRVVECG--VDFDLVPCFTISGASLG---THPSPHPYRVIETNSYPIFD- : 63
Ada2 Sc a02336 : MSNKFQDVQADICTNRVRSVAICG--PEYDLVPCFSSQSYTG---KIRPYHDYRIETNSYPIILC- : 62
Ada2a Hs o75478 : FSNDPSDKPPRGSSYLMEP-YIKCAEGPPFFFLCOCFTRCFEYK---KQSDHTYEIWT-SDFPVLDT- : 72
Ada2a Dm xxxxxx : VPSATKDANRQATQRCSLTEP-YIKCAECG--LDITLILCOCFSRCKEAF---SRNNHAYITVYR-DNIOVADF : 135
Ada2a Dm a9vhv0 : TIADLFTKYNTNODDTIOG-IRVHCAEC--ENFDLILCOCVAAAEIG---AQNHNHYOFDGTGTSIISVF : 68
Ada2 Ce a19953 : MADDTGEHPVGFNCTLRVDOTTHVKGFECC--PLRITGLICVCCGAEISP---PIRRGHNVEIK-PTSNEPA- : 64
Ada2 Dr aw421870 : MADLGGKYYVNLADVAVN-ILTRCAEC--ODIELCPCEFSAGAEIG---NRRRWVGVYVDDGGRFSIWGP : 66
Ada2b Hs ac048379 : MAELGGKYYVYLAEVSP-IRFRVTECG--ODIELCPCEFSAGAEIG---HRRRYVGVYVDDGGRFTIWGP : 66
Ada2 Mm be532918 : -----
```

```
Ada2 At a9sfd5 : ---SDWNADFEILLLEATATYGFGNWKEADHVG---SKITTTCTKHFNSAYMOSPCFPLP----- : 163
Ada2 At o23486 : ---PDMSADDFEMLLLEGLEIYGLGNVAEVAEHVG---TKSKECCLEIYRNININSPFFFLPEKRLFSO--- : 150
Ada2 Zm aw055700 : -----
Ada2 Pf a9u611 : ---LMSAEFEILLLDGISKKFGFGNVEVADLVSVANITKIDRECESYNYNYLKSNCAPLP----- : 203
Ada2 Sp a9b717 : ---EMWGDEELLTDACETLGLGNVADIAADYVGN---ARIKECRDHYLKYIIESDCYPLA----- : 119
Ada2 Sc a02336 : ---PDWGDFEILQIKGAOTLGLGNVODTADHVG---SRGKEVKEIYLKYYLESKYPIIP----- : 117
Ada2a Hs o75478 : ---PSWTAQEMALLEAVMDCGFGNVODVANOVCG---TKIKKECEKHYMKHETNNPLFASTLL----- : 129
Ada2a Dm xxxxxx : ---EPHWIARDERILLKTLRTHGVGNVEAVSOALDO---RHEPAVRRLYHDCYEGGIFERLL----- : 192
Ada2b Dm a9vhv0 : RGKGAWIAREIRLLDAIEOYGFGNVEDISKPIIE---TKSAEDAKEYVYKVFNGTIGRATWT----- : 128
Ada2 Ce a19953 : ---MSWTHEDFEELLKAAHKFKVGNVGEIAESITGR---GRKDGHNCKDYFEKHVVRGWIGOFSTKSSSWDR : 130
Ada2 Dr aw421870 : FAEGGWTSREFEOSLLDATEOYGFGNVEDMAAHVGA---SRTIPOVMDHYVSMYTHGNLKGAC----- : 125
Ada2b Hs ac048379 : FAEGGWTSREFEOLLDATEOYGFGNVEMAAHVGA---SRTIPOVMEHYVSMYTHGNLKGAC----- : 125
Ada2 Mm be532918 : -----
```

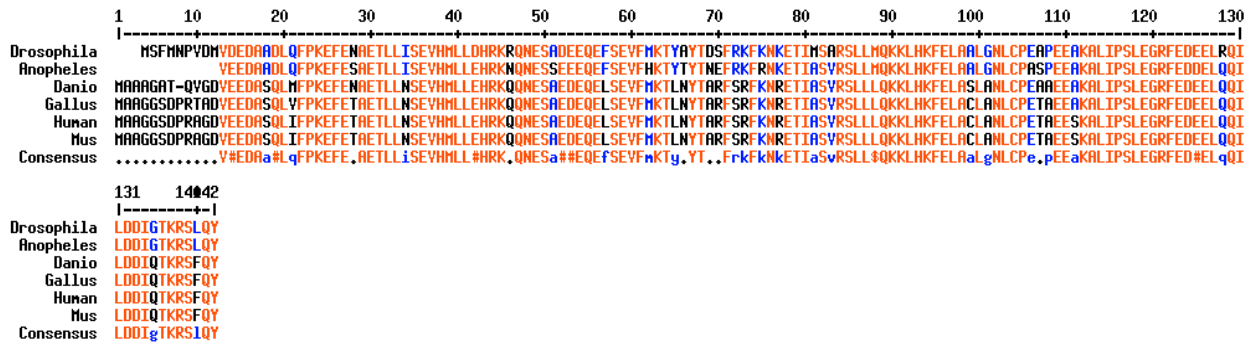
```
Ada2 At a9sfd5 : AKDITIKLEAAKOOSDRSVGKELRIIGEKVPLVTFIYGYNIKREEFETEHNDNDAEOLADMEFK----- : 300
Ada2 At o23486 : PKVKVEDTOKESFVDRSFGGKK-PVSTSVNNSLVLELSNINOKREEFDPEYDNDAEOLAEAEFK----- : 251
Ada2 Zm aw055700 : KDGSNVSKVEDGHVDRSVGVKPRYSADEGPSLTELSSYNAKRHEFDPEYDNDAEOLAEMFK----- : 112
Ada2 Pf a9u611 : ---EKDINDNDY-VLQSKSKNNRTIIGYWPPLRGDFIETDYNDAEOLLADMEFK----- : 274
Ada2 Sp a9b717 : ---TEAFOPPTII-POKPLASTPOCHETOGYMPGRLEFEFOEYNEAELPTIKDMNFDDLL----- : 194
Ada2 Sc a02336 : ---IESFRERPLEPPRKIMASVPSCHVVOGFMPGRLEFEFENEAEAGPVKDMVFE----- : 190
Ada2a Hs o75478 : ---TAIPFHSTDDPPRTTDFSLLSRDVAGYMPARADFIEFDNYAERDLRDLDFV----- : 193
Ada2a Dm xxxxxx : ---SLDPPRHDDIASMOFRLSAGYRCARGDFDTPYDTSAESLSTVVDHGRGDDDNEA----- : 268
Ada2b Dm a9vhv0 : ---PLGTNALSTLPLEINSDEAMOLGYMNRDSEEREYPTAEOLISNITLS----- : 197
Ada2 Ce a19953 : ---GVSKSETRKMRSDDELKILGYNNEREELGEWEFEAEOLISRLTISATEP----- : 408
Ada2 Dr aw421870 : ---PLSPSLTTPPLPLDITVVEOOLGYMPLRDDYEIYDQAEKILISGLSVN----- : 193
Ada2b Hs ac048379 : ---PLSPSLTTPPLPLDISVAEOOLGYMPLRDDYEIYDQAEKILISGLSVN----- : 193
Ada2 Mm be532918 : -----
```

```
Ada2 At a9sfd5 : ---DSQDAREEOKLOVLRITYSKRRLDERKRRKEFVLERNLILY-P-----DOYEMSLSABERKIYKSCR : 359
Ada2 At o23486 : ---ENDTPEEHKLRVLRITYSKRRLDERKRRKEFTLERNLILY-P-----NPFKDLSSOBEIVOCRRILD : 310
Ada2 Zm aw055700 : ---ETDSETRKLRVLRITYLSRRLDERKRRKEFTLERNLILY-P-----NPLEKDLTNEDEYVHYRYK : 171
Ada2 Pf a9u611 : ---ESDLPOOKELKLOVLEITYSKRLDERIYKRTVIERGLD--SKAO---MOKEKRTKEEKEYAALK : 336
Ada2 Sp a9b717 : ---HESAKHEMOLKILVNTYNSRLTRRAVRKOTTFENHLLD--YRRL---OANFKRMSKEERNLNLKTK : 256
Ada2 Sc a02336 : ---PDQPLDTELKFAILDITYSRLTRRAEKRLLEFENHLLD--YRKL---OATDKKRKEAKEYNRK : 252
Ada2a Hs o75478 : ---EDSDILHALKVAVDITYHSRLRERORRKYITRDHGLIN--LRKF---OLM--RYPYKQVODIYETMR : 255
Ada2a Dm xxxxxx : SESEFFEREVTEGLIVRAYNRLRERORRKYIYRQHLIM-PNRTV---SWISKYVHAFSGSDASCDFEL : 335
Ada2b Dm a9vhv0 : ---SETEVDVMLKIAHVDTYTRRLRERARRKMYRQYOLVSNFFRNR---NYAOQGLTKQAEFRDRFR : 262
Ada2 Ce a19953 : ---OKDORLDMENDIKFARLRHYVRLGLTRKAKRNTMLEHDKINEFMKFYOEAPVPSQOETMDSRTEKELLA : 482
Ada2 Dr aw421870 : ---YDDEITETMKRAHVDVYVRKLRERORRKNITARDYNLVPFLGRDKKE----- : 211
Ada2b Hs ac048379 : ---YDQDDVETMKRAHVDVYVRKLRERORRKNITARDYNLVPFLGRDKKE--KEKALKRKTTFEKEFLRLKLR : 243
Ada2 Mm be532918 : -----TKFBEFLRLKLR : 12
```

```
Ada2 At a9sfd5 : VFARFOSKFKHKLKKVTEFHOTLRRTEDEQFARTACRRTTSDANRFEEFKRKKFAFESMLIRLNHGAPGS : 431
Ada2 At o23486 : VFMRVHSKEFHDELNRNVSEYRMYKRLKDLKEAOVACRSTAEARMLGRKRRKRENEGMRNGKESGOFGO : 382
Ada2 Zm aw055700 : VFMRVLSKEFHVALRVSVTEFRKTRRTOFOECRSACRRTIAFAKTHTEOKKKKTRGGAR : 233
Ada2 Pf a9u611 : PLSRVHSPOHHFYFTOILIFFOKLRORITKLOFWKALGONTEFOVQVYETFNRRAKE-MVKOESNSTTGTI : 405
Ada2 Sp a9b717 : FARLLT-GPDYOKFVNSYHEOITIKOISDLOEVRMGLTTLEOGHKYERDTOK-----FLLSKA : 317
Ada2 Sc a02336 : PARVMT-AODFEFFSKDLEELHCBARFOOLEVRSNGLTTIAGIKYERDQARTSS-----FEFKFG : 315
Ada2a Hs o75478 : RARIVG-PVHDKFESHALFFELREIKRLOEYRTAGITNECSARTYNHLLKTRTEER----LKRITMLSE : 322
Ada2a Dm xxxxxx : GMOICPDPIKDFMLLESILRYRRELSOHLKLYDLREHGVRTLSGAKLYARLSKEROOAOOR----DYSRLK : 402
Ada2b Dm a9vhv0 : VMAOYITCNSEYERLIGSLERKELRTQSELYRYRYNGITKTAECTHEOHAATATHRSTGPY----- : 325
Ada2 Ce a19953 : MTOOGLITRDYRSIRASIERIDNWEREVLQDLOKNETTICK-NAPVERKSKKKMRKIDCEOKKIATEWS : 554
Ada2 Dr aw421870 : -----
Ada2b Hs ac048379 : PLYQMSCKFDDLFENVHKKMLAKITRELRVYRNGITTKVEESAIEAARHKREKRKEN----- : 303
Ada2 Mm be532918 : PLYQMSCKFDDLFENVHKKMLAKITRELRVYRNGITTKVEESAIEAARHKREKRKEN----- : 73
```

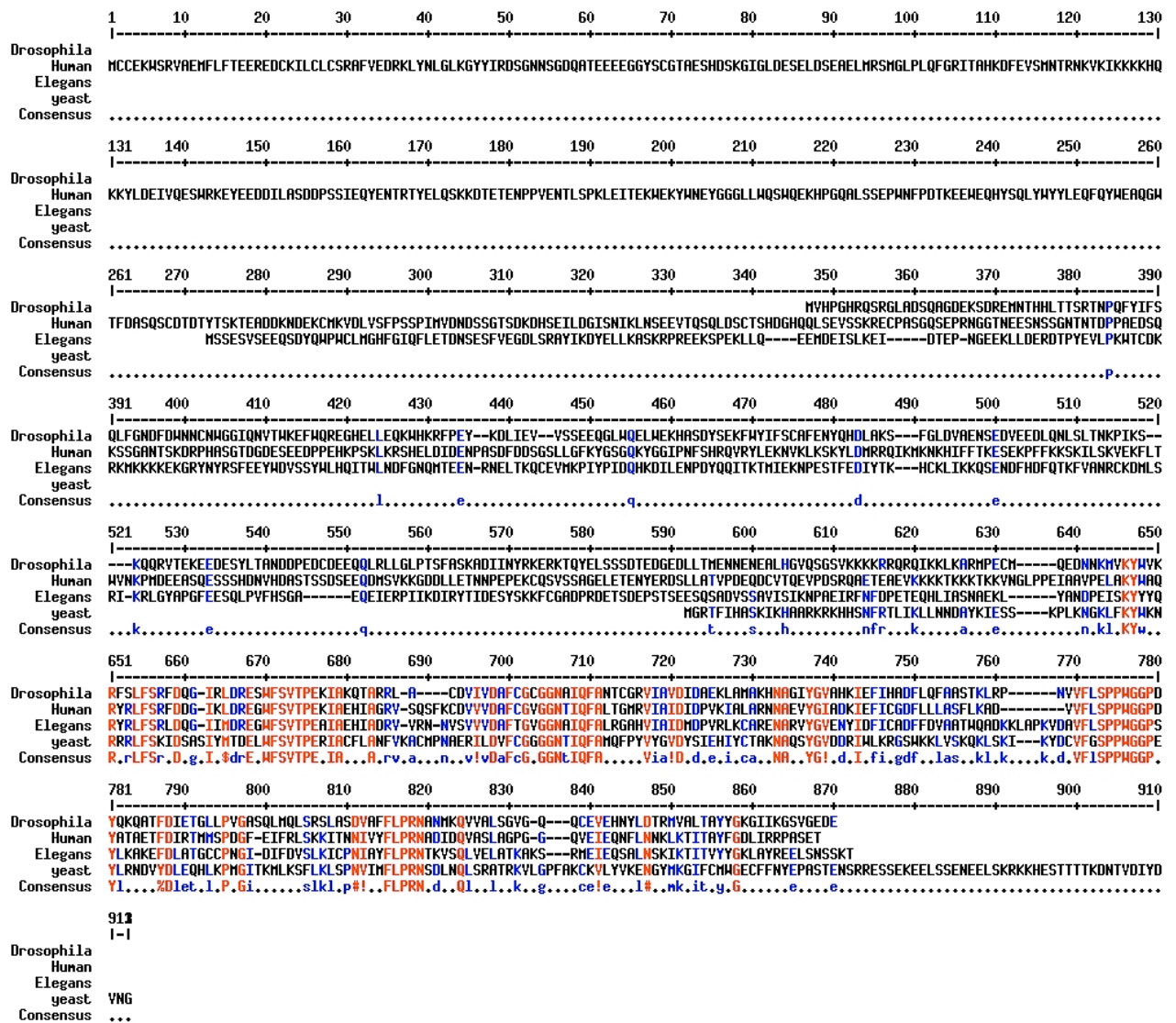
```
Ada2 At a9sfd5 : TAGKTLKSPRGLPRNLHPFGSDSLPKVTPPRIYS---GLDWDVGLLGADLSETEKKVCNETRILVHYL : 474
Ada2 At o23486 : TAGEMGRPPVOASSY---VNDLDTIGFTESOLISESEKRLCSVEKIVPVVYL : 407
Ada2 Zm aw055700 : -----
Ada2 Pf a9u611 : SMNNTSSNNNTVTTEKLGKSLKTSKDKYIKKNEEETDENKKNLDTFVALDILNEKEVEEFCNKYKIPTLFFL : 454
Ada2 Sp a9b717 : SASYDKOLRHVKSFNOTTAPFO---VRDIOKIVPRKPATPTMESASADROLLSEDEOALCSKLOITFKPKPL : 360
Ada2 Sc a02336 : ASTAASLSEGNSRYNSAHSNAEYSONSYENGRKKNMTISQOHAPDYALSNDFOOCLQIKTLKPKYL : 362
Ada2a Hs o75478 : VLOYTODSSACOOWLRROAGTDSGLSPSTPMASNSGRRSAPPLNTGLPGTEKINEKEKELCOMRLVYGAYL : 369
Ada2a Dm xxxxxx : OTDAFDWOOLVOHYESNRSGDGPLAINSKLYMNTTRKASPTIEGDLPGYSKIDGGRKILCSVARIVPOSYL : 475
Ada2b Dm a9vhv0 : -----GHGKTLHQTINAPNNER--SNGSIRGCLTTG--EHAYI : 336
Ada2 Ce a19953 : KFKKWHTGEWFE-----VEEGKDEFSATENLSGFELLSDRKVKVCSNVLNSPMRYL : 565
Ada2 Dr aw421870 : -----KNLAGSKRKG---EDGKDEFAATENLPGFELLSDRKVKVCSNVLNSPMRYL : 325
Ada2b Hs ac048379 : -----KNLASSKRGK---EDGKDEFAATENLPGFELLSDRKVKVCSNVLNSPMRYL : 326
Ada2 Mm be532918 : -----EDGKDEFAATENLPGFELLSDRKVKVCSNVLNSPMRYL : 96
```

a, ADA2a és homológ fehérjék összehasonlítása



b, RPB4 és homológjainak összehasonlítása

2. Függelék



DTL és homológ fehérjéinek összehasonlítása

Summary

The eukaryotic genome is a highly organised unit. Expression of specific genes is restricted in time and space. Gene regulation acts at several levels, e.g. through tissue specific enhancers, boundary elements or basal regulatory factors. To understand the function of a specific gene, it is important to investigate its regulation.

In this work we present a study of two *Drosophila melanogaster* genes. They are located in the F10-11 cytoplasmic region on the 3rd chromosome. The first gene was identified from an RNA binding protein screen where the TAR RNA was the bait, therefore we named it DTL (Drosophila Tat Like). The second gene codes for two proteins via alternative splicing. The first protein showed high similarity to the RNA polymerase II 4th largest subunit (RPB4), the second one resembled the yeast ADA2 protein. We named these proteins RPB4 and ADA2a, respectively. The product of *Dtl* is an RNA-binding protein with limited similarity in its RNA-binding region to that of the TAT protein of human immunodeficiency virus. A mammalian homologue of DTL was identified recently and designated as PIMT, an interacting partner of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-interacting protein. The *Dtl* and the *Ada2a/Rpb4* genes lie very close, in head to head orientation. This observation prompted us to investigate the possible regulatory relationship between them. We determined the transcription initiation site of *Dtl* and *Ada2a/Rpb4* using primer extension and 5'RACE. We found that the transcription start site of the two genes are located only 73 bps from each other.

Using luciferase reporter assays and transgenic flies we demonstrated that the promoter region of *Dtl* is partly within the coding region of *Ada2a/Rpb4*. By electrophoretic mobility shift assay we detected several transcription factor binding sites in the *Dtl* and *ada2/rpb4* promoter regions. *In silico* transcription factor binding site analysis revealed several potential binding sites in this region correlating with the electrophoretic mobility shift assays.

In silico analysis revealed a DNA replication-related element (DRE), binding site of DREF, the protein factor involved in the regulation of a number of genes, which play a role in DNA replication and cell proliferation. With the help of electrophoretic mobility shift assay using anti-DREF antibody and competitor DRE-containing oligonucleotides we proved that this DRE is a bona fide transcription factor binding element. Despite the perfectly symmetrical

DRE, DREF seems to have a more decisive role in *Ada2a/Rpb4* transcription than in the transcription of *Dtl* as indicated by luciferase reporter assays using DRE mutant *Dtl* or *Ada2a/Rpb4* promoter fragments.

Close proximity of the two genes suggested a possible coupled regulation mechanism. According to primer extension experiments the two genes might overlap. Although the 5'RACE did not verify the overlap, using ribonuclease protection assay we detected an overlapping complementary transcript in the *Ada2a/Rpb4* gene. We supposed that an RNA degrading mechanism could serve as a regulatory process controlling the mRNA level of these genes, therefore we tested the stability of the RNAs transcribed from this region in fruitfly embryonic extract. A ³²P-labeled RNA transcribed from the *Ada2a/Rpb4* gene showed degradation in this system while a control RNA remained stable. Using mixed RNAs and 100'000g-sedimented cell extract we showed that the observed RNA degradation was specific and due to a high molecular weight complex.

To study the function of the DTL protein we generated three deletion mutant *Drosophila melanogaster* stocks from a P-element insertion mutant where the P-element insertion was in the 5' untranslated region (UTR) of the *Dtl* gene. In two of these mutants (192 and 58) the deletion affected only the *Dtl* gene; the mutant 189 lacks both the *Dtl* and the *Ada2a/Rpb4* promoter region. Using *ada2a*, *rpb4* and *Dtl* transgenes we determined the mutant phenotypes. The loss of RPB4 causes lethality in the L1 larval stage, the loss of ADA2a results in pupal lethality, while the loss of the DTL protein causes death in the L3 larval stage. The DTL⁻ larvae have vestigial imaginal discs and mitotic abnormalities. During metaphase we found circularised and sausage-like chromosomes stuck together; during anaphase lagging chromosomes and chromosome-bridges were observed.

The *Dtl* gene has a long 5' UTR with an open reading frame (ORF) overlapping the DTL coding ORF. The potential protein coming from this 5' ORF has only one known homologue in the *Drosophila pseudoobscura*, however in rescue experiments both the first and the second ORFs proved to be necessary to rescue the DTL⁻ phenotype, so the 1st ORF seems to play an essential role in the fly's development.

During our work the yeast homologue of DTL was identified as a trimethylguanosine synthase, which plays a role in the maturation of small nuclear and nucleolar RNAs. To verify this observation in *Drosophila* we performed immunohistochemistry and immunoprecipitation experiments with anti-2,2,7-trimethyl guanosine antibody. We could detect either a decreased amount or no trimethylguanosine cap-containing RNAs in the nucleus of *Dtl* mutant larvae from the stock 192 and 58, respectively.