

A dSAGA specifikus hiszton acetiláció génműködés szabályozásban betöltött funkciójának vizsgálata

Doktori értekezés

Készítette: Zsindely Nóra

Témavezető:
Dr. Boros Imre Miklós

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

Szeged
2013.

Tartalomjegyzék

<u>Rövidítések jegyzéke</u>	4
<u>1. Bevezetés</u>	6
1.1 A kromatin szerveződése.....	6
1.2 A nukleoszómák és a hiszton fehérjék szerkezete.....	7
1.3 A hiszton fehérjék posztranszlációs módosításainak a kromatin szerveződésre kifejtett hatásai.....	10
1.4 A hiszton acetiláció és a transzkripció kapcsolata.....	12
1.4.1 A hiszton acetiltranszferázok.....	15
1.4.1.1 A GNAT acetiltranszferáz család.....	16
1.4.1.2 A SAGA komplex.....	18
1.4.1.3 Ada2 adaptor fehérjék.....	19
1.4.1.4. <i>Drosophila</i> Gcn5-tartalmú HAT komplexek.....	20
1.4.1.5. <i>Drosophila</i> ADA2b fehérjék.....	22
<u>2. Célkitűzések</u>	25
<u>3. Felhasznált anyagok és módszerek</u>	26
3.1 Felhasznált <i>Drosophila melanogaster</i> törzsek, keresztezések.....	26
3.2 <i>Drosophila</i> mintagyűjtés.....	27
3.3 Western blot analízisek.....	28
3.4 <i>dAda2b</i> ⁸⁴² mutáns <i>Drosophila</i> lárvák transzkriptom vizsgálata DNS microarray módszerrel.....	29
3.5 Nyálmirigy óriáskromoszóma preparálás és immunfestés.....	30
3.6 Apoptózis kimutatása acridine orange festéssel.....	31
3.7 Kromatin immunprecipitáció.....	31
3.7.1 Kromatin izolálás.....	31
3.7.2 Immunprecipitáció.....	32
3.7.3 DNS-fehérje keresztkötések megszüntetése és DNS tisztítás.....	33
3.8 RNS izolálás és egyes szálú cDNS szintézis.....	33
3.9 Kvantitatív real time PCR (Q-PCR).....	33
<u>4. Eredmények</u>	36
4.1 A dSAGA specifikus H3K9 és K14 acetiláció szabályozása alatt álló gének azonosítása.....	36
4.1.1 <i>dAda2b</i> mutánsok transzkriptum analízise késői L3 lárva és korai báb állapotban.....	36
4.1.2 A dADA2b hiányában a vad típustól eltérő expressziót mutató gének számának meghatározása.....	38
4.1.3 dADA2b-függő expressziót mutató gének funkcionális csoportosítása.....	39
4.2 A dSAGA komplexre specifikus dADA2b alegység két izoformájának a dSAGA működésében betöltött funkciója.....	42
4.2.1 A dADA2b izoformák expressziójának vizsgálata.....	42
4.2.2 A dADA2b rövid izoforma funkcionális vizsgálata.....	44
4.2.2.1 A dADA2b izoformák vizsgálatához használt transzgenikus törzsek jellemzése.....	44
4.2.2.2 A dADA2bS hatása a <i>dAda2b</i> ⁸⁴² deléció letális fenotípusára.....	45

4.2.2.3 A dADA2bS izoforma szerepe a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció létrehozásában.....	46
4.2.2.4 A dADA2bS izoforma szerepe a Dmp53 által irányított apoptotikus folyamatok szabályozásában.....	47
4.2.3 A dADA2bS izoforma transzkripció szabályozásra kifejtett hatásának vizsgálata.....	49
4.3 A dSAGA komplex által létrehozott H3K9 acetiláció a génexpresszió szabályozásában betöltött szerepének meghatározása.....	50
4.3.1 A CHIP kísérletben vizsgált gének jellemzése.....	50
4.3.2 A RNS polimeráz II mennyiségének meghatározása a módosult transzkripciót mutató gének területén.....	52
4.3.3 A dADA2b fehérje kötődésének meghatározása a dSAGA-függő, valamint a dSAGA-független gének területén.....	53
4.3.4 A dSAGA specifikus H3K9 acetiláció szintje az eltérő irányú transzkripció változást mutató dSAGA-függő gének területén.....	53
4.4 A dSAGA specifikus H3K9 acetiláció génaktivációban betöltött szerepének vizsgálata.....	57
4.4.1 A H3K9 acetiláció szintjének meghatározása az aktivált hősokk gének területén.....	57
4.4.2 A génaktivációt kísérő H3K9 acetilációs mintázat meghatározása az <i>Eip74EF</i> és <i>Eip75B</i> ekdizon indukált korai géneken.....	58
4.4.3 Az <i>Eip74EF</i> és <i>Eip75B</i> gének aktivációja során megjelenő H3K9 acetilációs mintázat létrehozásáért felelős HAT azonosítása.....	62
4.4.4 A dSAGA specifikus H3K9 acetiláció szerepe az <i>Eip74EF</i> és <i>Eip75B</i> ekdizon indukált gének aktivációjában.....	63
<u>5. Eredmények megvitatása</u>	65
5.1 A dSAGA acetiltranszferáz komplex szabályozása alatt álló gének.....	66
5.2 A dSAGA komplexre specifikus dADA2b alegység rövid izoformájának szerepe a dSAGA működésében.....	66
5.3 A dSAGA komplex és az általa létrehozott H3K9 acetiláció szerepe a génexpresszió szabályozásában.....	68
5.4 A dSAGA specifikus H3K9 acetiláció szerepe a génaktiváció folyamatában.....	70
5.5 A dSAGA specifikus hiszton acetiláció feltételezett funkciója a génműködés szabályozásában.....	71
<u>6. Köszönetnyilvánítás</u>	74
<u>7. Irodalomjegyzék</u>	75
<u>8. A doktori értekezés összefoglalója</u>	81
<u>9. Summary</u>	87
<u>10. Függelék</u>	92

Rövidítések jegyzéke

ADA2: alternation/deficiency in activation-2
ADA3: alternation/deficiency in activation-3
AMP: AntiMikrobiális Peptid
AttD: Attacin-D
ChIP: kromatin immunprecipitáció
cnc: cap and collar
CycB: cyclin B
dATAC: ADA two a containing
DUBm: deubiquitinációs modul
E(y)2: Enhancer of yellow 2 *Drosophila*
FCS: Foetal Calf Serum
Fst: Frost
Gcn5: general control nonderepressible 5
GNAT: Gcn5-related N-acetyltransferase
HAT: hisztin acetyltranszferáz
HDAC: hisztin deacetiláz
Hus: Hus1-like
ISWI: imitation switch
MYST: MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, Tip60
NAC: No Antibody Control
Nonstop: *Drosophila* analog of Ubp8
NuA4: nucleosome acetyltransferase of H4
p300/CBP: protein of 300 kDa and CREB-binding protein
PCAF: p300/CBP-associated factor
Rpd3: reduced potassium deficiency 3
RpL32: Ribosomal protein L32
RpS23: Ribosomal protein S23
SAF6: SAGA factor-like TAF6
SAGA: Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase
SANT: Swi3-Ada2-NCoR-TFIIB
Sgf: SAGA-associated factor

SpEv: Spiracle Everted

Spt: suppressor of Ty element

SRC: steroid receptor coactivator

sug: sugarbabe

Sus1: S1 gene upstream of ySa1

SWI/SNF: switch/sucrose nonfermentable

SWIRM: Swi3p-Rsc8p-Moira

TAF: TATA box-binding protein-associated factor

TBP: TATA Binding Protein

TFIID: Transcription Factor II D

TIC: Total Input Control

Ubp8: ubiquitin-specific processing protease 8

Wda: will decrease acetylation

wL3: vándorló L3 lárvastádium

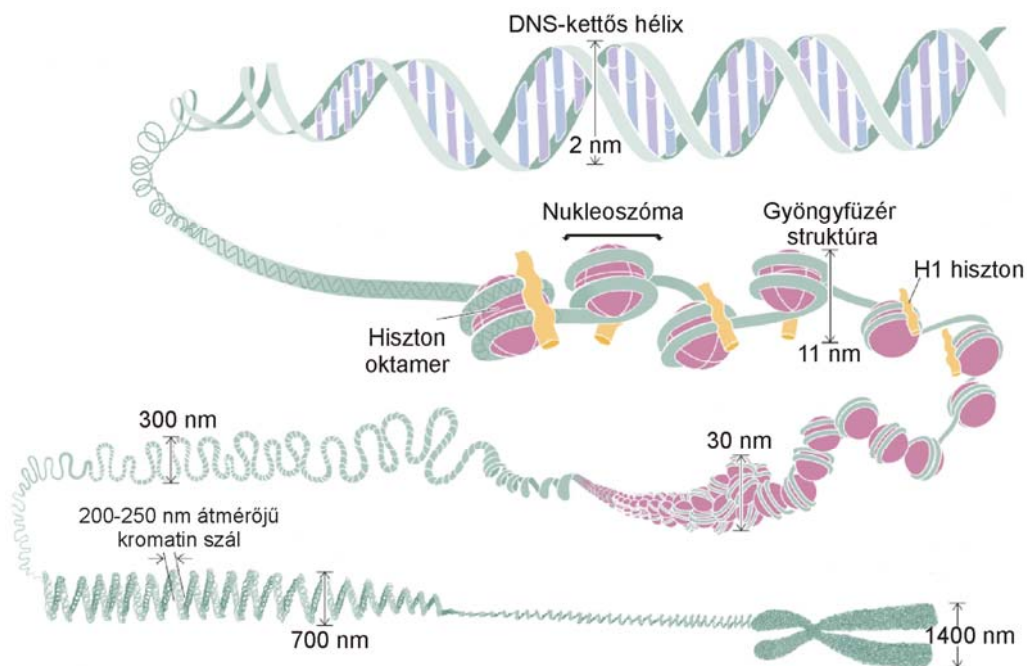
1. Bevezetés

1.1 A kromatin szerveződése

Nagymértékű, rendezett tömörítésre van szükség ahhoz, hogy az eukarióta sejtek méteres nagyságrendű DNS állománya beférjen a mikrométeres méretű sejtmagba. Ugyanakkor a genomot templátul használó vagy az azt módosító, a sejt működéséhez alapvető fontosságú folyamatok (transzkripció, replikáció, rekombináció és hibajavítás) hibátlan megvalósulásához ennek a tömörítésnek rendkívül szabályozottnak és dinamikusnak kell lennie. A genom nagymértékű, ugyanakkor dinamikus összetömörítését a különböző fehérje faktorok közreműködésével létrejövő kromatinszerkezet biztosítja. A tömörítés első lépéseként számos, erősen bázikus tulajdonságú hiszton fehérje kapcsolódik a DNS-hez, létrehozva ezzel a kromatinszerkezet ismétlődő alapegységét, a nukleoszómat [1]. A nukleoszóma négy, ún. „core” hiszton fehérje (H2A, H2B, H3 és H4 hiszton) által kialakított hiszton oktamerből, valamint az arra rátekeredő 147 bázispárnyi DNS-ből épülnek fel. Minden nukleoszóma egy 10-60 bázispár hosszúságú, összekötő (linker) DNS szakasz választ el egymástól. A tömörítésnek ez az első lépése egy 11 nm átmérőjű kromatinszál kialakulását eredményezi, amelyet gyöngyfűzér struktúrának nevezünk [2]. A DNS-nek ez a csomagolása bizonyos faktorok számára, például a replikáció során a DNS polimeráz számára még hozzáférhetőséget biztosít, ugyanakkor már bizonyos védelmet is nyújt a DNS károsodásokkal szemben. A tömörítés következő lépésében a szomszédos nukleoszóma között kialakuló kapcsolatok révén a gyöngyfűzér struktúra spirálszerűen feltekeredik, és egy tömörebb, 30 nm átmérőjű kromatinszálból felépülő szerkezet alakul ki. Az interfázis során a genom nagy része ennél a 30 nm-es szálnál kompaktabb, 110-170 nm átmérőjű kromatinszálakba tömörül. A sejtosztódás során további tömörítési lépések mennek végbe, míg végül kialakulnak a metafázisra jellemző kromoszómák, amelyek mintegy 10000-szeres kompaktálódásnak felelnek meg [3] (1. ábra).

Általánosságban elmondható, hogy ez a tömör kromatin struktúra gátolja a DNS szálon lezajló folyamatok (DNS replikáció, DNS hibajavítás és transzkripció) jelentős részét, mivel ebben a formában a DNS szál nem hozzáférhető az ezeket a folyamatokat végző fehérje faktorok számára. Ezért a sejt normális működéséhez a tömör kromatinszerkezet létrejöttének és felbomlásának rendkívül dinamikus folyamatnak kell lennie. Például az interfázis során

rendkívül erősen expresszálódó gének területén az átírást végző RNS polimeráz kötődésének idejére akár a 10 nm átmérőjű, nyitott kromatin struktúra is kialakulhat, ugyanis a polimeráz DNS-hez kapcsolódása megakadályozza a kompaktabb szerkezet azonnali visszarendeződését. Ezzel szemben a sejtsztódás profázisában a genom egy része a nagyfokú tömörítés eredményeképpen már 200-250 nm átmérőjű kromatin szálak formájában jelenik meg [3]. Ez a dinamikusan átrendeződő kromatinszerkezet egyben egy fontos szabályozó szerepet is betölt a DNS replikáció, a DNS hibajavítás valamint a transzkripció folyamatának szabályozásában.



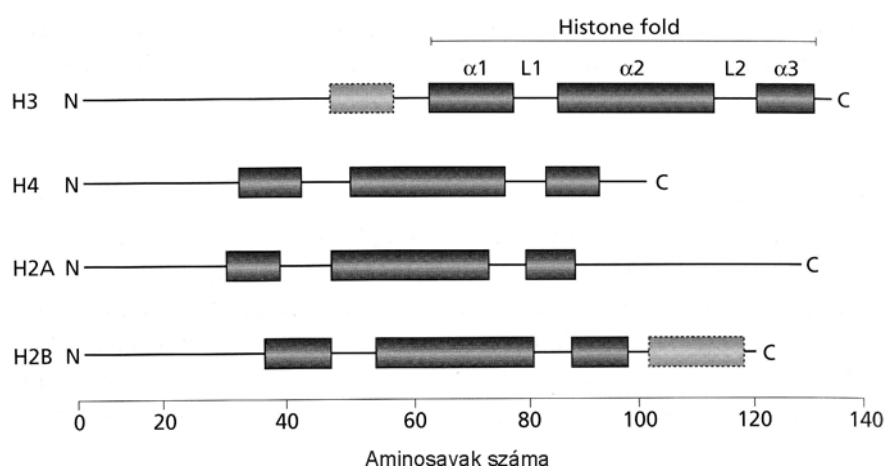
1. ábra: A kromatin szerveződése

A sematikus ábrán a kromatin szerveződésének különböző szintjei láthatóak. Az ábra a [4] forrás alapján készült.

1.2 A nukleoszómák és a hiszton fehérjék szerkezete

A nukleoszómákban két H2A-H2B dimerből, valamint két-két H3-H4 fehérjéből összeálló (H3-H4)₂ tetramerből felépülő hiszton oktamer köré a 147 bp hosszúságú DNS 1 és $\frac{3}{4}$ balmenetes szuperhelikális fordulattal tekeredik fel [5]. Az oktamert felépítő „core” hisztonok evolúciósan rendkívül konzervált szerkezetű fehérjék, több α -helikális régióval rendelkeznek, amelyek két fontos szerkezeti elem, az ún. „histone fold” domén, valamint a „histone handshake” szerkezet kialakításában vesznek részt. Mind a négy „core” hiszton esetében a „histone fold” domén három – egy hosszabb és két rövidebb – α -hélixből épül fel,

amelyeket nem-helikális szerkezetű, ún. „loop” régiók választanak el egymástól (2. ábra). A H3-H4, illetve a H2A-H2B dimerek kialakításához a hasonló szerkezetű „histone fold” doménjeiken keresztül kapcsolódnak egymáshoz a H3 és H4, illetve a H2A és H2B fehérjék, és létrehozzák a hiszton fehérjéket összekapcsoló, ún. „histone handshake” szerkezetet (3. ábra). A „histone fold” domének felelősek a DNS kötéséért is, amely során a DNS kis árka hidrogén-híd vagy ionos kölcsönhatások révén kapcsolódik a hiszton oktamerhez. Ennek során a hisztonok α -helikális és a köztes „loop” régiói alakítanak ki kapcsolatot a DNS foszfodiészter gerincével, így a hiszton oktamer minden DNS szekvenciához hasonló erősséggel képes kötődni [6].

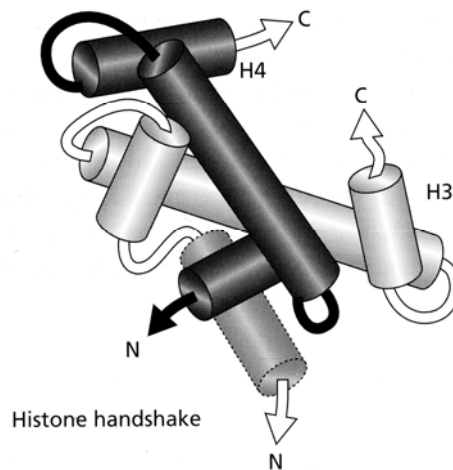


2. ábra: A „core” hiszton fehérjék doménszerkezetének sematikus rajza

A sötétszürke téglalapok a hiszton fehérjék közötti kapcsolatot kialakító „histone fold” régiót alkotó α -héliceket ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) jelölik. Az L1 és L2 rövidítések a héliceket elválasztó, nem-helikális szerkezetű „loop” régiókat jelölik. A H3 és H2B fehérjénél látható világosszürke téglalapok azoknak az α -helikális szerkezeteknek az elhelyezkedését mutatja, amelyek nem vesznek részt a „histone fold” domén kialakításában [7].

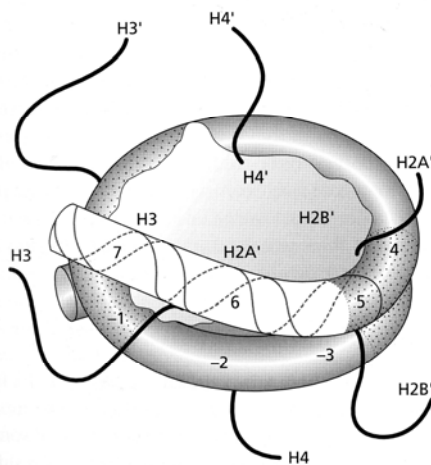
Mind a nyolc „core” hiszton fehérje esetében kiemelkedik a nukleoszómák felszínéről egy 20-35 aminosav hosszúságú, bázikus aminosavakban gazdag N-terminális domén (ún. hiszton fark). A „histon fold” doménekhez hasonlóan ezek a régiók is evolúciósan erősen konzerváltak, viszont aminosav-összetételük alapján nem rendelkeznek tipikus másodlagos szerkezeti motívumokkal, általában ún. „random coil” szerkezetet vesznek fel. A H3 és H2B hisztonok N-terminális doménje a hiszton oktamerre kétszeresen feltekeredő DNS szál csavarulatai között, míg a H4 és H2A fehérjék N-terminális végei a nukleoszómális DNS kis árka mentén, a „core” partikulum tetején és alján emelkednek ki a nukleoszóma síkjából (4. ábra). Ezeken felül a H2A hiszton egy rövidebb (15 aminosavból álló), felxibilis C-terminális doménnel is rendelkezik, amely a nukleoszómális DNS be- és kilépési pontjánál hagyja el a nukleoszóma felszínét [6]. Ezek a nukleoszómák síkjából kiemelkedő hiszton terminális

domének fontos szerepet töltenek be a szomszédos nukleoszómák között létrejövő kapcsolatok kialakításában, és ezáltal nagyban hozzájárulnak a tömörebb vagy lazább kromatinszerkezet kialakításához [8].



3. ábra: A H3 és a H4 hiszton fehérje összekapcsolódása során létrejövő „histone handshake” szerkezet

A szürke hengerek a H3 és a H4 hiszton fehérjék „histone fold” doménjeit felépítő α -hélixeket jelölik [7].



4. ábra: A nukleoszómákat alkotó hiszton fehérjék N-terminális doménjeinek elhelyezkedése a nukleoszómákban [7]

A hiszton fehérjéken rendkívül sokféle poszttranszlációs módosítás jelenhet meg (1. táblázat). Ezek a módosítások elsősorban a hisztonok N-terminális régióján történnek, de számos, a globuláris domén területén megjelenő módosítást is azonosítottak [2]. A H3, a H2A és a H2B hisztonok rövidebb, C-terminális doménjén eddig csak néhány poszttranszlációs módosítást azonosítottak, mint például a H2A 119-es, illetve a H2B 120-as lizinjén megjelenő ubiquitin módosítást [9].

Módosítás	Aminosav	Hisztion	Példa
acetiláció (ac)	lizin (K)	H2A, H2B, H3, H4	H3K14ac
metiláció (me)	lizin (K)	H3, H4	H3K9me3
	arginin ('R)	H3, H4	H3R17me
foszforiláció (ph)	szerin (S)	H2B, H3, H4	H3S10ph
	treonin (T)	H3	H3T3ph
ubiquitináció (ub)	lizin (K)	H2A, H2B	H2BK120ub
sumoiláció (su)	lizin (K)	H2A, H2B, H4	H2BK6su
ADP-riboziláció (ar)	glutaminsav ('E)	H2A, H2B, H3, H4	H2BE2ar1
deimináció (cit)	arginin ('R)	H3, H4	H3R2cit
izomerizáció (iso)	prolin (P)	H3	H3P38iso

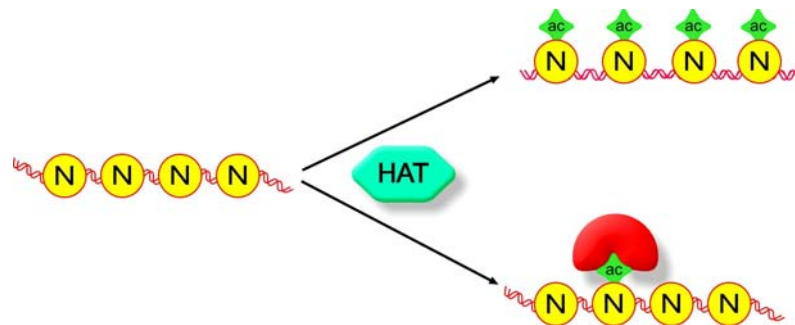
1. táblázat: A hiszton fehérjéken megjelenő leggyakoribb poszttranszlációs módosítások
A táblázat összeállítása a [10] és a [11] források alapján történt.

1.3 A hiszton fehérjék poszttranszlációs módosításainak a kromatin szerveződésére kifejtett hatásai

A hiszton fehérjék N-terminális régióján lejátszódó poszttranszlációs módosítások egyike azoknak a folyamatoknak, amelyek hozzájárulnak a kromatinszerkezet dinamikus átalakításához. A szakirodalom jelenleg többféle modellel magyarázza azt, hogy ezek a poszttranszlációs módosítások hogyan vesznek részt a génműködés szabályozásában, viszont a pontos mechanizmus még nem ismert. Számos kísérletes bizonyíték támasztja alá mind egy *cisz*, mind egy *transz* hatású mechanizmus működését.

A *cisz* mechanizmus modellje szerint a létrejövő módosítások a hiszton-DNS vagy hiszton-hiszton kölcsönhatás módosításán keresztül megváltoztatják a nukleoszómák szerkezetét, valamint a nukleoszómák között kialakult kapcsolatokat, amely hatások végül a kromatinszerkezet átrendeződéséhez vezetnek [11] (6. ábra). A hisztonok acetilációja és foszforilációja csökkenti a hisztonok pozitív töltését, ezáltal meggyengíti a hiszton fehérjék és a negatív töltésű DNS közötti kölcsönhatást, ami az internukleoszómális kapcsolatok gyengüléséhez vezet. A hisztonok N-terminális doménjének acetilációja maguknak a nukleoszómáknak a stabilitását nem befolyásolja, viszont az adott nukleoszómát felépítő hiszton oktamer és a szomszédos „linker” DNS közötti kapcsolatot gyengíti, és ezáltal gátolja a tömörebb kromatinszerkezet kialakulását [12]. Ennek következtében a hisztonok hiperacetilált állapotát egy nyitottabb, aktívabb kromatinszerkezettel, míg hipoacetilált állapotát egy tömörebb, represszív struktúrával hozzák összefüggésbe. *In vitro* kísérletek azt mutatták, hogy a H4 hiszton fehérje N-terminális doménjének acetilációs állapota (16-25. aminosavakon) meghatározó szerepet tölt be a kompaktabb kromatinszerkezet kialakításában,

ugyanis ezek a bázikus aminosavak kölcsönhatnak a szomszédos nukleoszóma H2A-H2B dimerjének savas aminosavaival [6]. A H4 hiszton 16-os lizinjének acetilációja csökkenti a kromatin szálak közötti kölcsönhatások létrejöttét, ezáltal gátolja egy tömörebb kromatin struktúra kialakulását [13]. Az ilyen *cisz* mechanizmusú hiszton módosítások általában kumulatív módon fejtik ki hatásukat a kromatin szerveződésére [14].



5. ábra: A hiszton acetiláció a kromatin szerveződésére kifejtett *cisz* illetve *transz* mechanizmusa (HAT=hiszton acetiltransferáz, ac= acetiláció, N=nukleoszóma)

Egy másik elképzelés szerint a hisztonok poszttranszlációs módosításai egy *transz* mechanizmus által hatnak a kromatinszerkezetre. Eszerint a modell szerint a hisztonokon megjelenő módosítások különböző nem-hiszton fehérjék – például kromatinszerkezetet átrendező komplexek vagy transzkripció faktorok – kötőhelyeül szolgálnak (5. ábra). A poszttranszlációs módosítások egy összetett kódot hoznak létre, amelyek speciális mintázatát az arra specifikus hiszton-kötő doméneket tartalmazó fehérjék felismerik. Ilyen, módosított hiszton fehérjét kötő fehérjedomén például a metilált lizint felismerő kromodomén, vagy az acetilált lizint felismerő bromodomén [15]. Ezek a fehérjék általában csak egy meghatározott pozícióban megjelenő módosítást ismernek fel, mint ahogyan a HP1 fehérje kromodoménje specifikusan a 9-es lizinjén trimetilált H3 hisztonokat ismeri fel és köti. A nem-hiszton fehérjék által felismert módosítási mintázatok lehetnek ugyanazon a hiszton fehérjén, ekkor *cisz* mintázatról beszélünk, míg ha különböző hiszton fehérjéken jelennek meg, akkor *transz* mintázatról beszélünk. A *cisz* mintázat egyik jól jellemzett példája a H3 hiszton fehérje 10-es szerinjének foszforilációja (H3S10ph) és a 14-es lizinjének acetilációja (H3K14ac) közötti kapcsolat, amikor is a H3S10 foszforiláció fokozza a 14-es lizint acetilációját végző enzim nukleoszómához kötődését [16]. Ugyancsak *cisz* típusú módosítási mintázat jön létre a CBP acetiltransferáz és a CARM1 metiltransferáz együttműködése révén. Ennek során ösztrogén stimuláció hatására a CBP a kromatinhoz kötődik és a H3 hiszton 18-as, majd a 23-as lizinjét acetilálja, amely elősegíti a CARM1 metiltransferáz kromatinhoz kötődését és a 17-es

arginin metilációját [17]. A különböző hiszton fehérjéken megjelenő, ún. *transz* mintázat egyik példája, hogy a H3 hiszton 4-es lizinjén történő metiláció előfeltétele a H2B hiszton 123-as lizinjének előzetes ubiquitinációja [18].

Ez utóbbi modellen alapszik a hiszton kód hipotézis, mely szerint a hisztonok különböző aminosavain megjelenő módosítások kombinációja egy kódként szolgál ahhoz, hogy az adott biológiai folyamat megvalósulásához szükséges kromatinszerkezet kialakuljon. Ezt a kódot egymással antagonista hatású enzimek „írják” illetve „törlik”, specifikus felismerő fehérjék „fordítják le”, amely során indukálják a kódnak megfelelő kromatinszerkezet kialakítását [19]. A felismerést és „fordítást” végző fehérjék lehetnek további hiszton módosító enzimek, vagy a nukleoszómákat ATP-ből származó energia felhasználásával elmozdító fehérjék, ún. „ATP-függő kromatin remodeling komplexek”, illetve a különböző funkcióval rendelkező hiszton variánsok kromatinba épülését elősegítő faktorok is [20]. A legegyszerűbb kódot az jelentené, ha egy adott módosítás közvetlenül egy adott folyamattal lenne összekapcsolható, mint például ha egy adott hiszton módosítás megjelenésének a következménye minden esetben a génaktiváció lenne [21]. Valójában a kód nem ennyire egyszerű, ugyanis előfordul, hogy ugyanaz a módosítás több, különböző jelentéssel is bír, mint például a H3 hiszton 10-es szerinjének foszforilációja egyrészt kódként szolgál a transzkripció aktivációjához szükséges nyitott kromatinszerkezet kialakításához, másrészt a sejtosztódás során kialakuló, rendkívül tömör kromatin kialakításában is részt vesz [22].

1.4 A hiszton acetiláció és a transzkripció kapcsolata

A hiszton fehérjék acetiláltsági állapota a kromatinszerkezet szabályozásának egy igen fontos eleme, és számos folyamat során, mint például a DNS replikáció, a rekombináció, a DNS hibajavítás és a transzkripció, is fontos funkciót lát el. Az acetiláltsági állapotot egymással antagonista hatású hiszton acetiltransferáz (HAT) és hiszton deacetiláz (HDAC) komplexek alakítják ki és tartják fenn a sejtben.

Az egyik hiszton acetiláció által szabályozott folyamat a nukleoszómák összeszerelése, a kromatinszerkezet felépülése. A sejtciklus szintézis fázisában a kromatinba történő beépítéshez az újonnan képződő hiszton fehérjék egy acetilációs mintázatot kapnak, amely a beépítést segítő hiszton chaperon fehérjék számára jelként szolgál az újonnan

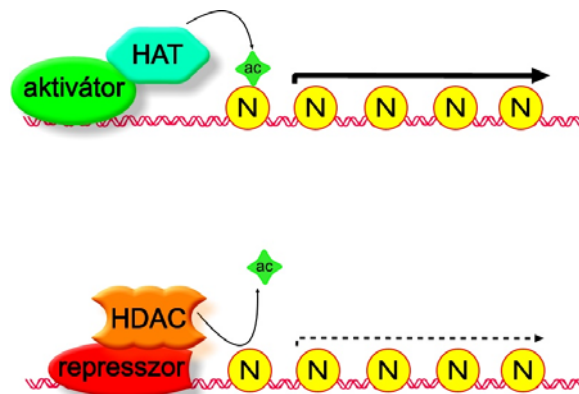
szintetizált hiszton fehérjék azonosítására. A beépítést követően HDAC komplexek rövid időn belül (kb. 20 perc) eltávolítják ezt a módosítási mintázatot [23].

A hisztonok acetilációs állapota a kromatin dekonzenzációja során is fontos szabályozó funkcióval bír, a hiperacetilált állapotot egy nyitottabb, fellazult kromatinszerkezettel, míg a hipoacetilált nukleosómákat egy tömörebb, zártabb szerkezettel hozzák összefüggésbe. A pontos mechanizmus, amellyel az acetiláció hozzájárul a kromatin tömörségének módosításához részleteiben még nem ismert. Számos kísérletes bizonyíték igazolja a fent említett közvetlen, illetve a felismerő fehérjék által megvalósuló mechanizmusok működését is. Az acetilációnak a hisztonok pozitív töltését neutralizáló hatását és ennek funkcionális jelentőségét támasztják alá a H3 hiszton 56-os lizinének acetilációjával kapcsolatos megfigyelések. A H3 hiszton 56-os lizin aminosava a globuláris domén területén, a nukleosóma azon részén található, ahol a DNS be-, illetve kilép a nukleosómából. Ezen aminosav acetilálódásakor bekövetkező töltésváltozás miatt gyengül a DNS és a hiszton oktamer közötti kapcsolat, amely destabilizálja a nukleosómát [24]. Az acetiláció úgy is hozzájárul a kromatinszerkezet felnyitásához, hogy a hisztonokon megjelenő acetilációs mintázat kötőhelyül szolgál különböző, a génaktivációban részt vevő, bromodoménnel rendelkező fehérjék számára. Az SWI/SNF (switch/sucrose nonfermentable) kromatin remodeling complex is rendelkezik bromodoménnel, amellyel csak a SAGA (Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase) és NuA4 (nucleosome acetyltransferase of H4) HAT-ok által acetilált nukleosómákhoz képes stabilan kötődni, majd a transzkripció aktivációjához ATP energiájának felhasználásával eltávolítja azokat [25]. Ezzel ellentétesen az acetilációs mintázat eltávolítása egyrészt gátolja az acetiláz kötő transzkripciós faktorok és koaktivátorok kötődését, valamint elősegíti SANT (Swi3-Ada2-NCOR-TFIIB) domént tartalmazó, represszor fehérjék kötődését. A SANT domén számos korepresszor fehérjében előforduló motívum, amelynek azt a funkciót tulajdonítják, hogy felismeri és kötődik a poszttranszlációban nem módosított hiszton fehérjékhez [26]. Nemcsak represszorokra, hanem a transzkripciós gátlást közvetítő fehérjékre is jellemző a SANT domén, például a gátlást megvalósító kromatin remodeling komplex, az ISWI (imitation switch) is tartalmaz nem-acetilált hisztonokat kötő SANT domént [27].

Az acetilációnak génműködés szabályozásában betöltött szerepére az első közvetlen bizonyítékot a nukleosómális hisztonok acetilációját és deacetilációját végző enzimek azonosítása adta. Az elsőnek azonosított HAT enzim, a p53 élesztő homológjáról (yGcn5 - general control nonderepressible 5) már korábban kimutatták, hogy kölcsönhat transzkripciós aktivátorokkal [28], míg az első hiszton deacetiláz enzimet, az Rpd3 fehérjét korábban

transzkripciós represszorként azonosították élesztőben (yRpd3 - reduced potassium deficiency 3) [29]. Azóta több, jól ismert transzkripciós koaktivátor és korepresszor fehérjéről kimutatták, hogy vagy kölcsönhat, vagy rendelkezik HAT illetve HDAC enzimatis aktivitással, amelyek alapvető jelentőséggel bírnak a génexpresszió szabályozásában [30].

Az acetiláció-deacetiláció folyamata kétféle módon járul hozzá a transzkripció szabályozásához: egyrészt kimutatható egy irányított, különböző szabályozó szekvenciákon megjelenő acetiláció, valamint egy általános, az egész genomra kiterjedő acetilációs mintázat is. A HAT és HDAC komplexek egyrészt irányítottan, a transzkripciót szabályozó fehérjékkel – aktivátorokkal vagy represszorokkal – együtt közvetlenül kötődnek a gének szabályozó szekvenciáihoz és specifikusan ezeken a helyeken módosítják a hisztonokat és ezáltal hozzájárulnak a kromatinszerkezet megváltoztatásához [13]. A hiszton acetiláció ilyen jellegű transzkripciós szabályozó szerepéről a következő elképzelés született: a transzkripciós aktivátor fehérjék DNS-hez kötődése kiváltja a HAT-ok kromatinhoz kötődését, amelyek a nukleoszómális hisztonok acetilációján keresztül egy, a transzkripcióhoz szükséges nyitottabb kromatinszerkezetet hoznak létre. Ez a specifikus acetilációs mintázat további HAT-ok, transzkripciós faktorok vagy kromatin remodeling komplexek kötődésén keresztül egy nyitottabb kromatinszerkezet kialakulásához vezet, amely lehetővé teszi a transzkripció iniciációját. Ezzel ellentétesen a transzkripciós represszor fehérjék szabályozó DNS szekvenciákhoz kötődése HDAC fehérjék kapcsolódását váltja ki, amelyek a nukleoszómális hisztonok acetiláltságát csökkentve egy tömörebb, transzkripciósan inaktív kromatinszerkezet kialakítását indukálják [21] (6. ábra).



6. ábra: A DNS-kötő transzkripciós faktorok hiszton acetiltransferázok (HAT) és hiszton deacetilázok (HDAC) segítségével alakítják ki a működésüknek megfelelő kromatinszerkezetet. (ac= acetiláció, N=nukleoszóma)

Emellett mind a HAT, mind a HDAC komplexek részt vesznek a szekvencia specifikustól mentes, az egész genomra kiterjedő, általános acetilációs mintázat kialakításában is [13]. Az élesztő yGcn5 HAT-ról kimutatták, hogy a koaktivátor funkciója mellett részt vesz egy ilyen jellegű általános acetilációs mintázat kialakításában is, amely során mind kódoló, mind intergenikus régiókban nagy, összefüggő kromatin domének acetilációját végzi [31]. A transzkripció aktivátorok által irányított acetilációhoz hasonlóan ez az általános acetiláció is fokozza a génexpressziót, például a yGcn5 által létrehozott általános acetiláció a *PHO5* és más promóterek transzkripció alaktivitását is növelte [32]. Az elmúlt évtized során a hiszton acetiláció szerepét intenzíven vizsgáló tanulmányok azt az elképzelést alakították ki, hogy az acetiláció génaktivációt, míg a deacetiláció repressziót eredményez, viszont a legújabb eredmények azt mutatják, hogy ez a folyamat korántsem ennyire egyszerű. A Pho4 aktivátor fehérje a még represszált állapotú *PHO5* promóterhez kötődésének a NuA4 HAT komplex által létrehozott acetiláció az előfeltétele [33]. Ebben az esetben úgy tűnik, hogy a NuA4 komplex általi acetiláció megteremti a gén indukálhatóságát, míg egy másik HAT, a SAGA komplex működése révén aktiválódik a *PHO5* gén [34]. Ehhez hasonlóan számos más indukálható promóter esetében azt tapasztalták, hogy még a represszált állapotukban, a későbbi aktiválhatóságuk céljából acetiláltak [31]. Ezekhez az eredményekhez hasonlóan számos HDAC-ról is kiderült, hogy a transzkripció iniciációja során is fontos funkciót látnak el. Például a Hos2 HDAC hiányában több, aktívan átíródó gén kódoló régióján megemelkedik a H3 és H4 hisztonok acetilációja, és ezzel együtt zavart szenved ezen gének transzkripciójának aktivációja [35]. Az ozmotikus stressz, valamint a hőshock által indukált gének aktivációja során az Rpd3 HAT kötődik ezekhez a génekhez, amelyek területén a H4 acetiláció szintje le is csökken [36]. Hogy hogyan valósul az meg, hogy ugyanannak a HAT-nak illetve HDAC-nak a működése egyszer génaktivációt, máskor pedig repressziót eredményez, még nem tisztázott.

1.4.1 A hiszton acetiltransferázok

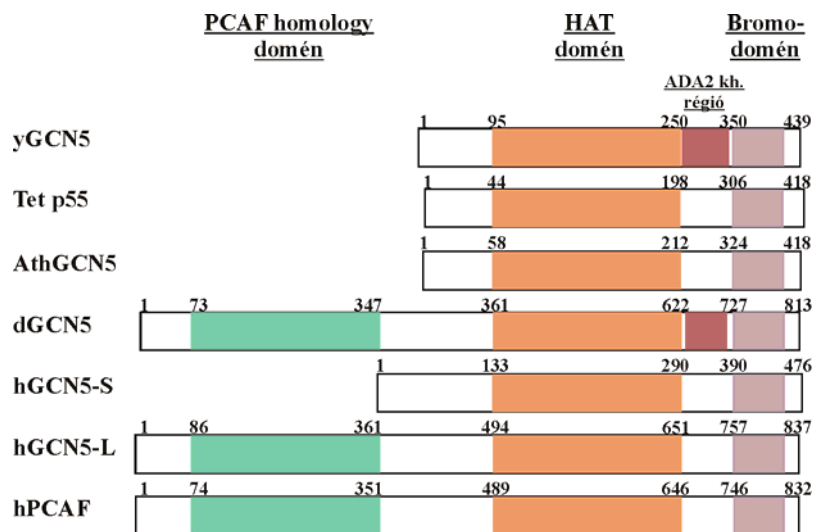
A HAT fehérjék acetilcsoport áthelyezését katalizálják acetil-koenzim A-ról a hiszton fehérjék lizin aminosavainak ϵ -amino csoportjaira. Az alapján, hogy a kromatinszerkezetbe beépült hisztonokat módosítanak-e, két nagy csoportját különítjük el a HAT-oknak. Az A-típusú HAT-ok sejtmagi elhelyezkedést mutatnak és a nukleoszómális hisztonokat acetilálják, így a transzkripció folyamatával összefüggő hiszton acetiláció létrehozásáért felelősek. Ezzel

szemben a B-típusú HAT-ok a citoplazmában az újonnan szintetizálódott hiszton fehérjéket módosítják, és ezáltal az új hisztonok nukleosómákba épülését segítik elő [37].

A hiszton acetiltransferáz fehérjék másik típusú csoportosítása a katalitikus doménjükben megjelenő hasonlóságok alapján történik [38]. Ezek alapján a HAT-ok öt nagy fehérjecsaládba oszthatók, ezek a GNAT (Gcn5-related N-acetyltransferase) család, a MYST (MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, Tip60) család, a p300/CBP (protein of 300 kDa and CREB-binding protein), a TAF1 (TATA box-binding protein-associated factor 1) és az SRC (steroid receptor coactivator) család [39].

1.4.1.1 A GNAT acetiltransferáz család

A GNAT családba tartozó fehérjék közös jellemzője, hogy az acetiltransferáz doménjükben megtalálható három vagy négy, egyenként 15-33 aminosavból álló konzervált motívum [40]. Ezen felül a család számos tagjánál megtalálhatóak hasonló szerkezetű és funkciójú domének, mint például az Ada2 (alternation/deficiency in activation-2) koaktivátorral kölcsönható régió, vagy a C-terminálisan elhelyezkedő bromodomén, amely a nukleosómális hisztonok acetilált lizinjeihez képes kötődni (7. ábra) [40]. A család egyik legismertebb és legjobban jellemzett tagja – amelyről a család a nevét is kapta – a *Saccharomyces cerevisiae*-ben transzkripció aktivátorként azonosított yGcn5 fehérje. A yGcn5 fehérje *Tetrahymena thermophila* homológja volt az első enzim, amely A-típusú hiszton acetiltransferáz enzimaktivitását kimutatták, és ezzel igazolták a közvetlen kapcsolatot a hiszton acetiláció és a transzkripció szabályozása között. Ezen HAT funkció evolúciósan erősen konzervált tulajdonságát mutatja, hogy azóta számos modellorganizmusban (például *Arabidopsis*-ban, *Drosophila*-ban, egérben, emberben is) azonosították a yGcn5 fehérje homológját [41]. A *Drosophila* (d) Gcn5 fehérje a yGcn5 fehérjéhez hasonlóan rendelkezik a családra jellemző, konzervált HAT doménnel, egy bromodoménnel [42]. Emellett a dGcn5 esetében is a HAT és bromodomén közötti, közel 100 aminosavas régió tehető felelőssé az ADA2 fehérjékkel létező kölcsönhatás kialakításáért [43, 44]. Ezen felül a dGcn5 fehérje N-terminális végén található egy, a humán PCAF (p300/CBP-associated factor) fehérje N-terminális doménjével nagyfokú homológiát mutató ún. PCAF homology domén. A humán PCAF HAT esetében ez a régió a CBP/p300 hiszton acetiltransferázzal való kölcsönhatás kialakításáért felelős [42].



7. ábra: A GNAT családba tartozó homológ Gcn5 hiszton acetiltransferáz fehérjék doménszerkezete

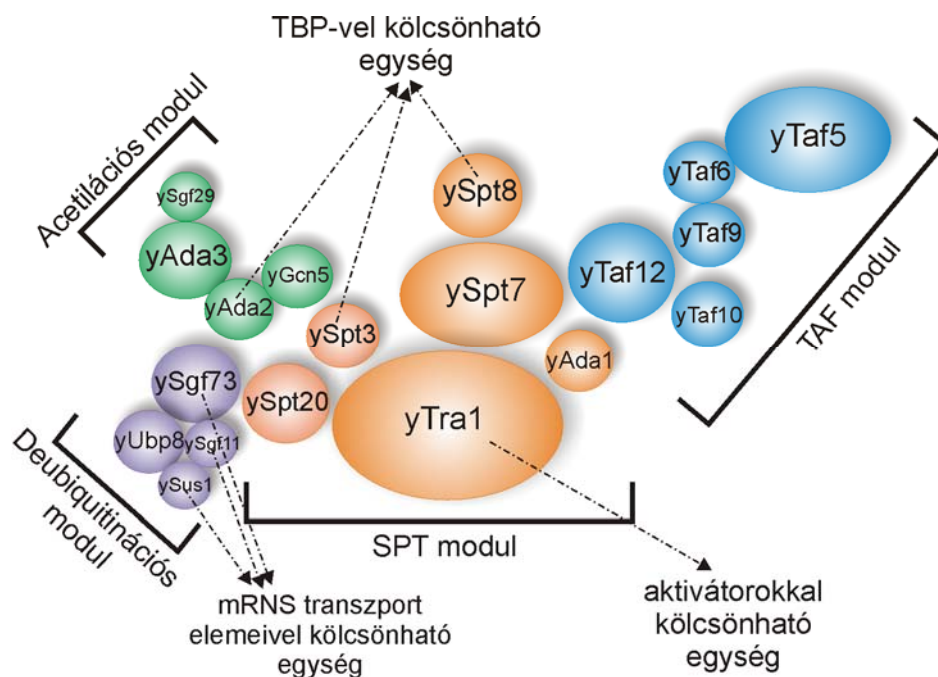
A humán (h), a *Drosophila* (d), a *Saccharomyces cerevisiae* (y), a *Tetrahymena thermophila* (Tet) és az *Arabidopsis thaliana* (Ath) Gcn5 fehérjék esetében a GNAT családra jellemző HAT, Bromo- és PCAF homology domének elhelyezkedése látható. Az ábra a [42] és [44] források alapján készült.

A legtöbb hiszton acetiltransferáz enzim *in vivo* nem önmagában, hanem több alegységes fehérje komplex tagjaként fordul elő. A komplexekben kialakuló különböző fehérje-fehérje kölcsönhatások alapvetően meghatározzák a HAT-ok enzimaktivitását és szubsztrát specifitását [39]. Számos HAT a komplex többi alegysége nélkül nem képes a kromatinba épült hisztonok acetilációjára; illetve önmagában más lizineket módosít, mint komplexbe épülve. A yGcn5 fehérje önmagában nem, csak többalegységes enzim komplexek, így pl. a SAGA vagy az ADA komplex részeként képes a nukleoszómális hisztonokat acetilálni [45]. A HAT-ok komplexekbe épülése megváltoztatja azok lizin specifitását: így például míg a yGcn5 fehérje önmagában szabad hiszton fehérjéken elsősorban a H3 hiszton 14-es lizinjét acetilálja, addig a SAGA komplex alegységeként a nukleoszómális H3 9-es, 14-es, 18-as és 23-as lizinjeit, az ADA komplexben főként a H3 hiszton 9-es, 14-es és 18-as lizinjeit acetilálja [46]. Élesztőben eddig négy Gcn5-tartalmú HAT komplexet azonosítottak: a SAGA, a SLIK/SALSA, az ADA és a HAT-A2 komplexeket [13]. Ezek katalitikus alegységét a yGcn5 fehérje mellett két adaptor fehérje, az yAda2 és az yAda3, valamint az ySgf29 fehérje alkotja, amelyek együttesen alakítják ki a Gcn5 fehérje szubsztrát kötési képességét és lizin specifitását [47] [48].

1.4.1.2 A SAGA komplex

Az egyik legrészletesebben jellemzett Gcn5 tartalmú HAT komplex az élesztő SAGA. A ySAGA 1,8 MDa tömegű, evolúciósan konzervált kromatin módosító komplex, amely kétféle hiszton módosító aktivitással (acetiláció és deubiquitináció) rendelkezik. Az élesztő ySAGA és a magasabbrendű eukariótákban megtalálható ortológjainak vizsgálata sok fontos információval szolgált a hiszton módosítások transzkripció aktivációban betöltött szerepének részletesebb megértéséhez [49].

A ySAGA a transzkripció aktiváció szabályozása – amely a legrészletesebben jellemzett aktivitása – mellett a transzkripció elongációs fázisában és az mRNS export folyamatában is közreműködik [50]. Felépítését tekintve a ySAGA komplex több funkcionális modulra különíthető el (8. ábra). A komplex fő szerkezeti vázát az ySpt3, ySpt7, ySpt8, ySpt20, yAda1, yTra1, yTAF5, yTAF6, yTAF9, yTAF10 és yTAF12 fehérjék alkotják, amelyek egy SPT és egy TAF modullá állnak össze. Ezenfelül a komplex a yTra1 alegységen keresztül kapcsolatot alakít ki különböző aktivátor fehérjékkel, és ezáltal képes a komplex megfelelő genomi régiókhoz kapcsolódni. Az ySpt3 és ySpt8 fehérjéből összeálló egység kölcsönhatást alakít ki a TBP-vel (TATA Binding Protein), amely a transzkripció iniciációs komplex összeszerelődésén keresztül segíti a transzkripció aktivációját. A komplex egyik enzimatis aktivitással rendelkező egysége a yGcn5, yAda2, yAda3 és ySgf29 fehérjékből felépülő acetilációs modul, amely a nukleoszómális hisztonok acetilációját végzi. Az általa létrehozott acetiláció mind a transzkripció aktiváció, mind a transzkripció elongáció folyamata során hozzájárul egy hozzáférhetőbb kromatinszerkezet kialakításához. A ySgf29 fehérje a 4-es lizinjén trimetilált H3 hiszton (H3K4me3) fehérjéhez képes kapcsolódni, ezáltal kapcsolatot teremt az aktivációs jelként azonosított H3K4me3 hiszton kód és a hiszton acetiláció között. Emellett megtalálható a ySAGA-ban egy, az yUbp8, ySus1, ySgf11 és ySgf73 fehérjékből felépülő deubiquitinációs enzimaktivitással rendelkező egység (DUBm) is, amely a H2B hiszton 123-as lizinjén található ubiquitin módosítás eltávolításával elősegíti a transzkripció elongációját. Az ySgf73, az ySgf11 és az ySus1 alegységek részt vesznek az mRNS-export folyamatát végző faktorok és a komplex között létrejövő kölcsönhatás kialakításában, ezáltal a deubiquitinációs egység az mRNS transzportjára is kiterjeszti a ySAGA komplex összetett szabályozó funkcióját [13] [48] [51] [52] [53].



8. ábra: A ySAGA komplex sematikus rajza

Különböző színekkel ábrázolva láthatóak a ySAGA komplex funkcionális moduljai, valamint a szaggatott nyilak utalnak az egyes alegységeknek a transzkripció folyamata során betöltött különböző szerepére. Az ábra a [48] forrás alapján készült.

1.4.1.3 Ada2 adaptor fehérjék

A SAGA komplexen belül kialakuló fehérje-fehérje kölcsönhatások együttesen alakítják ki az egyes modulok pontos funkcióját. Az acetilációs modul esetében az azt felépítő adapter fehérjék közül az yAda3 határozza meg a yGcn5 fehérje kiterjedt lizin specifitását, az yAda2 fehérje pedig erősíti a yGcn5 HAT aktivitását és elősegíti annak nukleoszómális hisztonokhoz való kötődését [47]. A katalitikus egység kialakulásához a yGcn5 fehérje az yAda2 erősen konzervált amino-terminális régiójával alakít ki kapcsolatot, míg az yAda2 fehérje középső szakasza felelős az yAda3 fehérjével létrejövő kölcsönhatásért [54]. Az yAda adaptorok fontos funkciót töltenek be a transzkripció szabályozása során az aktivátor domén és az alap transzkripciós apparátus közötti fizikai kapcsolat kialakításában is. Erre utal, hogy az yAda2 fehérje közvetlen kölcsönhatást alakít ki a herpesz vírus VP16 fehérje aktivátor doménjével és az alap transzkripciós faktorok közül a TBP (TATA-binding protein) fehérjével is, valamint hogy az yAda2 fehérje jelenléte szükséges az aktivátor domén és a TBP közötti kölcsönhatás létrejöttéhez [55].

Az Ada2 típusú adaptor fehérjék az eukarióta transzkripció szabályozásában betöltött jelentős funkciójára utal, hogy a különböző fajokból származó Ada2 fehérjék felépítése

erősen konzervált. Minden, az Ada2 családba tartozó fehérje rendelkezik két konzervált doménnel: egy ZZ cink-ujj doménnal és egy SANT doménnal. Mindkét domén jelenlétére szükség van a yGcn5 és a VP16 aktivációs doménnel való kölcsönhatás létrejöttéhez, viszont a domének ennél pontosabb funkciója még nem teljesen tisztázott [54]. Az eddigi információk szerint az yAda2 fehérje SANT doménje részben a yGcn5 fehérjéhez kötődéshez, részben pedig a kromatinba épült hisztonok felismeréséhez és kötéséhez szükséges, így jelentős funkciót tölt be a ySAGA komplex acetilációs aktivitásának meghatározásában [56]. Az ADA2 fehérjecsalád tagjai az előbb említett két domén mellett rendelkeznek több konzervált, α -helikális szerkezetű motívummal, amelyeket ADA motívumnak nevezünk. Ezek az ADA motívumok a histon-fold motívumokra jellemző $(\alpha\text{-hélis})_1\text{-}(\text{loop})_1\text{-}(\alpha\text{-hélis})_2\text{-}(\text{loop})_2\text{-}(\alpha\text{-hélis})_3$ mintázatot hordoznak, amelyek nemcsak hiszton fehérjékben, hanem különböző adaptor, koaktivátor komplexek számos alegységében is előfordulnak [57]. Ezek alapján feltételezhető, hogy ezeknek az ADA motívumoknak az ADA2 fehérjék más komplex alegységekkel kialakított kölcsönhatásainak létrejöttében fontos szerepe lehet.

1.4.1.4. *Drosophila* Gcn5-tartalmú HAT komplexek

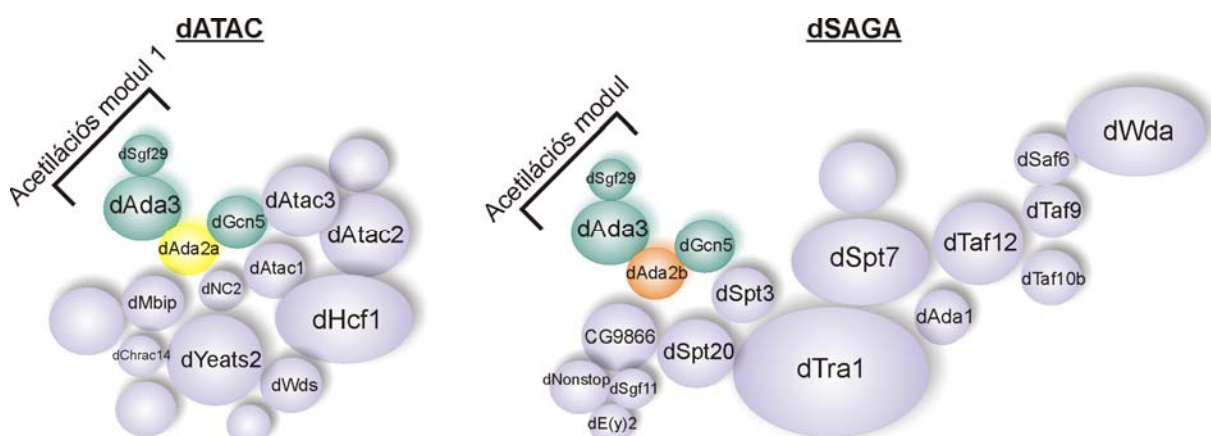
A ySAGA komplex acetilációs egységét felépítő yGcn5, yAda2, yAda3 fehérjék homológjai *Drosophila*-ban is megtalálhatóak. Ehhez hasonlóan a *Drosophila melanogaster*ben is két ADA2 fehérjét – dADA2a és dADA2b – azonosítottak [58]. Mindkét *Drosophila* ADA2 fehérje rendelkezik a családra jellemző, konzervált ZZ cink-ujj doménnal, SANT doménnal, valamint három ADA motívummal. Élesztő kettős hibrid és koimmunprecipitációs kísérletekben mind a dADA2a, mind a dADA2b fehérje kölcsönhatást mutatott a dGcn5, valamint a dADA3 fehérjékkel, viszont a ySAGA komplexre specifikus alegységek *Drosophila* homológjaival csak a dADA2b fehérje esetében detektáltak interakciót. Az élesztő homológ Ada2-höz hasonlóan mindkét *Drosophila* ADA2 fehérje egy-egy HAT aktivitású modul felépítésében vesz részt, viszont ezek két eltérő összetételű és funkciójú Gcn5-tartalmú komplexet hoznak létre [58] [59] (9. ábra). Számos magasabbrendű eukarióta genom – mint például az *Arabidopsis thaliana* [60] és a humán genom [54] is két, az élesztő Ada2-vel homológ gént tartalmaz.

A dGcn5, a dADA3 és a dSgf29 (élesztő ySgf29 *Drosophila* ortológja) fehérje a dADA2a adattorral együtt egy HAT modult alkot, amely a 700 kDa méretű dATAC (ADA two a containing) komplex egyik katalitikus egységét képezi [61] (9. ábra). Ezek a fehérjék

képezik a dATAC és a dSAGA komplexek közös komponenseit. A dATAC komplex a dGcn5 fehérjén kívül rendelkezik még egy, attól független HAT aktivitású alegységgel, a dATAC2 fehérjével [62]. Eddig a komplex további nyolc alegységét (dATAC2, dATAC3, HCF, WDS, D12, NC2 β , CG10238 és CHRAC14) azonosították [63].

A dADA2b, a dGcn5, dADA3 és a dSgf29 fehérje által kialakított HAT modul egy 2 MDa méretű komplexbe épül be, amely az élesztő ySAGA komplex *Drosophila* megfelelőjének (dSAGA) tekinthető [64] (9. ábra). A dSAGA komplex számos, az élesztő SAGA alegységekkel homológ fehérjéjét azonosították. A ySAGA komplex felépítése és funkciója is erősen konzervált, így modellként szolgálhat a *Drosophila* dSAGA komplex működésének és szabályozó funkciójának megértéséhez. Így az acetilációs modulon (dGcn5, dADA2b, dADA3, dSgf29) felül az SPT és TAF egység egyes tagjait, az dAda1, dSpt20, a dSpt7 (ySpt7 ortológ), a dWda (yTaf5 ortológ), dSaf6 (yTaf6 homológ), dTaf9, dTaf10b (yTaf10 homológ) és a dTaf12 fehérjét is azonosították *Drosophila*-ban [58] [59] [64] [65]. A TBP-vel kölcsönható fehérjék közül eddig csak a ySpt3-nak megfelelő dSpt3 fehérjét találták meg *Drosophila*-ban. A dSAGA komplex a yTra1 fehérjével ortológ dTra1 (Nipped-A) alegységen keresztül képes a különböző transzkripciós szabályzó faktorokkal kölcsönhatást kialakítani [66]. A deubiquitinációs modult felépítő faktorokból eddig a dNonstop (yUbp8 ortológ), az dSgf11 (ySgf11 ortológ) és a dE(y)2 (ySus1 ortológ) fehérjét azonosították [67] [68].

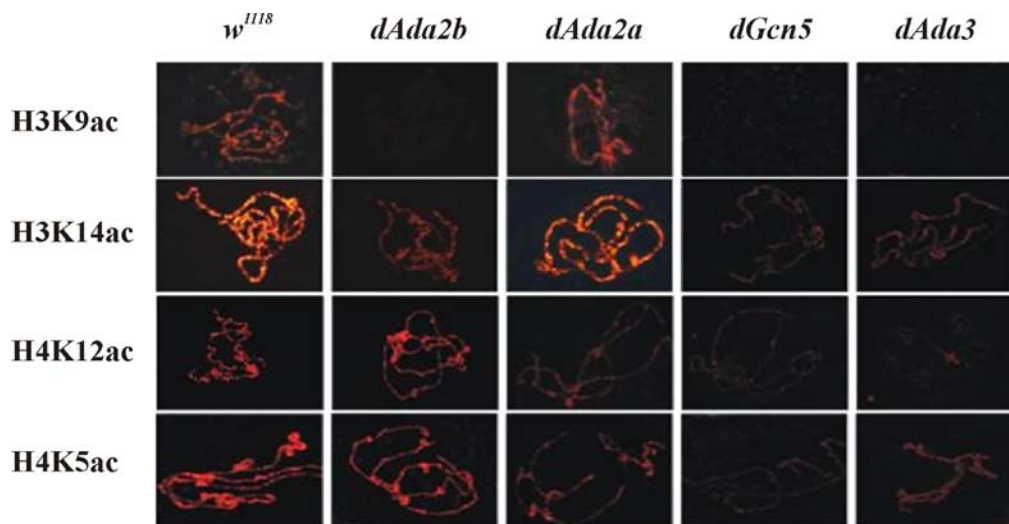
A fent részletezett két Gcn5-tartalmú *Drosophila* HAT komplex eltérő alegység-összetétele arra utal, hogy a két komplex eltérő funkcióval rendelkezhet. A két komplex a acetilációs modulja csak az dADA2 fehérjékben különbözik egymástól.



9. ábra: A *Drosophila* dGcn5-tartalmú HAT komplexek sematikus rajza

Az ábra a [48] és [69] alapján készült.

Az acetilációs modulok közös komponenseinek hiányában (dGcn5 és dADA3) meghatározták, hogy a *Drosophila* Gcn5-tartalmú HAT komplexek mind H3, mind H4 hisztonra specifikus acetilációs aktivitással rendelkeznek. A H3 hiszton 9-es és 14-es pozícióban található lizinjeit, valamint a H4 hiszton 5-ös és 12-es lizinjeit acetilálják [70] [71]. Az egyik, illetve a másik komplexre specifikus dADA2 fehérje funkciójának gátlásával meghatározták, hogy a dADA2b tartalmú dSAGA komplex specifikusan a H3 hiszton 9-es és 14-es lizinjét acetilálja, míg a dADA2a alegységet tartalmazó dATAC komplex dGcn5 specifikus HAT aktivitása a H4 hiszton 5-ös és 12-es lizinjére irányul [70] [72] (10. ábra).

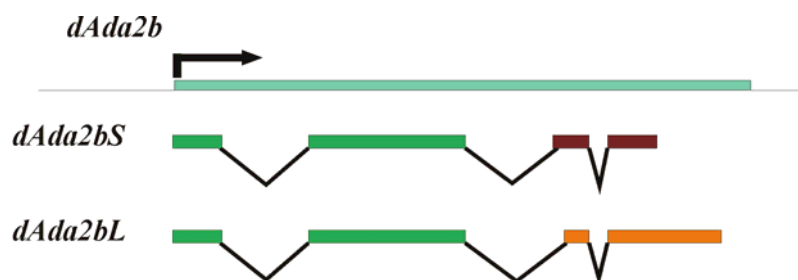


10. ábra: *Drosophila* Gcn5-tartalmú HAT komplexek acetilációs aktivitása

Az ábrán nyálmirigy óriáskromoszómák immunfestése látható, amely a dGcn5 és dADA3 fehérjék hiányában tapasztalt H3 és H4 hisztonok acetilációs szintjét mutatja. Az ábra a [44] [70] [71] [72] források alapján készült.

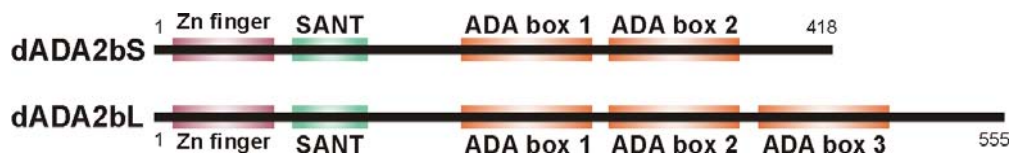
1.4.1.5. *Drosophila* ADA2b fehérjék

Az ADA2 fehérjék sokszínű funkciójára utal, hogy a *Drosophila* *Ada2b* génről több mRNS és fehérje izoforma termelődik [73]. Kutatócsoportunk korábban már igazolta, hogy az egyedfejlődés főbb szakaszaiban (embrió, lárva, báb, imágó állapot) a *dAda2b* génről alternatív splicing során valójában két mRNS forma (dAda2bS és dAda2bL) képződik [72]. A két mRNS 5' végi régiója teljesen megegyezik egymással, csak a 3. és 4. exon területén különböznek, ahol a leolvasási keret is eltérő (11. ábra).



11. ábra: A *dAda2b* génről képződő transzkriptumok (*dAda2bS* és *dAda2bL*) szerkezete
Az alternatív splicing során keletkező két transzkriptum első két exonja azonos, míg a 3. és 4. exon az eltérő leolvasási keretből kifolyólag jelentősen különbözik egymástól.

A szekvencia adatok alapján a rövidebb *dAda2bS* mRNS-ről egy 48,3 kDa molekulásúlyú fehérje, míg a hosszabb *dAda2bL* izoformáról egy 62 kDa méretű fehérje termelődik. *Drosophila* embrióban az *dADA2b* izoformák jelenlétét csoportunknak korábban már sikerült kimutatnia [58]. A két *dADA2b* fehérje izoformák N-terminális 330 aminosavas régiója azonos, csak a C-terminális szakaszon különböznek egymástól. Mindkét variáns az N-terminális régió területén tartalmaz egy-egy, az ADA2 fehérjékre jellemző ZZ cink-ujj és SANT domént (12. ábra) [58]. Mind az élesztő ADA2, mind a humán ADA2b fehérje esetében ez a konzervált N-terminális régió elegendő a GCN5 fehérjével történő összekapcsolódáshoz [43] [74]. Az ADA2 fehérjékre jellemző SANT domén hozzájárul a SAGA komplex megfelelő szubsztrát felismeréséhez és katalitikus aktivitásához, mivel a SANT domén módosítás nélküli nukleosómákhoz képes kötődni [26] [56]. A SANT domén mögött elhelyezkedő ADA2 régió felelős a katalitikus HAT modul felépülése során az ADA2-ADA3 interakció kialakításáért [43] [74]. Az ADA2 fehérjék C-terminális régiója több, konzervált szerkezetű α -helikális motívumot tartalmaz. Az egyik ilyen motívum a kromatinszerkezetet módosító fehérjékhez köthető, négy α -helixből felépülő SWIRM domén. A legtöbb ADA2 fehérjében megtalálható ilyen SWIRM domén, viszont mindkét *Drosophila* *dADA2b* izoformából hiányzik [75] [76].



12. ábra: A rövid és hosszú *dADA2b* izoform domén szerkezete

Mindkét *dADA2b* izoformában megtalálható az N-terminális régióban elhelyezkedő ZZ cink-ujj (Zn finger) motívum és SANT domén. A C-terminális részen a rövidebb *dADA2bS* izoformából hiányzik a harmadik ADA motívum (ADA boks 3).

A másik konzervált motívum az ADA2 fehérjékre jellemző, $(\alpha\text{-hélis})_1\text{-(loop)}_1\text{-(}\alpha\text{-hélis)}_2\text{-(loop)}_2\text{-(}\alpha\text{-hélis)}_3$ mintázatot hordozó ADA motívum. A két dADA2b izoforma közül a rövidebb variáns csak két, míg a hosszabb három darab ilyen ADA motívumot tartalmaz a C-terminális régióban [58]. Ezek az ADA motívumok a histone-fold doménekhez hasonló szerkezeti elemeket tartalmaznak, amelyek nemcsak hiszton fehérjékben, hanem különböző adaptor és koaktivátor komplexek (TFIID, SAGA) alegységeiben is előfordulnak [57]. Feltételezhetően ezeknek az ADA motívumoknak az ADA2 fehérjék a komplex más alegységeivel kialakított kölcsönhatásainak létrejöttében lehet fontos szerepe.

2. Célkitűzések

Dolgozatomban a dSAGA specifikus hiszton acetilációnak a génműködés szabályozásában betöltött szerepét tárgyalom. Ehhez a következő kérdéseket fogom áttekinteni:

2.1 Késői L3 lárva és korai báb állapotban mely gének expresszióját szabályozza a dSAGA specifikus acetiláció?

- *dAda2b* mutáns egyedek teljes transzkriptum analízise késői L3 lárva és korai báb állapotban

2.2 A dSAGA komplexre specifikus dADA2b alegység két izoformája hogyan járul hozzá a dSAGA génműködés szabályozásában betöltött funkciójához?

- A dADA2b izoformák expressziójának, valamint a dADA2b rövid izoforma funkciójának vizsgálata

2.3 A dSAGA komplex és az általa létrehozott H3K9 acetiláció közvetlenül befolyásolja-e a 2.1-es pont alapján dSAGA-függő transzkripciót mutató gének expresszióját?

- A dADA2b fehérje kötődésének, valamint a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció szintjének meghatározása dSAGA-függő és dSAGA-független transzkripciójú gének különböző régióin

2.4 A dSAGA specifikus H3K9 acetiláció miként befolyásolja a génaktiváció folyamatát?

- A dSAGA specifikus H3K9 acetilációs mintázat és ennek transzkripcióra kifejtett hatásának feltérképezése az *Eip74EF* és *Eip75B* ekdizon indukált gének aktivációja során

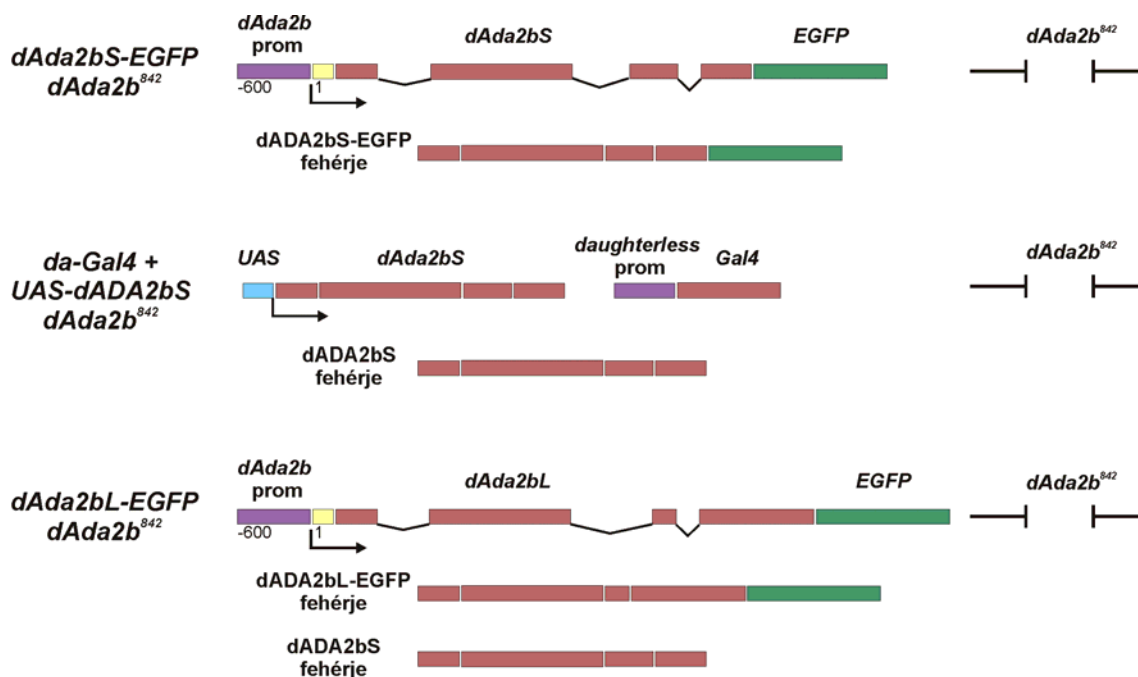
3. Felhasznált anyagok és módszerek

3.1 Felhasznált *Drosophila melanogaster* törzsek, keresztezések

A használt *Drosophila* törzseket standard táptalajon (9,3 g agar, 61,2 g kukoricadara, 129,4 g glükóz, 32,4 g száraz élesztő, 10 ml 10% Nipagin), 25 °C-on tartottam fenn. A kísérletekben w^{1118} törzset használtam vad típusú kontrollként.

A $dAda2b^{842}$ deléciós allél a $dAda2b$ gén 800 bp hosszúságú, P-elem mobilizációval létrehozott deléciós null mutánsa. A deléció szabályozó régiókon kívül az első exon és az első intron régióját is érinti és mind a két dADA2b izoforma termelődését megszünteti. A homozigóta mutánsok esetében már a késői (15.) embrionális stádiumban nincs jelen kimutatható anyai hatású dADA2b fehérje, a deléció mégis csak a késői báb (P5) és pharate adult stádiumban okoz letalitást [72] [73].

A dADA2b izoformák vizsgálatára a laborunkban korábban előállított transzgenikus *Drosophila* törzseket használtuk. A dADA2bS izoforma esetén kétféle törzset használtunk (13. ábra). Az egyik a $dAda2bS$ -EGFP $dAda2b^{842}$ törzs, amely a rövid izoformának megfelelő genomikus szekvenciát az EGFP-vel C-terminális fúzióban termelő transzgent tartalmazza. Ez a transzgen $dAda2b$ deléciós háttéren, egy 600 bp hosszúságú $dAda2b$ promóter szabályozása alatt működik. Ezt a 600 bp-os szakaszt egy teljes értékű $dAda2b$ promoternek tekinthetjük, mivel korábbi kísérletekben ezen régió irányítása alatt kifejeződő $dAda2b$ genomi transzgen a $dAda2b$ deléciós egyedekre jellemző bábletális fenotípust teljes mértékben menekítette [72]. A másik az UAS-Gal4 rendszer segítségével a rövid izoforma túltermelését biztosító törzs, amely, a rövid izoformát kódoló cDNS-t tartalmazó UAS- $dAda2bS$ transzgent $dAda2b^{842}$ deléciós háttéren hordozza. Ezen konstrukció kifejeztetéséhez az általános expressziót biztosító *daughterless(da)*-Gal4 driver törzset alkalmaztuk. A dADA2bL izoforma vizsgálatához a $dAda2bL$ -EGFP $dAda2b^{842}$ konstrukciót tartalmazó törzset használtuk. Mivel ez a transzgen C-terminális EGFP fúzióval a hosszú izoformának megfelelő genomikus szekvenciát tartalmazza, az EGFP fehérjével jelölt dADA2bL izoforma mellett alternatív splicing útján a dADA2bS izoforma kifejeződését is biztosítja. Ez a transzgen $dAda2b$ deléciós háttéren, a 600 bp hosszúságú $dAda2b$ promóter szabályozása alatt expresszálódik.



13. ábra: A dADA2b izoformák vizsgálatára használt transzgenikus törzsek jellemzése. Az ábra a használt *Drosophila* törzsek által hordozott transzgenek felépítését valamint az azokról termelődő fehérjék szerkezetét mutatja.

3.2 *Drosophila* mintagyűjtés

Western blot analízishez: w^{1118} embrionális, lárva, báb és imágó, valamint $dAda2b^{842}/dAda2b^{842}$ homozigóta, $dAda2bS-EGFP/dAda2bS-EGFP$; $dAda2b^{842}/dAda2b^{842}$, $Da-Gal4$ $dAda2b^{842}/UAS-dAda2bS$ $dAda2b^{842}$, és $dAda2bL-EGFP$ $dAda2b^{842}/dAda2bL-EGFP$ $dAda2b^{842}$ L3 lárva és késői báb fejlődési állapotú *Drosophila* mintákat gyűjtöttünk.

Nyálmirigy óriáskromoszómák immunfestéséhez: w^{1118} , $dAda2b^{842}$ homozigóta, $dAda2bS-EGFP/dAda2bS-EGFP$; $dAda2b^{842}/dAda2b^{842}$, $Da-Gal4$ $dAda2b^{842}/UAS-dAda2bS$ $dAda2b^{842}$, és $dAda2bL-EGFP$ $dAda2b^{842}/dAda2bL-EGFP$ $dAda2b^{842}$ vándorló L3 lárva stádiumú mintákat gyűjtöttünk össze nyálmirigy preparáláshoz.

DNS microarray: az analízishez anterior spirákulumukat kitért (SpEv) w^{1118} , $dAda2b^{842}$, valamint $dAda2bS-EGFP/dAda2bS-EGFP$; $dAda2b^{842}/dAda2b^{842}$ homozigóta L3 lárvákat gyűjtöttünk. A P3 báb minták legyűjtéséhez w^{1118} és $dAda2b^{842}$ mutáns lárvákat azonos fejlődési állapotra szinkronizáltuk. Ehhez fehér báb stádiumban lévő állatokat gyűjtöttünk, majd 10 órán keresztül 25 °C-on nedves kamrában tároltuk, végül folyékony nitrogénben lefagyasztottuk őket. Minden genotípusból, mindkét fejlődési állapotban három párhuzamos mintát gyűjtöttünk, egyenként mindegyik 10-10 db lárvát/bábot tartalmazott.

Apoptózis kimutatásához: w^{1118} , $dAda2b^{842}/dAda2b^{842}$ mutáns és $da-Gal4\ dAda2b^{842}/UAS-dAda2bS\ dAda2b^{842}$ genotípusú, minden genotípusból minimum 15 db vándorló L3 stádiumú lárvát 4000 R (150 kV, 0,5-mm Al filter, 1000 R/perc) Röntgen sugárzással kezeltünk.

Kromatin immunprecipitációhoz: 1-1 gram w^{1118} és $dAda2b^{842}/dAda2b^{842}$ homozigóta, anterior spirákulumukat kitűrt (SpEv); w^{1118} 24-28 órás, vándorló és SpEv L3-as lárvát, valamint $dAda2b^{842}/TM6c$ heterozigóta és $dAda2b^{842}/dAda2b^{842}$ homozigóta vándorló L3 lárvát gyűjtöttünk össze, amelyeket folyékony nitrogénben lefagyasztottunk és -80 °C-on tároltuk őket.

Génexpressziós mérésekhez: az L3 lárvastádium során 4 órás felbontással w^{1118} lárvákból mintát gyűjtöttünk. Ehhez 4 órás intervallumban L2/L3 lárvaállapot közötti vedlésen átesett lárvákat válogattunk, majd belőlük az L3 lárvastádium végéig 4 óránként 5-5 darabot folyékony nitrogénben lefagyasztottunk és az RNS izolálásig -80 °C-on tartottuk őket. Ehhez hasonlóan 5-5 darab $dAda2b^{842}/TM6c$ heterozigóta és $dAda2b^{842}/dAda2b^{842}$ homozigóta L3 lárvát az L2/L3 lárvaállapot közötti vedlést követően 24-28, 40-44 és 46-48 órával folyékony nitrogénben lefagyasztottunk.

3.3 Western blot analízisek

A *Drosophila* mintákat szonikációs pufferben (50 mM Tris-HCl pH 7,9, 2 mM EDTA pH 8,0, 50 mM NaCl, 0,5 mM DTT, 10 mM Na-butirát, 1x PIC) homogenizáltuk, majd azonos mennyiségű 2x SDS loading puffert (20% glicerin, 100 mM Tris-HCl pH 6,4, 200 mM DTT, 4% SDS, 0,2% brómfenolkék, 5% β -merkaptotanol) adtunk a mintákhoz. Ezután 5 percig 100 °C-on denaturáltuk a fehérjéket, majd a szövettörmelék kiülepítése érdekében lecentrifugáltuk (10 perc, 13000 rpm, 4 °C) a mintákat. Az elkészített kivonatok fehérjetartalmát Bradford reagenssel (BioRad) határoztuk meg

A fehérjeanalízishez azonos mennyiségű *Drosophila* mintákat 12%-os Tris-glicin-SDS PAGE-dzsel elválasztottunk, majd elektroblottolással a 0,45 μ m pórusméretű nitrocellulóz membránra rögzítettük. Ezt követően a membránt 5% tejport tartalmazó TBST oldatban (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20) 2 órán keresztül blokkoltuk. Az immunreakcióhoz az elsődleges ellenanyagot 2%-os BSA-TBST oldatban hígítottuk, majd a membránt egy éjszakán keresztül 4 °C-on ebben inkubáltuk. A dADA2b fehérje kimutatására nyúlban termeltetett poliklonális ellenanyagot használtunk 1:1000-hez hígításban. A H3 9-es lizinjén acetilált hisztonok kimutatására az Abcam ab4441 számú nyúl eredetű poliklonális

ellenanyagot 1:5000-szeres hígításban használtuk. A kötődött elsődleges ellenanyagok kimutatásához 2 órán keresztül 2 % BSA-TBST oldatban 1:10000-szeresére hígított, torna peroxidázzal kapcsolt nyúl IgG ellenes másodlagos ellenanyaggal (Dako, P0448) inkubáltuk a mintákat. Az ellenanyagokkal történt kezeléseket követően háromszor 10 percig TBST oldattal mostuk a membránt. Ezt követően a membránt Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) reagenssel inkubáltuk 5 percig szobahőn, majd a keletkezett kemilumineszcens jelet röntgenfilmen rögzítettük.

3.4 *dAda2b*⁸⁴² mutáns *Drosophila* lárvák transzkriptom vizsgálata DNS microarray módszerrel

A dADA2b fehérjék transzkripció szabályozásban betöltött szerepét *w*¹¹¹⁸ és *dAda2b*⁸⁴² mutáns lárvákban két fejlődési állapotban is megvizsgáltuk DNS microarray kísérlettel. A vizsgált két fejlődési állapot a következő volt: a lárvastádium legvége, amikor az L3 stádiumú lárvák anterior spirákuluma megjelenik (SpEv), valamint a báb állapot egy korai szakasza, amikor a metamorfózis fontos lépései lezajlanak (P3 prepupa). A dSAGA további funkcióinak feltérképezéséhez a *w*¹¹¹⁸ és *dAda2b*⁸⁴² mutáns lárvák mellett *dAda2bS-EGFP dAda2b*⁸⁴² SpEv állapotú lárvákon is transzkriptum analízist végeztünk. A mintákból Qiagen RNeasy kittel a gyár által ajánlott protokoll szerint össz-RNS-t tisztítottunk. Az RNS mintákat Christelle Thimbaud (IGBMC) strasbourgi Affymetrix laborjába küldtük. A minta ellenőrzését és a fluoreszcens jelölést ott végezték az Affymetrix labor protokollját követve. A hibridizáció során a lárvamintákhoz a több mint 18500 transzkriptumot reprezentáló GeneChip *Drosophila* Genome 2.0 Array-t (Affymetrix) használtuk, a bábminták vizsgálatához pedig a több mint 13500 transzkriptumot reprezentáló GeneChip *Drosophila* Genome Array-t (Affymetrix) alkalmaztuk. A hibridizációt GeneChip Fluidics Station 400 hibridizációs kamrában az EukGE_WS2v4 protokoll szerint végezték, a jel detektálásához Scanner GeneArray 2500 d'Agilent Technologies scannert használtak.

A kiértékelés során csak azokat a géneket vettük bele az analízisbe, amelyek normalizált hibridizációs jele egy adott genotípusból (az adott fejlődési állapotban) származó három biológiai ismétlésből legalább kettő esetében „present” kategóriába esett. Az adatok kiértékelésénél a kapott szignál intenzitások összehasonlításához Student-féle t-tesztet alkalmaztunk, majd az expressziójukban szignifikáns változást mutató gének közül kiválasztottuk a kétszeres expressziós változást mutató gének csoportjait.

A gén ontológiai (GO) analízis során a GOrilla on-line analízis programmal (<http://cbl-gorilla.cs.technion.ac>) [77] azonosítottam a microarray adatok között feldúsulást mutató, azaz a véletlenszerű eloszláshoz képest nagyobb arányban reprezentált gén ontológiai csoportokat. A program által felhasznált GO adatbázis 2013. február 9.-én került frissítésre.

Az analízis során a microarray kísérletből származó megnövekedett ill. csökkent expressziót mutató gének listáit a microarray chip-en található összes gén listájával (background set) vetettük össze. A vizsgálatból a duplikált valamint a GO kategóriába nem besorolható gének ki lettek zárva. A bevitt 16088 gén azonosítóból a szoftver 14440-et ismert fel. Ebből 2019 duplikátum el lett távolítva, további 2316-ot az adatbázis alapján nem lehetett GO kategóriákba sorolni; így a felhasznált teljes gén listát 10105 gén alkotta.

A szoftverrel azokat a GO kategóriákat listáztattuk ki, amelyekbe eső gének $P < 0,001$ szignifikancia szinttel jellemezhető feldúsulást mutattak a génexpressziós változásokat mutató adatsorokban. A program által az egyes GO kategóriák feldúsulására számított P értékek a hipergeometrikus statisztikai modellen alapulnak. A program által számított dúsulási értékek (E, enrichment) a következőképpen lettek kiszámítva: $E = (b/n)/(B/N)$, ahol

b: az adott GO kategóriába eső gének száma a változást mutató gének listájában

n: a gének száma a változást mutató gének listájában

B: az adott GO kategóriába eső gének száma a microarray chipen található gének teljes listájában

N: a gének száma a microarray chipen található gének teljes listájában.

A kiszámított eredményekből a GOrilla szoftverrel integrált Graphviz eszközzel készítettem ábrákat.

3.5 Nyálmirigy óriáskromoszóma preparálás és immunfestés

Az élesztővel dúsított táptalajon növesztett, vándorló L3 lárvák nyálmirigyeit 30 μ l 1X PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄, pH 7,4), 0,5% NP-40 oldatban kiboncoltuk. Ezt követően a nyálmirigyeket 40 másodpercig 1X PBS, 2% NP-40, 3,7% formaldehid oldatban, majd 40 másodpercig 45% ecetsav, 3,7% formaldehid oldatban, végül 1 percig 45%-os ecetsav oldatban inkubáltuk. A preparátumot szilikonizált fedőlemezzel lefedtük, majd erőteljes nyomással szétroncsoltuk a szöveteket.

Az immunfestés első lépéseként a preparátumokat 1 órán keresztül 25 °C-on PBST (1X PBS, 0,1% Tween-20) + 5% FCS (Foetal Calf Serum) oldatban inkubáltuk. A blokkoló

oldat eltávolítása után egy éjszakára H3K9ac ellen nyúlban termeltetett poliklonális (Abcam ab4441) ellenanyagot 1:200-szoros hígításban, valamint RNS polimeráz II elleni egér monoklonális ellenanyagot (7G5) 1:250-szeres hígításban, vagy Ser2 és Ser5 aminosavakon foszforilált RNS polimeráz II elleni egér monoklonális (Covance H5) ellenanyagot 1:250-szeres hígításban tartalmazó 5% FCS-PBST oldatba helyeztük a mintákat. Ezután háromszor 5 percig PBST oldattal mostuk a preparátumokat, majd 1 órán keresztül 5% FCS-PBST oldatban 1:500-szorosára hígított, Alexa Fluor 555 fluoreszcens festékekkel kapcsolt, nyúl IgG elleni másodlagos ellenanyaggal (Molecular Probes) valamint Alexa Fluor 488 fluoreszcens festékekkel kapcsolt, egér IgG elleni másodlagos ellenanyaggal (Molecular Probes) sötétben inkubáltuk. A továbbiakban ismét három alkalommal 5 percig PBST oldatban mostuk a mintákat, majd 5 percig PBST + 1 µg/ml DAPI oldatban inkubáltuk a preparátumokat. Az oldat eltávolítása után 10 µl Fluoromount (Sigma) segítségével fedőlemezzel lefedtük a preparátumokat. Az elkészített preparátumokat fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

3.6 Apoptózis kimutatása acridine orange festéssel

A kezelt és a kezeletlen kontrol lárvákat az ionizáló sugárzással történő kezelést követően 4 órával PBS oldatban felboncoltuk. A vizsgálni kívánt imágó korongokat kipreparáltuk, és 5 percre PBS + 1,6 µg/ml acridine orange oldatba helyeztük. Ezután háromszor 5 percig PBS oldattal mostuk a mintákat, majd tárgylemezre helyeztük, és fedőlemezzel lefedtük őket. A preparátumokat fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgálva megszámláltuk az apoptotikus sejteket.

3.7 Kromatin immunprecipitáció

3.7.1 Kromatin izolálás

1 gram folyékony nitrogénben lefagyasztott lárvát dörzsmozsárban porrá dörzsöltünk, majd 7 ml Puffer A (60mM KCl, 15mM NaCl, 15mM Hepes-KOH pH 7.6, 13mM EDTA, 0,1mM EGTA, 10mM Na-butirát, 0,15mM spermin, 0,5mM spermidin, 0,5% NP-40, 0,5mM DTT) oldatban felfuszpendáltunk. A szuszpenziót 10 ml térfogatú üveg homogenizátorban B típusú pisztulussal tovább homogenizáltunk. A nagyobb szövettörmelékek eltávolításához Miracloth (Calbiochem) szűrőn átszűrtük a szuszpenziót, majd 2 ml Puffer AS (60mM KCl,

15mM NaCl, 15mM Hepes-KOH pH 7.6, 1mM EDTA, 0,1mM EGTA, 10mM Na-butirát, 0,15mM spermin, 0,5mM spermidin, 0,5mM DTT, 10% szaharóz) hozzáadása után centrifugálással (3000 rpm 5 perc, 4 °C) kiülepítettük a sejtmagokat. A csapadékot 3 ml Puffer A oldatban felszuszpendáltuk, üveg homogenizátorban A típusú pisztulussal tovább homogenizáltuk, majd 1 ml Puffer AS hozzáadása után újból centrifugálással összegyűjtöttük a sejtmagokat. Ezt a sejtmagi csapadékot Puffer AN (60mM KCl, 15mM NaCl, 15mM Hepes-KOH pH 7.6, 1mM EDTA, 0,1mM EGTA, 10mM Na-butirát, 0,1% NP-40) oldatban felszuszpendáltuk és szobahőn 1% formaldehiddel keresztkötöttük a kromatint. 10 perc elteltével 300 µl 1M glicin hozzáadásával állítottuk le a keresztkötési reakciót, majd a sejtmagokat kétszer 10 ml AN pufferrel mostuk. Ezután 1,5 ml lízis pufferben (50mM Tris-HCl pH 8.0, 1% SDS, 10mM EDTA, 10mM Na-butirát) feltártuk a sejtmagokat, és 4 x 20 másodpercig Diogenode Bioruptor szonikátorral fragmentáltuk a kromatint. A nem fragmentálódott kromatin darabokat centrifugálással eltávolítottuk (14000 rpm 10 perc, 4 °C) és spektrofotométerrel meghatároztuk a kromatin koncentrációját. Folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd felhasználásig -80 °C-on tároltuk a kromatint.

3.7.2 Immunprecipitáció

Egy immunprecipitációhoz 25 µg kromatint használtunk. Ezt először Puffer D (10mM Tris-HCl pH 8.0, 0,5 mM EGTA, 140mM NaCl, 1% Triton X-100) oldattal ötszörösére, majd RIPA pufferrel (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA, 0,5mM EGTA) kétszeresére hígítottuk. Nemspecifikus kötődések kiküszöbölésére a kihígított kromatint 20 µl/minta BSA-val (3µg/µl) és hering sperma DNS-sel (1 µg/µl) blokkolt Protein A-Sepharose CL-4B (Sigma) gyönggyel 4 °C-on, 2 órán keresztül forgatva előtisztítottuk. Az így előtisztított kromatint 4 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk a következő ellenanyagokkal: α-H3 (1 µg, Abcam ab1791), α-H3K9ac (4 µg, Abcam ab4441), α-dAda2b (5µl), α-Pol. II (2,5 µg, 7G5 klón). Az ellenanyag nélküli kontroll mintához (NAC – No Antibody Control) is azonos mennyiségű előtisztított kromatint használtunk, és azt teljesen hasonlóan kezeltük, mint az immunprecipitált mintákat. Másnap a csapadék eltávolításához (13000 g, 10 perc, 4 °C) lecentrifugáltuk a mintákat, majd a felülúszóból 4 órán keresztül 4 °C-on blokkolt Protein A-Sepharose gyöngyökkel kevertettük a kromatin-ellenanyag komplexeket. A NAC minta felülúszóját használtuk a teljes bemért kromatin mennyiséget meghatározó kontroll (TIC - Total Input Control) mintaként. A gyöngyöket centrifugálással (2000 rpm, 2 perc, 4 °C) összegyűjtöttük, majd 5x 5 percig RIPA pufferrel, 1x 5 percig LiCl (10mM Tris-HCl pH 8.0, 250mM LiCl, 0,5% NP-40, 0,5% Na-DOC, 1mM EDTA) pufferrel, 1x 5 percig TE (10mM

Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA) pufferrel mostuk, majd a gyöngyöket 50 µl TE pufferben felszuszpendáltuk.

3.7.3 DNS-fehérje keresztkötések megszüntetése és DNS tisztítás

A keresztkötések megszüntetéséhez egy éjszakán át 65 °C-on, majd 0,5% SDS és 500µg/µl Proteináz K jelenlétében 3 órán keresztül 50 °C-on tartottuk a mintákat. A DNS-t fenol-kloroform extrakcióval kitisztítottuk, 100 µg/ml glikogén jelenlétében etanol segítségével kicsaptuk, majd 50 µl 10 mM Tris-HCl pH 8.0 oldatban felszuszpendáltuk. Az így kapott DNS mintát használtuk templátként a Q-PCR analízissel történő mennyiségi meghatározás során.

3.8 RNS izolálás és egyes szálú cDNS szintézis

L3 stádiumú *Drosophila* lárvákból össz-RNS-t TRIzol (Invitrogen) reagenssel izoláltunk a gyártó által mellékelt protokoll szerint, mintánként 5 darab állatot felhasználva. Az RNS koncentrációját NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer) segítségével határoztuk meg. Az esetleges genomi szennyezés eltávolításához a gyártó utasításai szerint RNáz-mentes DNázI enzimmal (Fermentas) kezeltük a mintákat. A DNáz inaktiválásához 3 mM EDTA hozzáadása mellett 10 percig 65°C-on inkubáltuk a mintákat. Egyes szálú cDNS-t, 1-1 µg össz RNS bemérésével az Applied Biosystems Reverse Transcription Reagents Kittel állítottunk elő a gyártó útmutatása szerint, az alábbi reakció körülményeket alkalmazva: 25 °C 10 perc, 37 °C 60 perc, 95 °C 5 perc.

3.9 Kvantitatív real time PCR (Q-PCR)

A kvantitatív real-time PCR reakciókat ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) készülékkel végeztük. A keletkező termékek mennyiségi meghatározásához Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) reagenst használtunk a következő reakció körülményeket alkalmazva: 95 °C 10 perc; 95 °C 15 másodperc; 60 °C 1 perc (40 ciklus). A reakciók végén olvadási görbe analízist végezve ellenőriztük a keletkező termék minőségét. Kísérletenként két párhuzamos, 25 µl reakció térfogatban végzett mérést végeztünk.

A génexpressziós analíziseknél cDNS mintákból készített kalibrációs egyenes segítségével, abszolút kvantifikálással határoztuk meg az egyes minták cDNS tartalmát. A génexpressziós vizsgálatokat 3-3 függetlenül izolált mintán végeztük el.

A kromatin immunprecipitáció analízise során az egyes immunprecipitációk során kapott DNS mennyiségét a TIC mintákból készített kalibrációs egyenes segítségével határoztuk meg, és TIC%-ban adtuk meg. Az egyes immunprecipitációkban kapott DNS mennyiséget korrigáltuk a NAC minta DNS tartalmával.

A mérések során a következő primereket használtuk:

Primer neve	Primer szekvenciája
sug prom fwd (-34)	CGCATATTACCCGAACCTCT
sug prom rev (+66)	GTTGTCTGTGGTGGGTGCT
sug 3' fwd (+1525)	CTCGCTAAAACCCAAACAGG
sug 3' rev (+1638)	GGTGACTCCACGTCCATCTT
Fst prom fwd (-59)	GGCAGTGAATGGAAGTGGTT
Fst prom rev (+62)	CCAAGGCAGTGAAGAGGATAA
Fst 3' fwd (+864)	ACTATCGATTCTTCAGCGGTCTA
Fst 3' rev (+964)	GTTACTCGGAAACGCCAAAT
cnc prom fwd (-80)	AACCGCAAAGCACAAAACCT
cnc prom rev (+116)	GTGGTGAGCTTGAAAACGTG
cnc 3' fwd (+33437)	TGGAATCAGTGAGCCAGGA
cnc 3' rev (+33545)	TGTATAGTCGCCGAAAAGG
CycB prom fwd (-39)	TGCGGCTTAAAAGGGAACCTA
CycB prom rev (+101)	TGATCGAGTTTTTGCACACG
RpS23 prom fwd (-8)	GCGGTCACACTGAAAACATC
RpS23 prom rev (+140)	TTCGCTTAATTCGCACAAA
RpL32 prom fwd (-19)	TTTCACACCACCAGCTTTTTTC
RpL32 prom rev (+120)	CACGGACTAACGCAGTTCAA
Hus1-like prom fwd (-62)	TCGTTATCGGTTTTTCGATGTC
Hus1-like prom rev (+96)	GCAGCAGTCGCACTTACCTT
Hus1-like 3' fwd (+3527)	GGCCTTCTTTGGAGCACTT
Hus1-like 3' rev (+3628)	CCACATCCTGTCGTACATCG
AttD prom fwd (-62)	AGTTGCGTACTTTTTGCGACA
AttD prom rev (+130)	TCATCACCGACCCTTACTCC
Intergenic region 1 fwd	TCAAGCCGAACCCTCTAAAAT

Intergenic region 1 rev	AACGCCAACAAACAGAAAATG
Intergenic region 2 fwd	CCGAACATGAGAGATGGAAAA
Intergenic region 2 rev	AAAGTGCCGACAATGCAGTTA
Intergenic region 3 fwd	CAGTTGATGGGATGAATTTGG
Intergenic region 3 rev	TGCCTGTGGTTCTATCCAAAG
Intergenic region 4 fwd	GCTGATGCTTCCTGAAATCC
Intergenic region 4 rev	GTTTGGTGTGCTCGTCCTTT
E74int1 fwd	CATACTAGTTGCCGGCGTAT
E74int1 rev	TTTAGCACTTCCCCTCCTG
E74ex8 fwd	TGTCCGCGTTTCATCAAGT
E74ex8 rev	GTTCATGTCCGGCTTGTTCT
E75ex8 fwd	CAACTGCACCACCACTTGAC
E75ex8 rev	GCCTTGCACTCGTTCTTCTC
E74RB-prom fwd	GCCGACTGAACGACTGAATC
E74RB-prom rev	GGAAGACGCAGCAGAGAGAG
E74RA-prom fwd	CAACTAAACGGCGAACAAGC
E74RA-prom rev	GCTTGCGCTCTCTACGCTAA
E75RC-prom fwd	CCGCATAAACGCACAATCAG
E75RC-prom rev	GTGGATTGGGCTCTCTCTGG
E75RC-int1 fwd	AACCGAGCAAAAACACCAAG
E75RC-int1 rev	CGGTTTCCAAGTTCATTGCT
E74int5 fwd	CTGGGCTTTGGATACACACT
E74int5 rev	GTGAGATGCGAGAGAGAAGC

4. Eredmények

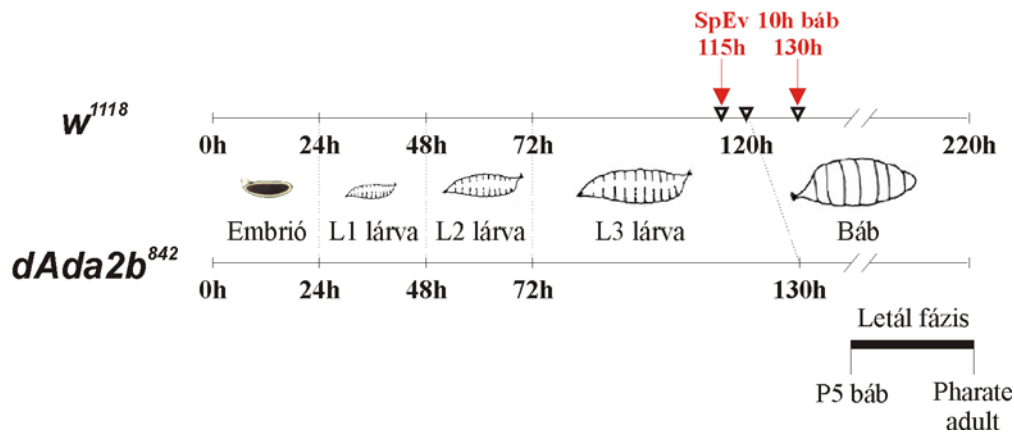
4.1 A dSAGA specifikus H3K9 és K14 acetiláció szabályozása alatt álló gének azonosítása

A hiperacetilált nukleoszómakat már régóta egy nyitottabb kromatinszerkezettel és aktív transzkripciós állapottal hozzák összefüggésbe, míg a deacetiláció folyamatát a represszált génműködéshez kötik. Korábban csirke vörösvérsejtekben expresszáldó, és így nagyfokú DNáz érzékenységet mutató globin gén területén kromatin immunprecipitációs (ChIP) kísérletekben acetilált hiszton fehérjék jelenlétét mutatták ki [78], valamint élesztőben a transzkripciósan inaktív genomikus területeken alacsony mértékű hiszton acetilációt figyeltek meg [79]. *S. cerevisiae*-ből és emlős sejtekből származó adatok is azt igazolják, hogy az aktívan átíródó gének promótereinek területén magas szintű H3K9 és H3K14 acetiláció mutatható ki [80] [81]. Ezekből az adatokból kiindulva megvizsgáltuk, hogy vajon a dSAGA által létrehozott H3K9 és K14 acetiláció is egy, a transzkripció aktiválásával összefüggésbe hozható hiszton módosítás-e, illetve hogy a dSAGA komplex milyen gének működésének a szabályozásában vesz részt.

4.1.1 *dAda2b* mutánsok transzkriptum analízise késői L3 lárva és korai báb állapotban

Feltérképeztük milyen a génextpressziós mintázat a dSAGA specifikus H3K9 és K14 acetiláció hiányában, amihez DNS microarray technikával teljes transzkriptom analízist végeztünk két fejlődési állapotban *dAda2b* mutáns és vad típusú egyedekben. A *dAda2b*⁸⁴² homozigóta null mutánsok a vad típushoz hasonló egyedfejlődést mutatnak az L3-as lárvastádium végéig. A vad típushoz képest 10 órás késéssel bábozódnak be, majd ezt követően 12 órával, közvetlenül az előbáb-báb átmenet után elpusztulnak (P5 báb állapot) (14. ábra). Ahhoz, hogy a génműködés vizsgálata során kizárjuk az eltérő fejlődési állapotból eredő expressziós különbségek zavaró hatását, morfológiailag jól meghatározható, azonos fejlődési állapotban hasonlítottuk össze a mintákat. Mivel a *dAda2b* mutánsok letális fázisa a korai báb állapotra tehető, feltételezhetjük, hogy a dADA2b fehérjének a metamorfózis ezen korai szakaszában esszenciális szerepe lehet. Ezért a metamorfózis ezen korai szakaszából választottunk ki két fejlődési állapotot, hogy megvizsgáljuk a dSAGA transzkripció

szabályozásában betöltött szerepét. Az első állapotnak az L3-as lárva stádium legvégét jelöltük ki, azt az időszakot, amikor a lárva előbábbá alakul át. Ez egy rövid, mintegy 30 perces állapot, amelyet morfológiailag az anterior spirákulumok megjelenése jellemez (SpEv). A második vizsgálati pontnak közvetlenül a *dAda2b* mutáns letális fázisa előtti időszakot – a 10. órás báb állapotot (10 h báb) – választottuk, amely a jól meghatározható SpEv állapot után 10 órával van.

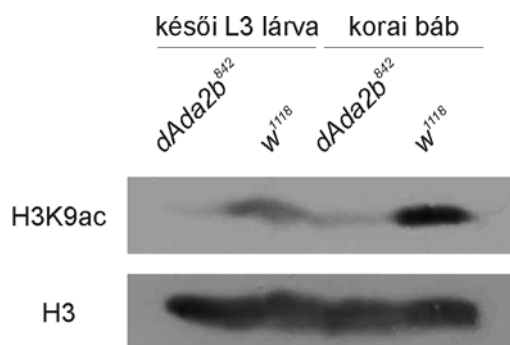


14. ábra: w^{1118} és $dAda2b^{842}$ mutánsok egyedfejlődésének sematikus rajza

Az ábrán a w^{1118} és $dAda2b$ mutáns *Drosophila* egyedfejlődésének időbeli összehasonlítása, a transzkriptum analízishez kiválasztott fejlődési állapotok (SpEv, 10 h báb), illetve a $dAda2b^{842}$ mutánsok letál fázisa látható.

A transzkriptum analízishez kiválasztott fejlődési állapotokban western blot analízissel összehasonlítottuk a *dAda2b* mutáns és a vad típusban a H3K9 acetiláció mennyiségét (15. ábra). Vad típusban összehasonlítva a két vizsgált fejlődési állapotban a H3K9 acetiláció mennyiségét, az L3 állapothoz képest a báb állapotra jelentősen megemelkedett az acetiláció szintje. A *dADA2b* fehérje hiányában mind a késői L3 lárvális, mind a korai báb állapot során jelentősen lecsökkent a 9-es lizinen acetilált H3 hisztonok mennyisége. Ezek alapján tehát mindkét stádium alkalmas lehet a *dSAGA* specifikus H3K9 acetiláció génműködés szabályozásra kifejtett szerepének vizsgálatára.

Vad típusú és *dAda2b* egyedekből mind a két fejlődési állapotban (SpEv és 10 h báb) mRNS mintát izoláltunk, amit Christelle Thimbaud (IGBMC) strasbourgi Affymetrix laborjában fluoreszcens festékkel jelöltek, és a teljes *Drosophila* genomot reprezentáló cDNS microarrayhez hibridizáltak. Az analízis során t-teszt segítségével azonosítottuk azokat a géneket, amelyek expressziója a *dADA2b* mutáns esetében a vad típushoz képest szignifikáns eltérést mutatott. Ezek közül a minimum kétszeres expresszió-emelkedést, illetve expresszió-csökkenést mutató géneket tekintettük *dADA2b*-függő expressziót mutató géneknek.

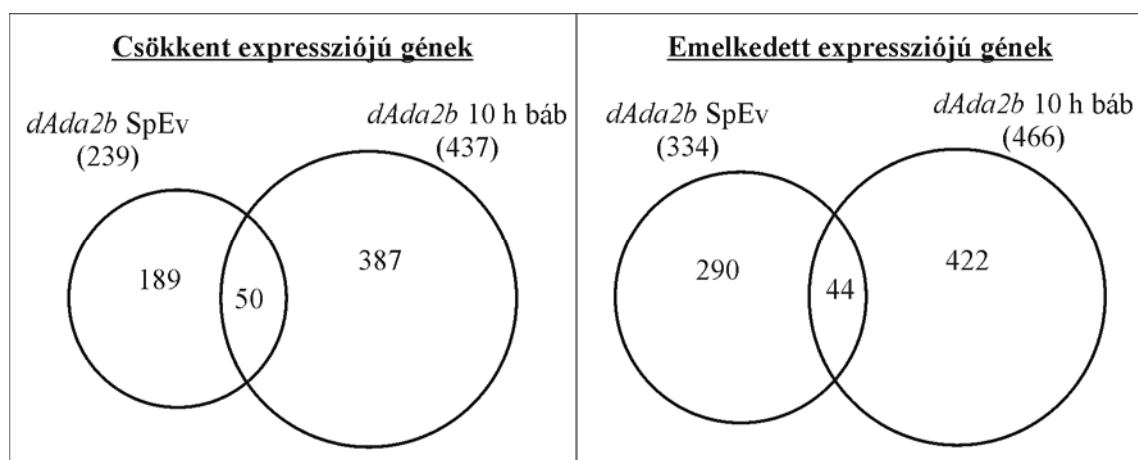


15. ábra: A dADA2b fehérje hiányában mind a késői lárvális, mind a korai báb állapotban csökkent mértékű H3K9 acetiláció jellemző

Az ábrán vad típusú és *dAda2b* mutáns késői L3 lárvából, valamint korai bábokból készült fehérjemintákon H3K9ac és H3 specifikus ellenanyaggal készült western blot kísérlet eredménye látható.

4.1.2 A dADA2b hiányában a vad típustól eltérő expressziót mutató gének számának meghatározása

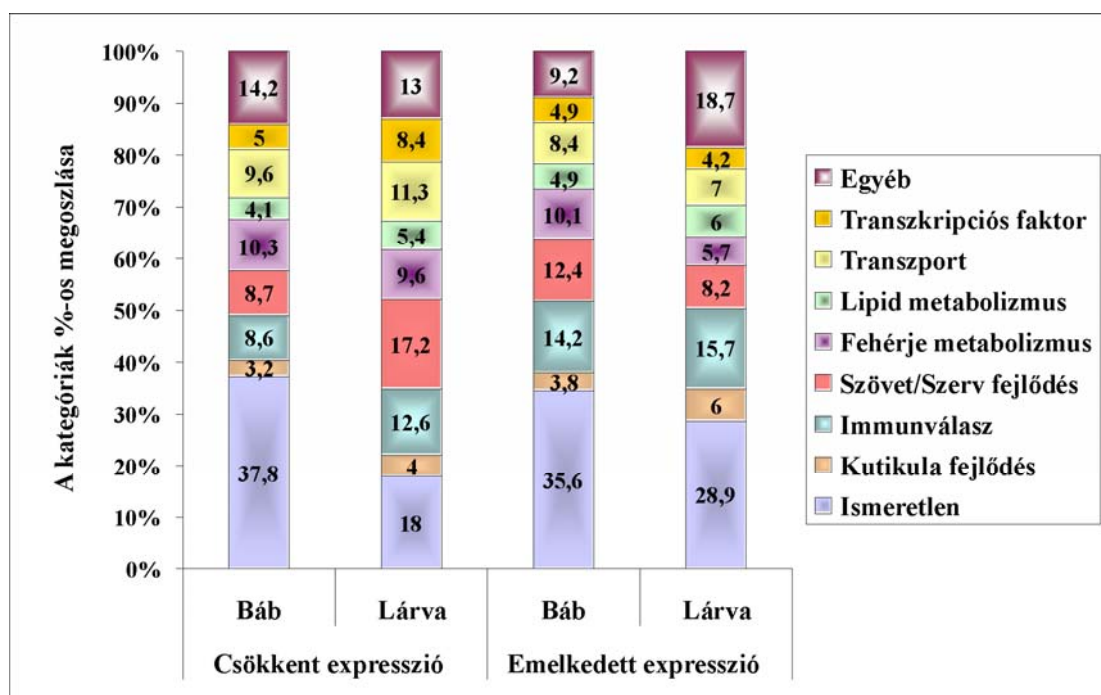
A fent említett paraméterek esetén a dADA2b fehérjék hiányában mindkét vizsgált fejlődési állapotban a gének kevesebb, mint 5%-a mutatott eltérő expressziós szintet (16. ábra). Az acetiláció szerepéről eddig kialakított képnek megfelelően a *dAda2b*⁸⁴² mutáció jelenlétében a lárvastádium végén (SpEv) 239, a báb állapotban (10 h báb) 437 gén mutatott csökkent mértékű expressziót. Viszont közel azonos számú gén esetében (334 és 466 db) legalább kétszeresen megemelkedett expressziót tapasztaltunk a dSAGA specifikus acetiláció hiányában. A dADA2b fehérjék hiányában mind a csökkent, mind az emelkedett transzkripciót mutató gének esetében csekély az átfedés a két vizsgált fejlődési állapot között, vagyis a lárvastádium végén változást mutató géneknek csak a 10 %-a mutat a korai bábstádium során is a vad típustól eltérő expressziót.



16. ábra: A *dAda2b* mutánsokban késői L3 lárva (SpEv) és báb (10 h báb) állapot során a vad típustól eltérően expresszálódó gének száma látható

4.1.3 dADA2b-függő expressziót mutató gének funkcionális csoportosítása

Bár mind a késői lárva, mind a korai báb állapotban a dADA2b-függő expressziót mutató gének száma alacsony, mindkét fejlődési állapotban hasonló funkcióval rendelkező gének mutattak a vad típusban mérttől eltérő transzkripciós szintet (17. ábra). Ezen funkció szerinti csoportosítás alapján elsősorban kutikula szintézisért felelős gének, néhány ekdizon indukált gén, valamint számos, az immunfunkcióban szerepet játszó fehérje génje mutatott jelentős mértékű dADA2b függést.



17. ábra: A dADA2b-függő transzkripciót mutató gének funkció szerinti csoportosítása a késői lárva, illetve a korai báb stádium során

GORilla program segítségével meghatároztuk, hogy a dADA2b-függő expressziójú gének között milyen génontológiai (GO) csoportokba eső gének mutatnak szignifikáns felhalmozódást. A különböző biológiai folyamatoknak (biological process) megfelelő génontológiai csoportok közül a SpEv és a 10 h báb állapot során is a biokémiai metabolikus folyamatok, valamint a SpEv állapotban a gamma-sugárzásra indukálódó fehérjék csoportjaiba tartozó gének mutattak csökkent mértékű expressziót (2. táblázat, Függelék F1. és F2. ábra). A dADA2b hiányában az emelkedett expressziót mutató gének egy része metabolikus és proteolitikus folyamatoknak megfelelő génontológiai csoportokba sorolható (3. táblázat, Függelék F3. és F4. ábra).

		GO csoportok		P-érték	E	R		
		biológiai folyamat	szint					
Csökkent expresszió	SpEv	GO:0009056	catabolic process	2	8,01E-04	2,31	18/187	
		↓	GO:0044248	cellular catabolic process	3	7,48E-04	2,57	15/187
		GO:1901615	organic hydroxy compound metabolic process	3	1,59E-04	4,54	9/187	
		↓	GO:0006066	alcohol metabolic process	4	8,87E-04	5,31	6/187
		GO:0006525	arginine metabolic process	9	6,08E-05	32,4	3/187	
	10 h báb	GO:0010332	response to gamma radiation	5	1,45E-04	22,41	3/338	
		GO:0006638	neutral lipid metabolic process	5	2,66E-05	12,45	5/338	
		↓	GO:0006639	acylglycerol metabolic process	6	2,66E-05	12,45	5/338
		↓	GO:0006641	triglyceride metabolic process	7	8,94E-06	14,94	5/338
		GO:0046364	monosaccharide biosynthetic process	6	3,53E-04	17,93	3/338	
		↓	GO:0019319	hexose biosynthetic process	7	3,53E-04	17,93	3/338
		↓	GO:0006094	gluconeogenesis	8	1,45E-04	22,41	3/338

2. táblázat: A *dAda2b* mutánsban csökkent expressziót mutató gének között azonosítható, szignifikánsan felülreprezentált biológiai folyamatoknak megfelelő génontológiai csoportok

A táblázatban az látható, hogy a vizsgált fejlődési állapotokban (SpEv és 10 h báb) a *dAda2b* mutánsban csökkent expressziót mutató gének mely biológiai folyamatnak megfelelő génontológiai (GO) csoportokban mutatnak szignifikáns feldúsulást. A nyilak a hierarchiában egymás alatt elhelyeződő GO csoportokat jelölik. A táblázatban csak a $P < 0,001$ szignifikancia szintnek megfelelő csoportok vannak feltüntetve.

E (Enrichment) = (adott GO csoportba eső, csökkent expressziót mutató gének száma / csökkent expressziót mutató gének száma) / (a microarray-en található, adott GO csoportba tartozó gének száma / a microarray-en található összes *Drosophila* gén)

R (Ratio) = adott GO csoportba eső, csökkent expressziót mutató gének száma / az összes csökkent expressziót mutató gének száma

Főként a korai bábállapotban az emelkedett expressziójú gének egy jelentős része az immunfunkcióval kapcsolatba hozható génontológiai csoportokba sorolható. Ezek között nagy számban megtalálhatóak például az antimikrobiális humorális immunválaszt megvalósító, a Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumok, valamint a gombák elleni immunvédekezést megvalósító fehérjék génjei.

		GO csoportok		P-érték	E	R		
		biológiai folyamat	szint					
Emelkedett expresszió	SpEv	GO:1901564	organonitrogen compound metabolic process	3	8,05E-04	1,95	26/238	
		↓	GO:0006022	aminoglycan metabolic process	4	3,40E-07	4,93	15/238
		↓	GO:0006040	amino sugar metabolic process	4	2,37E-06	4,88	13/238
		↓	GO:1901071	glucosamine-containing compound metabolic process	5	2,14E-06	4,93	13/238
		↓	GO:0006030	chitin metabolic process	6	1,02E-06	5,25	13/238
		↓	GO:0006508	proteolysis	5	1,04E-04	2,08	30/238
		↓	GO:0006959	humoral immune response	3	4,38E-04	4,41	8/238
		↓	GO:0006952	defense response	3	9,15E-04	2,63	14/238
	10 h báb	GO:0044036	cell wall macromolecule metabolic process	5	6,18E-04	9,48	4/328	
		↓	GO:0016998	cell wall macromolecule catabolic process	6	6,18E-04	9,48	4/328
		GO:0006508	proteolysis	5	8,27E-05	1,91	38/328	
		GO:0002376	immune system process	1	2,17E-07	3,44	23/328	
		GO:0051704	multi-organism process	1	5,50E-05	2,37	25/328	
		GO:0006955	immune response	2	6,40E-09	4,14	23/328	
		GO:0009607	response to biotic stimulus	2	9,80E-08	3,72	22/328	
		↓	GO:0051707	response to other organism	3	7,26E-08	3,79	22/328
		GO:0006959	humoral immune response	3	7,78E-10	6,39	17/328	
		↓	GO:0019730	antimicrobial humoral response	4	9,69E-11	7,82	16/328
		GO:0009620	response to fungus	4	6,96E-04	5,44	6/328	
		GO:0009617	response to bacterium	4	3,93E-05	3,54	14/328	
		GO:0006952	defense response	4	1,23E-06	3,12	23/328	
		↓	GO:0050832	defense response to fungus	5	4,14E-04	5,96	6/328
		GO:0042742	defense response to bacterium	5	1,45E-04	3,52	12/328	
		↓	GO:0050829	defense response to Gram-negative bacterium	6	1,24E-05	7,04	8/328
		GO:0050830	defense response to Gram-positive bacterium	6	1,09E-04	6,16	7/328	
		GO:0019731	antibacterial humoral response	6	1,48E-09	12,84	10/328	

3. táblázat: A *dAda2b* mutánsban emelkedett expressziót mutató gének között azonosítható, szignifikánsan felülreprezentált biológiai folyamatoknak megfelelő génontológiai csoportok

A táblázatban az látható, hogy a vizsgált fejlődési állapotokban (SpEv és 10 h báb) a *dAda2b* mutánsban emelkedett expressziót mutató gének mely biológiai folyamatnak megfelelő génontológiai (GO) csoportokban mutatnak szignifikáns feldúsulást. A nyilak a hierarchiában egymás alatt elhelyeződő GO csoportokat jelölik. A táblázatban csak a $P < 0,001$ szignifikancia szintnek megfelelő csoportok vannak feltüntetve.

E (Enrichment) = (adott GO csoportba eső, emelkedett expressziót mutató gének száma / emelkedett expressziót mutató gének száma) / (a microarray-en található adott GO csoportba tartozó gének száma / a microarray-en található összes *Drosophila* gén)

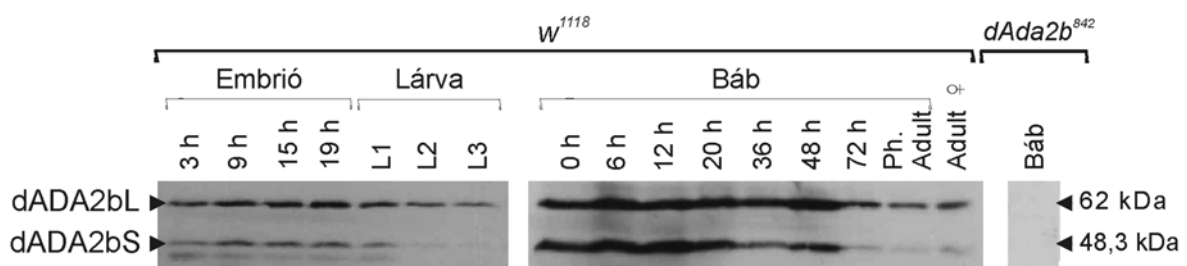
R (Ratio) = adott GO csoportba eső, emelkedett expressziót mutató gének száma / az összes emelkedett expressziót mutató gének száma

4.2 A dSAGA komplexre specifikus dADA2b alegység két izoformájának a dSAGA működésében betöltött funkciója

Az acetiláció szerepéről eddig kialakított képtől eltérően a transzkriptum analízis során a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció hiányában nemcsak csökkent, hanem emelkedett transzkripciót mutató géneket is azonosítottunk. Felvetődik a kérdés, hogy a kapott, ellentétes irányú transzkripciós változások hátterében esetleg a dSAGA komplex heterogenitása áll-e, vagyis hogy a dSAGA komplex esetleg többféle dADA2b alegység összetétellel is előfordulhat, amelyek esetleg más-más folyamatok szabályozásában vehetnek részt.

4.2.1 A dADA2b izoformák expressziójának vizsgálata

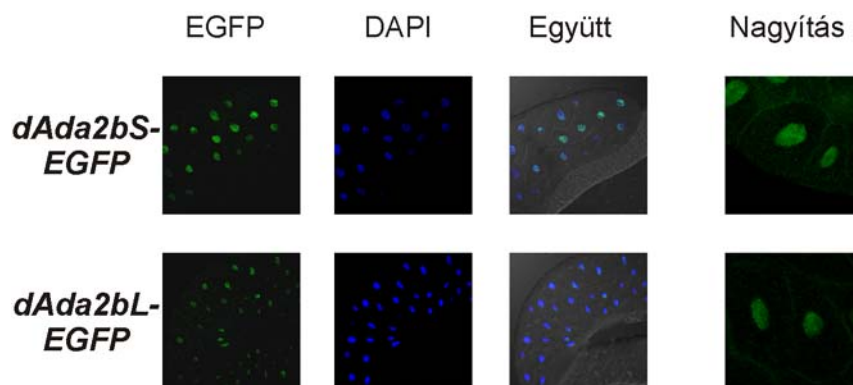
Megvizsgáltuk, hogy a különböző dADA2b fehérjék az egyedfejlődés különböző szakaszaiban milyen mennyiségben termelődnek, valamint hogy milyen sejten belüli elhelyezkedést mutatnak. A dADA2b fehérjék közös, N-terminális régiója ellen termeltetett anti-dADA2b ellenanyag segítségével w^{1118} genotípusú, különböző egyedfejlődési állapotú állatokon elvégzett western blot analízissel megvizsgáltuk a két fehérje expressziós mintázatát. Részletes felbontásban meghatároztuk az embrionális állapotban, a három (L1, L2, korai L3) lárva stádiumban, majd a báb állapot során – különös tekintettel a korai báb állapotra – valamint közvetlenül a bábból való kikelés előtt álló és kifejllett egyedekben is a dADA2b fehérjék szintjét (18. ábra).



18. ábra: Az ADA2bS és ADA2bL fehérjék expressziója az egyedfejlődés során az embrionális élet végén és a báb állapot kezdetén a legerősebb
Az ábrán a jelölt fejlődési állapotban vad típusú (w^{1118}) egyedeken dADA2b specifikus ellenanyaggal elvégzett western blot analízis eredménye látható.

Azt tapasztaltuk, hogy mindkét dADA2b izoforma az egyedfejlődés minden vizsgált szakaszában jelen van, legnagyobb mennyiségben a korai báb állapotban, valamint az embrionális élet során fejeződnek ki. A dADA2bS fehérje szintje az L2, korai L3 stádiumban és a kifejlett egyedekben a dADA2bL-hez viszonyítva rendkívül alacsony, így a rövid izoforma mennyisége az egyedfejlődés során egy sokkal nagyobb mértékű ingadozást mutat, mint amit a dADA2bL esetében láthatunk.

A dADA2b szöveti expressziójának, illetve sejten belüli elhelyezkedésének *in vivo* vizsgálatához a laborunkban korábban elkészített, zöld fluoreszcens (EGFP) fehérjével jelölt dADA2bS, illetve dADA2bL izoformát a *dAda2b* promóter irányítása alatt termelő transzgenikus *Drosophila* törzseket használtuk (*dAda2bS-EGFP* és *dAda2bL-EGFP*). Fluoreszcens mikroszkópiával késői L3 lárvák nyálmirigyeiben megvizsgálva az izoformák sejten belüli lokalizációját megállapítottuk, hogy mindkét dADA2b fehérje a sejtmagban található (19. ábra).



19. ábra: A dADA2bS-EGFP és dADA2bL-EGFP fehérjék expressziója

Az ábrán késői L3 lárvák nyálmirigyeiben az EGFP-vel jelölt dADA2b izoformák sejten belüli lokalizációja látható.

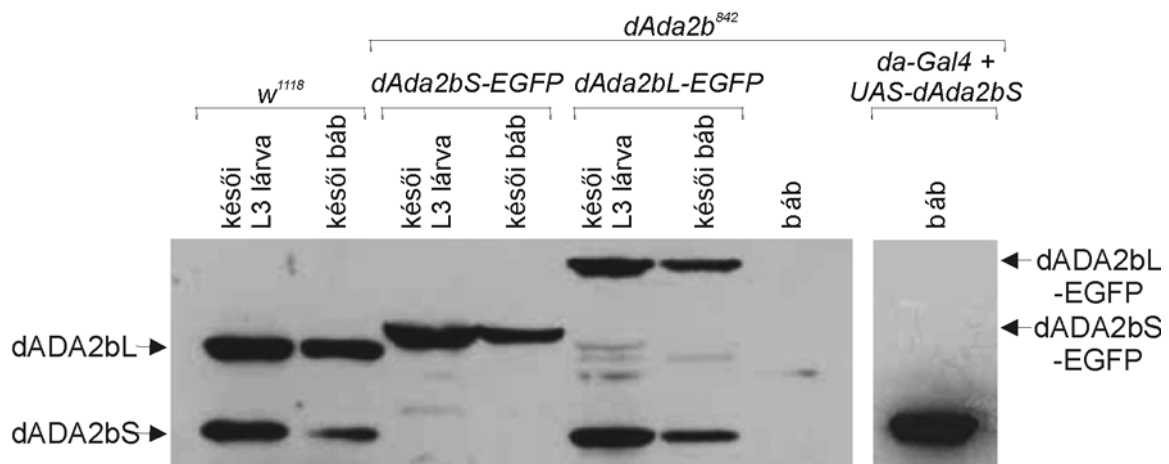
Tehát két eltérő módszerrel is azt az eredményt kaptuk, hogy a dADA2b fehérjék expressziója a metamorfózis kezdetén a legmagasabb, ami összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy a *dAda2b* gén működését megszüntető mutáció (*dAda2b⁸⁴²*) is a báb fejlődésének korai szakaszában, 12 órával az előbáb kialakulása után okoz letalitást [72].

4.2.2 A dADA2b rövid izoforma funkcionális vizsgálata

Korábbi kísérletek azt mutatták, hogy a *dAda2b*⁸⁴² deléció hatását a teljes *dAda2b* gén visszajuttatása képes komplementálni [72]. Mivel erről a genomi régióról mindkét dADA2b izoforma termelődik, felvetődött az a kérdés, vajon a harmadik ADA motívumot nem tartalmazó, rövidebb dADA2b izoforma önmagában képes-e ellátni a teljes dADA2b funkciót.

4.2.2.1 A dADA2b izoformák vizsgálatához használt transzgenikus törzsek jellemzése

A dADA2bS fehérje funkcionális vizsgálatához kétféle transzgenikus *Drosophila* törzset használtunk: egyrészt a *dAda2b* saját promóterének szabályozása alatt álló, a *dAda2b* endogén expressziójához hasonló kifejeződést biztosító transzgént (*dAda2bS-EGFP* konstrukció) hordozó törzset; másrészt az *UAS-dAda2bS* transzgenikus konstrukcióról *daughterless(da)-GAL4* driver segítségével túltermelő törzset (13. ábra). Kontrollként a *dAda2bL-EGFP* konstrukciót hordozó törzset használtunk, ahol a *dAda2b* promóter irányítása alatt termelődik a rövid, valamint az EGFP fehérjével jelölt hosszú izoforma is.



20. ábra: A dADA2b izoformák funkcionális vizsgálatához használt transzgenikus törzsek dADA2b fehérje termelése a vad típuséhoz hasonló

Az ábrán vad típusú (*w*¹¹¹⁸), *dAda2b*⁸⁴² mutáns, valamint *dAda2bS-EGFP*, *da-GAL4 + UAS-dAda2bS* és *dAda2bL-EGFP* transzgéneket tartalmazó törzsek késői L3 lárvából és késői bábból készült fehérjemintáin dADA2b specifikus ellenanyaggal készült western blot analízis eredménye látható.

A funkcionális vizsgálatához először összehasonlítottuk, hogy a transzgénekről történő fehérjetermelés mértéke összemérhető-e a vad típusban jelen lévő dADA2b fehérjék

menyiségével. Ehhez dADA2b fehérjére specifikus ellenanyaggal végzett western blot analízissel késői L3 lárva és késői báb állapotban megmértük a vad típusú (w^{1118}) kontrollhoz hasonlítva a *dAda2bS-EGFP*, *da-GAL4* + *UAS-dAda2bS* és a *dAda2bL-EGFP* konstrukciókról folyó dADA2b fehérjék kifejeződését (20. ábra).

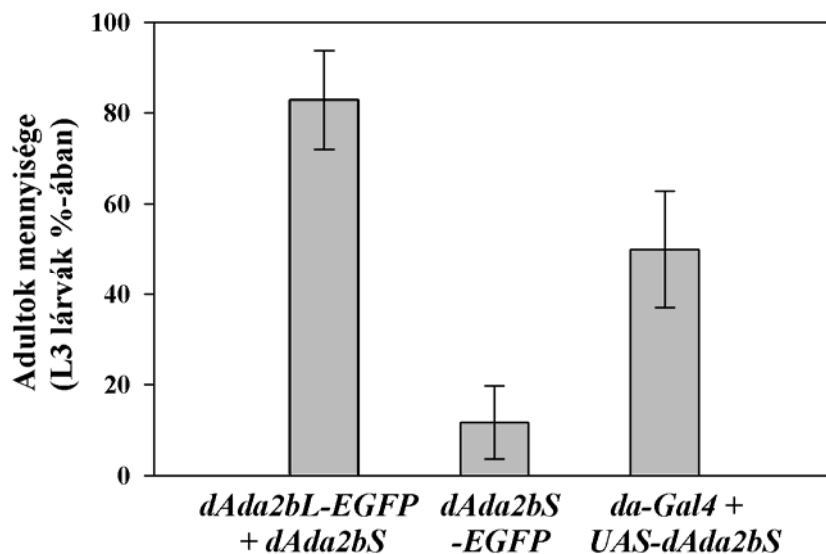
Mindkét fejlődési állapotban mind az endogén expressziót, mind a túltermelést biztosító konstrukciók esetében a dADA2b fehérjék kifejeződésének mértéke a vad típuséhoz hasonló. Ezek alapján úgy ítéltük meg, hogy ezek a transzgenikus törzsek alkalmas eszközként szolgálhatnak a dADA2bS fehérje funkcionális vizsgálatára.

4.2.2.2 A dADA2bS hatása a *dAda2b*⁸⁴² deléció letális fenotípusára

A *dAda2b*⁸⁴² mutáns fenotípus komplementációján alapuló kísérletekkel megvizsgáltuk, hogy ha *dAda2b*⁸⁴² mutáns háttéren egyedül a rövid izoformát expresszáltatjuk, akkor az önmagában képes-e menekíteni a mutáció okozta fenotípusokat.

Először megvizsgáltuk, hogy a *dAda2b*⁸⁴² mutáció okozta bábletalitást képes-e menekíteni a rövidebb izoforma jelenléte. Ehhez az imént jellemzett expressziós rendszereket, a *dAda2b* saját promóterének szabályozása alatt termelődő (*dAda2bS-EGFP*), valamint az UAS-GAL4 rendszer használatával túltermeltetett (*da-Gal4* + *UAS-dAda2bS*) dADA2bS fehérjét expresszázó törzseket használtuk. Mindkét dADA2b izoforma kifejeződését megszüntető *dAda2b*⁸⁴² deléciót hordozó null mutáns állatok 77%-a a báb állapot korai szakaszában (P5 stádium) elpusztul, míg a maradék 23% eléri a báb állapot végét, és a kikelést megelőző állapotban (pharate adult stádium) pusztul el. Megnéztük, hogy ha csak a dADA2bS izoforma van jelen, akkor az állatok hány százaléka éri el az imágó stádiumot. A pozitív kontroll (*dAda2bL-EGFP*) esetében mindkét izoforma (dADA2bL-EGFP + dADA2bS) jelenléte a mutánsok több mint 80%-ában volt képes a bábletalitás menekítésére (21. ábra). A rövid izoforma önmagában viszont csak részleges menekítésre képes, az endogén expresszió esetében a mutánsok 12%-a érte el a kifejlett imágó állapotot, míg a túltermeltetett esetben már az állatok 50%-a is kikelt. A *dAda2bS-EGFP* konstrukció esetében kapott gyengébb menekítés oka lehet az, hogy a közel 27 kDa nagyságú EGFP fehérje jelenléte megzavarja a dADA2bS funkcióját, esetleg a fehérje stabilitását. Mivel a 20. ábrán bemutatott western analízis alapján a *dAda2b* promóter a vad típuséhoz hasonló expressziós szintet biztosít, nem valószínű, hogy a látott menekítési különbséget a *dAda2b* promóter elégtelen funkciójából adódna. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy önmagában a

dADA2bS fehérje csak részlegesen képes ellátni a dADA2b egyedfejlődés során betöltött funkcióját.



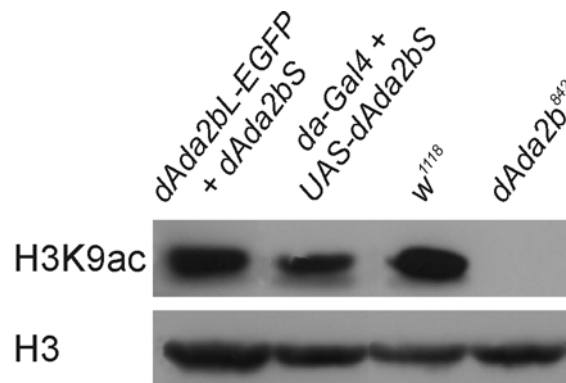
21. ábra: A dADA2bS fehérje részlegesen képes menekíteni a *dAda2b*⁸⁴² deléció okozta bábletális fenotípust

A grafikon a *dADA2bL-EGFP + dAda2bS*, a *dAda2bS-EGFP*, valamint a *da-Gal4* driver segítségével kifejezett *UAS-dADA2bS* genotípusok esetében, három párhuzamos kísérletből kapott menekítési adatok átlagát mutatja az L3 stádiumú lárvák százalékában kifejezve a kikelt *Drosophilák* mennyiségét.

4.2.2.3 A dADA2bS izoforma szerepe a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció létrehozásában

Ezekből az eredményekből kiindulva megvizsgáltuk, hogy más dADA2b specifikus funkciót hogyan képes a dADA2bS fehérje ellátni. Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy a dADA2b hiánya megszünteti a dSAGA komplex H3 hiszton 9-es lizinjének specifikus acetilációját [72]. Megvizsgáltuk, hogy a dADA2bS fehérje jelenléte elegendő-e ezen HAT funkció ellátásához, ezért mindkét izoformát expresszáló, valamint csak a rövid dADA2b izoformát túltermelő vándorló L3-as lárvákban western blot kísérletben megvizsgáltuk a H3K9 acetiláció szintjét (22. ábra). Mindkét dADA2b fehérje jelenlétében a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció szintje a *dADA2b* mutánsban tapasztalt alacsony szintről visszaáll a vad típusban látott szintre. Egyedül a rövid izoforma jelenlétében is tapasztaltunk dSAGA specifikus HAT aktivitást, viszont ennek a mértéke alacsonyabb, mint a vad típusban. Ez az eredmény is arra utal, hogy a dADA2bS izoforma önmagában nem képes teljes mértékben

ellátni a dADA2b funkciót. Tehát a dADA2bS fehérje jelenlétében létrejövő dSAGA komplex csak részlegesen képes a H3K9 acetilációra.



22. ábra: A dADA2bS izoforma jelenlétében csak részlegesen, míg mindkét dADA2b izoforma jelenlétében teljes mértékben képes a dSAGA komplex a H3K9 acetiláció létrehozására

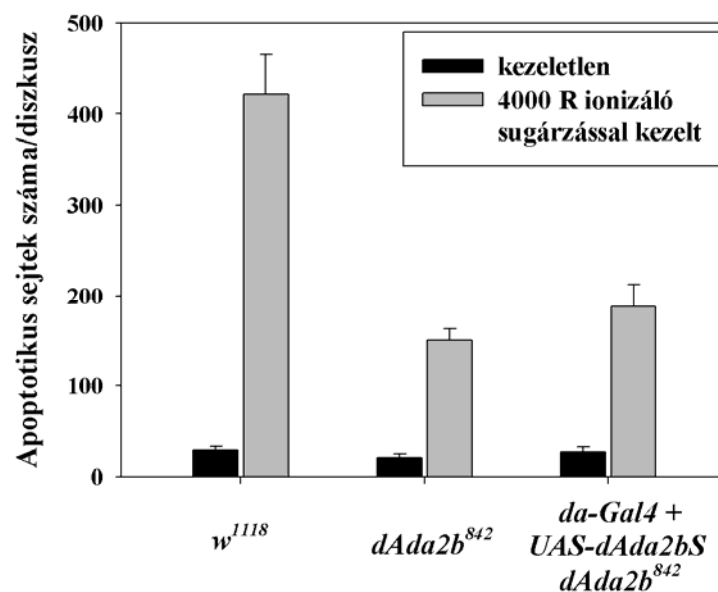
A western bolt kísérlet a mindkét dADA2b izoformát expresszáló (*dAda2bL-EGFP + dAda2bS*), valamint csak a rövidebb izoformát *dAda2b* mutáns háttéren túltermelő (*da-Gal4 + UAS-dAda2bS*) L3 lárvákban a 9-es lizinen acetilált H3 hiszton fehérjék mennyiségét mutatja a *dAda2b* mutáns (*dAda2b⁸⁴²*) és vad típusú (*w¹¹¹⁸*) kontrollokhöz viszonyítva.

4.2.2.4 A dADA2bS izoforma szerepe a Dmp53 által irányított apoptotikus folyamatok szabályozásában

Élesztőből származó adatok alapján a p53 tumor szupresszor fehérje transzkripciót aktiváló képességéhez szükség van az ADA2/ADA3/GCN5 adaptor komplex jelenlétére, valamint humán sejtekben is igazolták, hogy a p53 fehérje apoptózist indukáló képességéhez elengedhetetlen a hADA3 funkció [82]. Ezzel összhangban, a *Drosophila* dADA2b fehérje *in vitro* kölcsönhat a *Drosophila* p53 fehérjével (Dmp53), valamint *in vivo* részt vesz a Dmp53 fehérje segítségével végbemenő programozott sejthalál szabályozásában, ugyanis a *dAda2b* mutáció hatására nagy dózisu ionizáló sugárzást követően kevesebb sejt lép be az apoptózis folyamatába [59] [72]. Ezen előzetes adatokból kiindulva megvizsgáltuk, hogy a dADA2bS fehérje milyen funkciót tölthet be a Dmp53 által irányított apoptotikus folyamatok szabályozásában.

Az alkalmazott módszer elvi alapja az, hogy a nagy dózisu röntgensugárzás a DNS-ben kettős szálú töréseket okoz, amelyeket a sejtek – a károsodás mértékéhez viszonyítva – csak kis mértékben képesek javítani. Így azok a sejtek, amelyekben a károsodás mértéke túllép egy szintet, a Dmp53 fehérje által kiváltott apoptózisban elpusztulnak [83]. A kísérletben vad típusú, *dAda2b* mutáns, valamint csak a rövid dADA2bS izoformát

expresszáló lárvákat nagy dózisu röntgensugárzásnak tettünk ki, majd az apoptózisban elpusztult sejteket acridine orange fluoreszcens festékkel láthatóvá tettük, és imaginális diszkuszokban meghatároztuk az apoptotizáló sejtek számát. Röntgensugárzást követően a dADA2bS fehérje jelenlétében – a *dAda2b* mutánsokhoz hasonlóan – szignifikánsan kevesebb sejt lép apoptózisba, mint a vad típus esetén (23. ábra). Tehát, ha az dADA2 adaptorok közül egyedül a dADA2bS fehérje van csak jelen, a Dmp53 fehérje nem képes megfelelően aktiválni az apoptotikus folyamatokat.



23. ábra: A dADA2bS izoforma jelenlétében ionizáló sugárzást követően csökkent mértékű apoptózis figyelhető meg

A grafikon vad típusú (*w¹¹¹⁸*), *dAda2b* mutáns (*dAda2b⁸⁴²*) és a rövid dADA2b izoformát *dAda2b* mutáns háttéren kifejező (*da-Gal4 + UAS-dADA2bS*) kezeletlen illetve ionizáló sugárzással kezelt lárvák imágó korongjaiban az acridine orange festést mutató, apoptotikus sejtek számát a diszkuszok méretére korrigálva ábrázolja. Az ábrán három független kísérletben kapott értékek átlagai és az átlag szórások láthatóak.

Összességében elmondhatjuk, hogy bár a két dADA2b izoforma csak a C-terminális régióban különbözik egymástól, funkcionálisan mégsem ekvivalensek, ugyanis több funkciót is tesztelve, a harmadik ADA motívumot nem tartalmazó dADA2bS fehérje önmagában mégsem képes a teljes dADA2b funkció ellátására. Ennek oka nem egyszerűen mennyiségi különbségből adódik, mivel a rövid izoforma túltermeltetése is csak részleges funkciót eredményezett.

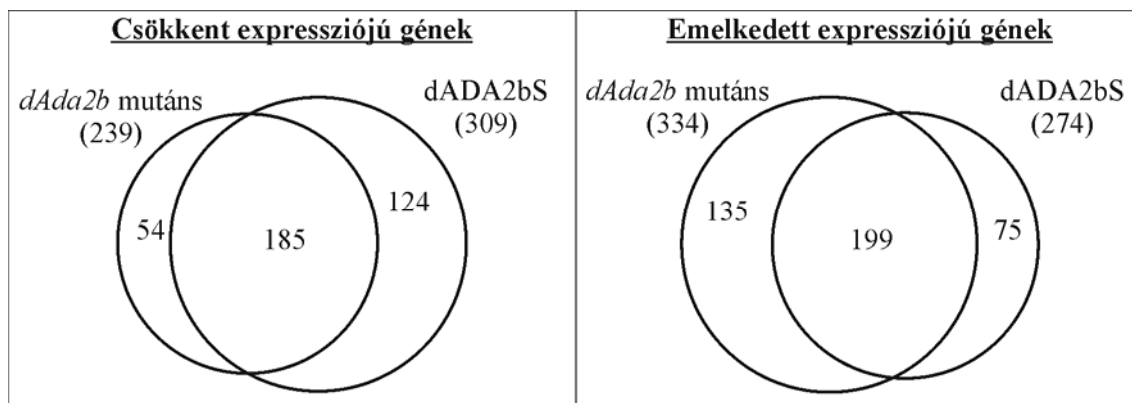
4.2.3 A dADA2bS izoforma transzkripció szabályozásra kifejtett hatásának vizsgálata

A dADA2bS izoforma vizsgálatánál tapasztalt részleges menekítőképesség hátterében esetleg az állhat, hogy a dADA2bS fehérje jelenlétében létrejövő dSAGA komplex a dADA2b hiányában látott eltérő irányú génműködés-változások közül csak az egyik irányú génexpressziós változások szabályozására képes. Ezen feltételezés igazolásához megvizsgáltuk, hogy a rövidebb dADA2b fehérje jelenléte a csökkent vagy az emelkedett expressziót mutató dADA2b-függő gének expresszióját befolyásolja. Ehhez transzkriptum analízist végeztünk *dAda2b* deléciós háttéren a *dAda2b* promóter irányítása alatt dADA2bS-EGFP fehérjét termelő SpEv állapotú lárvákon, melyet összevetettük a vad típusú, valamint a *dAda2b* deléciós mutáns esetében kapott expressziós adatokkal.

A 24. ábrán látható a *dAda2b* null mutáció, valamint a dADA2bS fehérje jelenlétében a vad típustól eltérő expressziót mutató gének száma. A *dAda2b* deléció hatására már láthattuk, hogy 239 gén expressziója lecsökkent a vad típushoz képest, amiket dADA2b-függő géneknek tekinthetünk. Meglepő módon a dADA2bS izoforma termelődése esetén ennél több, 309 gén mutatott csökkent expressziót. Ennek hátterében állhatnak másodlagos szabályozó hatások, például ha a dADA2bS izoforma represszor aktivitású fehérjék transzkripcióját is szabályozza. A két géncsoport közötti átfedés nagy, a dADA2b-függő gének 77%-a a dADA2bS izoforma jelenlétében is a vad típustól eltérő expressziót mutatott., míg a dADA2b-függő gének 22%-ának (54) kifejeződéséhez a rövid dADA2b izoforma jelenléte is elegendő. A teljes *dAda2b* funkció hiányában tapasztaltakhoz hasonlóan, a dADA2bS fehérje jelenlétében is találtunk számos olyan gént (274), amelynek az expressziója a vad típusban mérthez képest megemelkedett. Az emelkedett expressziójú dADA2b-függő gének 40%-ának (135) a kifejeződését a dADA2bS izoforma képes volt visszaállítani a normál szintre.

Láthattuk, hogy a dADA2bS izoforma a dSAGA-függő gének csak egy részének a megfelelő expressziójához elegendő. A többi dSAGA-függő gén kifejeződéséhez a hosszú dADA2b izoforma vagy esetleg mindkét izoforma együttes jelenléte szükséges.

Az elvégzett transzkriptum analízis alátámasztotta, hogy a dADA2bS izoforma önmagában a génexpressziós szabályozásban is csak egy részleges *dAda2b* funkciót képes betölteni. Bár a dADA2bS fehérje jelenlétében létrejövő dSAGA komplex alapvetően mindkét irányú génexpressziós szabályozásban szerepet játszik, a transzkripciót gátló folyamatok közvetítésében – akár elsődleges akár másodlagos hatásokon keresztül – mégis hatékonyabbnak bizonyul.



24. ábra: A dADA2bS izoforma önmagában a *dAda2b*-függő gének 20-40%-ánál képes a génexpresszió szabályozásban látott *dAda2b* funkció betöltésére
Az ábrán látható a *dAda2b* null mutáció, valamint a dADA2bS fehérje jelenlétében a vad típustól eltérő expressziót mutató gének száma

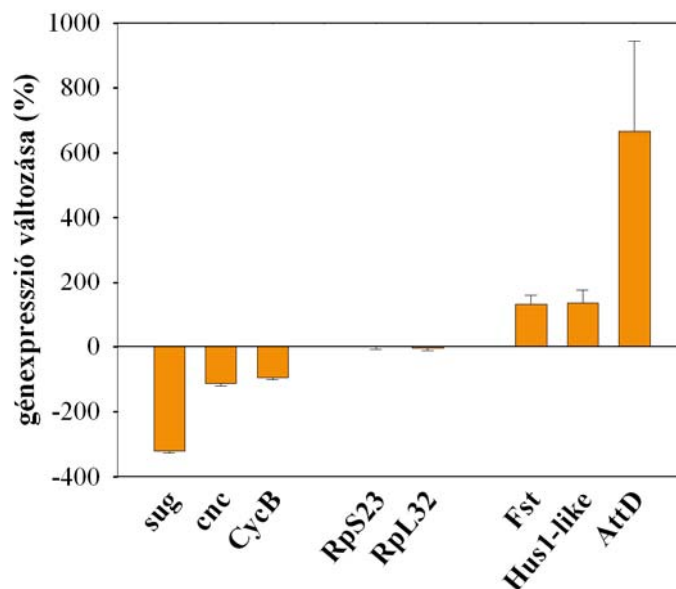
4.3 A dSAGA komplex által létrehozott H3K9 acetiláció a génexpresszió szabályozásában betöltött szerepének meghatározása

A microarray kísérletek alapján megállapítottuk, hogy a dSAGA specifikus acetiláció hiányában bizonyos gének csökkent, bizonyos gének viszont emelkedett mértékű expressziót mutatnak. Ezen változások háttérében viszont nem egy olyan jelenség áll, hogy két, a dADA2b alegység tekintetében eltérő összetételű dSAGA komplex közül az egyik az aktivációs, a másik a repressziós folyamatok szabályozásában játszana szerepet. Annak eldöntésére, hogy a dSAGA funkció közvetlen hatását láthatjuk-e mindkét irányú transzkripciós változás során, megvizsgáltuk, hogy ezek a változások együttjárnak-e a H3K9 acetiláció lecsökkenésével. Ehhez kromatin immunprecipitációs (ChIP) analízis során *w¹¹¹⁸* és *dAda2b⁸⁴²* mutáns SpEv L3 lárvák esetén meghatározott géneken megvizsgáltuk a H3K9 acetiláció szintjét és az RNS polimeráz II, valamint a dADA2b fehérje kötődését.

4.3.1 A ChIP kísérletben vizsgált gének jellemzése

A microarray kísérletben kapott expressziós változások alapján három kategóriába sorolhatjuk a géneket, ezek a dADA2b hiányában csökkent illetve megemelkedett expressziót, valamint expressziós változást nem mutató gének. A kromatin immunprecipitációs analízis során mind a három kategóriából vizsgáltunk géneket. A csökkent expressziót mutatók közül a *sugarbabe (sug)*, *cap and collar (cnc)* és a *cyclin B (CycB)* géneket választottuk ki. A

Cyclin B fehérje a sejtciklus egy fontos szabályozó eleme, míg a *sug* és *cnc* gének aktivátor hatású transzkripciós faktorokat kódolnak. Az emelkedett transzkripciót mutató gének közül a *Frost* (*Fst*), *Hus1-like* (*Hus1*), valamint az *Attacin-D* (*AttD*) promóter régióin vizsgáltuk meg a dSAGA specifikus acetiláció szintjét. A *Frost* gént azért is választottuk ki, mivel *Arabidopsis*-ban korábban már igazolták, hogy a SAGA komplex részt vesz a hideg által kiváltott stressz hatására végbemenő transzkripció aktivációjában [60], a *Frost* fehérjét pedig a hidegstresszre indukálódó fehérjeként azonosították [84]. Az *Attacin-D* az immunválasz egyik szereplőjeként ugyancsak stresszválasz kialakításában, a *Hus1-like* pedig a sejtciklus szabályozásában vesz részt. dSAGA-független géneknek tekintettük azokat a géneket, amelyek expressziója a dADA2b fehérje hiányában nem mutatott változást. Ebből a kategóriából a lárva stádium végén erősen expresszálódó géneket – az L32 és S23 riboszómális fehérjék génjeit (*Ribosomal protein L32-RpL32*, *Ribosomal protein S23-RpS23*) – választottuk ki az analízishez. A 25. ábra a ChIP kísérlethez kiválasztott dSAGA-függő *sugarbabe*, *cap and collar*, *cyclin B*, *Frost*, *Hus1-like*, *Attacin-D*, valamint a dSAGA-független *Ribosomal protein L32*, *Ribosomal protein S23* transzkripciót mutató géneknek a microarray analízis során a *dAda2b* mutánsban tapasztalt expressziós változásait mutatja.



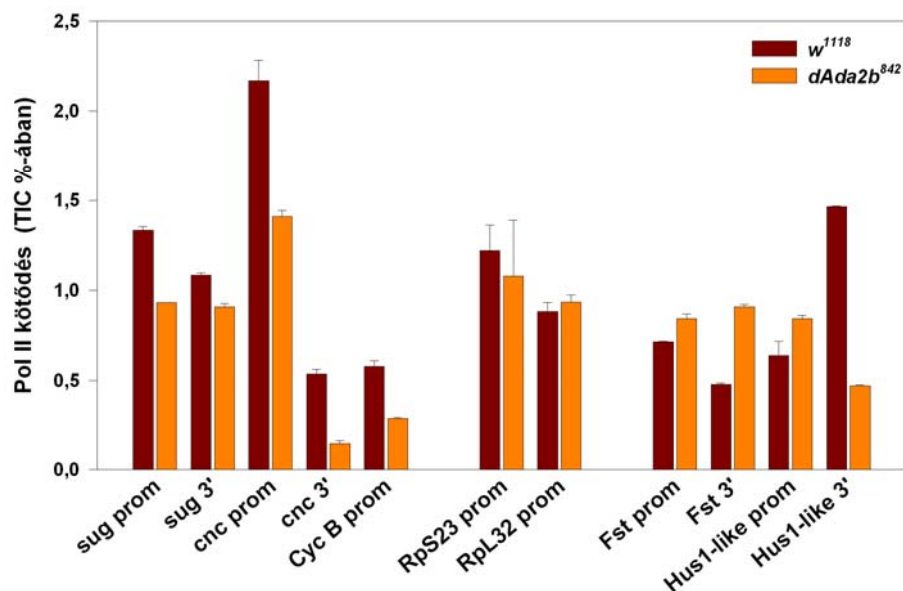
25. ábra: A ChIP analízishez kiválasztott gének a microarray analízis során, a *dAda2b* mutánsban tapasztalt expressziós változásai

[*sug-sugarbabe*, *cnc-cap and collar*, *CycB-cyclin B*, *Fst-Frost*, *Hus1-Hus1-like*, *AttD-Attacin-D*, *RpL32-Ribosomal protein L32*, *RpS23-Ribosomal protein S23*]

A kiválasztott gének promóter régióin, valamint a *sug*, *cnc*, *Fst* és *Hus1* gének esetében a gén 3' végi részén is megvizsgáltuk az RNS polimeráz II, a dADA2b fehérje, valamint a H3K9 acetiláció jelenlétét. Kontrollként négy intergenikus régió (Intergenic region 1-4) is meghatároztuk a kötődés mértékét.

4.3.2 A RNS polimeráz II mennyiségének meghatározása a módosult transzkripciót mutató gének területén

Annak kiderítésére, hogy az RNS polimeráz II kötődése a tapasztalt expressziós változásokkal összhangban van-e, RNS polimeráz II elleni ellenanyaggal vad típusú és *dAda2b* mutáns lárvákon CHIP-t végeztünk a dSAGA-függő, illetve a dSAGA-független géneken. A dSAGA-független *RpS23* és *RpL32* génekhez kapcsolódó RNS polimeráz II mennyisége mindkét genotípus esetén közel azonos, míg a dSAGA-függő géneken a *dAda2b* mutánsban kapott kötődés jelentősen eltér a vad típusétól (26. ábra). Tehát a transzkripció változásoknak megfelelően módosul a géneken jelen lévő RNS polimeráz II mennyisége: a dADA2b hiányában csökkent transzkripciót mutató géneken kevesebb, míg a fokozottan átírt gének promóterein több RNS polimeráz II mutatható ki.



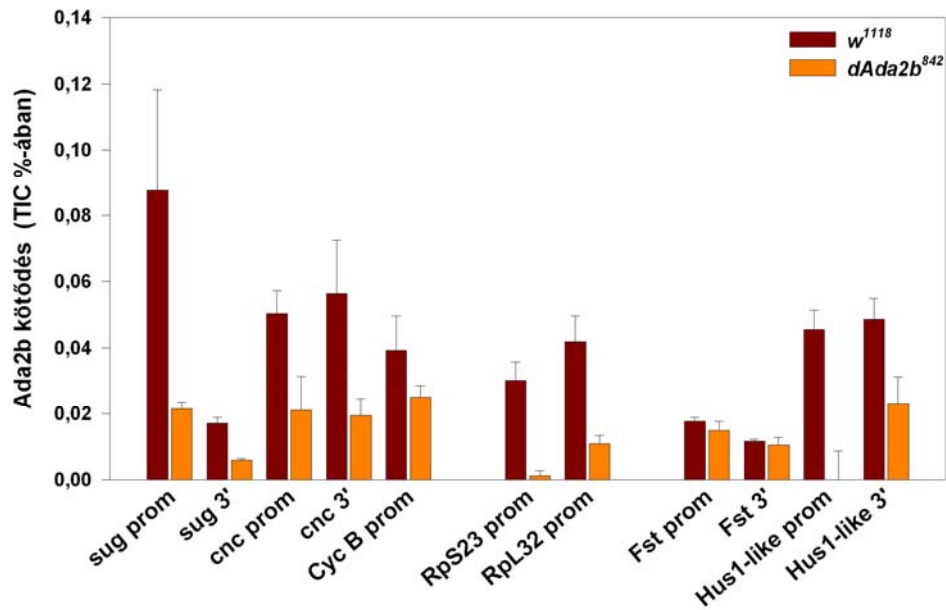
26. ábra: A dSAGA-függő gének területén a *dAda2b* mutáció okozta expressziós változásoknak megfelelően alakul a kötődött RNS polimeráz II mennyisége
Az ábrán a *w¹¹¹⁸* és *dAda2b⁸⁴²* mutáns mintákban Q-PCR-rel meghatározott, RNS polimeráz II által kötött genomi régiók mennyisége látható a teljes bemért kromatin %-ában (TIC %) ábrázolva.

4.3.3 A dADA2b fehérje kötődésének meghatározása a dSAGA-függő, valamint a dSAGA-független gének területén

Ezt követően azt szeretnénk volna megállapítani, hogy a *dAda2b* mutánsok transzkriptumanalízise során eltérő expressziót mutató gének szabályozásában közvetlen funkciót lát-e el a dSAGA komplex. Ezért *w¹¹¹⁸* és *dAda2b* mutáns SpEv lárvákban a dSAGA komplexre specifikus dADA2b fehérje elleni ellenanyaggal is kromatin immunoprecipitációt végeztünk (27. ábra). Ennek során a vad típusban mind a dSAGA-függő, mind a dSAGA-független gének promóterén és 3' végén is gyenge dADA2b kötődést tapasztaltunk. A *dAda2b* mutánsok esetén is minden vizsgált régió ugyan nagyon gyengén kimutatható volt a dADA2b kötődés, de ebben a kategóriában a kötődés erőssége általában a vad típus esetén kapott értéknek csak az 50 %-a volt. Ez a *dAda2b* mutáció jelenlétében tapasztalt csökkent mértékű kötődés arra utalhat, hogy a kimutatott kötődés valójában a dADA2b fehérje jelenlétéhez köthető. Bár teljes lárván ebben a fejlődési állapotban elvégzett western blot analízisben már nem kimutatható az anyai hatású dADA2b fehérjék jelenléte, a *dAda2b* mutáns esetében is tapasztalt enyhe dADA2b kötődést vagy a kromatin immunoprecipitációs eljárás nagyobb érzékenységéből, vagy esetleg a dADA2b ellenanyag specifikus kötődéséből fakadhat [85]. A fenti megfigyelés alól csak a *Frost* promótere és 3' régiója a kivétel, ahol a *dAda2b* mutáció esetén is hasonló mértékű dADA2b kötődést tapasztaltunk, mint a vad típusban. Ezek alapján elmondható, hogy a dSAGA-függő gének közül a *sug*, a *cnc*, a *CycB* és a *Hus1* génekhez kötődik a dADA2b fehérje, tehát ezek a gének a dSAGA komplex direkt célgénjeinek tekinthetők. A transzkripciósi adatok alapján dSAGA-független géneknek tekintett *RpS23* és *RpL32* gének promóter régióin is kimutatható volt a dADA2b jelenléte.

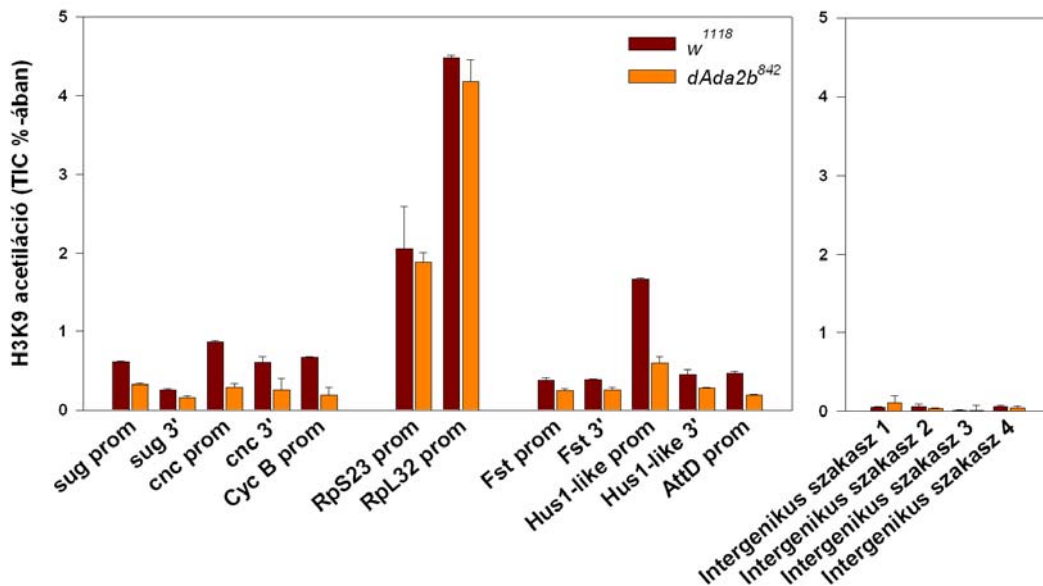
4.3.4 A dSAGA specifikus H3K9 acetiláció szintje az eltérő irányú transzkripciósi változást mutató dSAGA-függő gének területén

A dADA2b fehérje kötődése alapján dSAGA célgéneknek tekintett régiókon megvizsgáltuk, hogy a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció közvetlen szerepet tölt-e be a génexpresszió szabályozásában, vagyis hogy az eltérő irányú transzkripciósi változást mutató géneken hogyan alakul a H3K9 acetiláció szintje. Ehhez *w¹¹¹⁸* és *dAda2b⁸⁴²* mutáns SpEv lárvákban dSAGA-függő és dSAGA-független transzkripciót mutató géneket, valamint intergenikus kontroll régiókat vizsgálva K9 acetilált H3 hiszton elleni ellenanyaggal ChIP kísérletet végeztünk (28. ábra).



27. ábra: A dADA2b fehérje kötődése kimutatható a *sug*, *cnc*, *CycB*, *Hus1*, *RpS23* és az *RpL32* gének promóter régióiban

Az ábrán a *w*¹¹¹⁸ és *dAda2b*⁸⁴² mutáns mintákban Q-PCR-rel meghatározott, dADA2b által kötött genomi régiók mennyisége látható a teljes bemért kromatin %-ában (TIC %) ábrázolva.

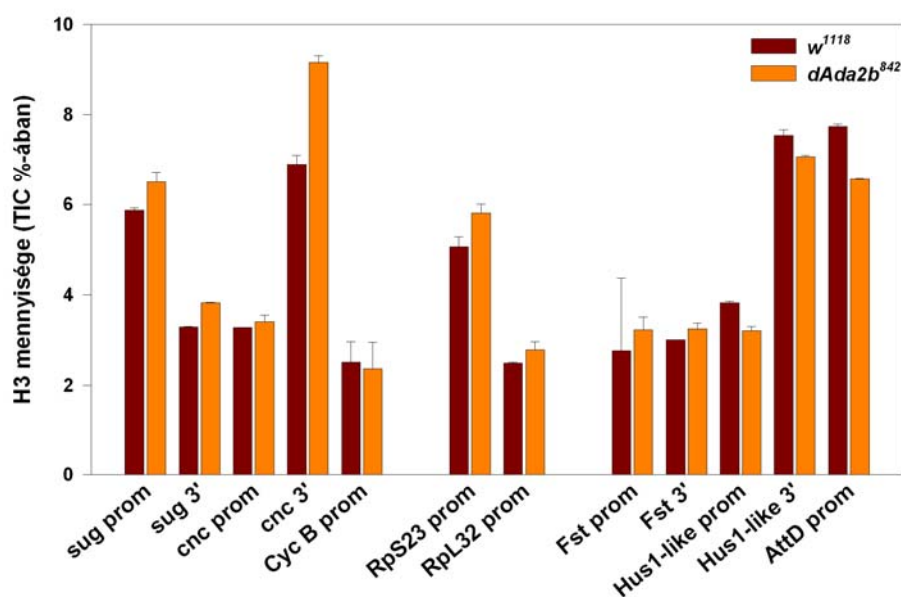


28. ábra: A H3K9 acetiláció szintje a *dAda2b* mutáció hatására mind a csökkent, mind az emelkedett expressziójú dSAGA-függő gének területén lecsökkent, míg a dSAGA-független és az intergenikus szakaszokon nem változott

Az ábrán a *w*¹¹¹⁸ és *dAda2b*⁸⁴² mutáns mintákban Q-PCR-rel meghatározott, H3K9ac ellenanyag által kötött genomi régiók mennyisége látható a teljes bemért kromatin %-ában (TIC %) ábrázolva.

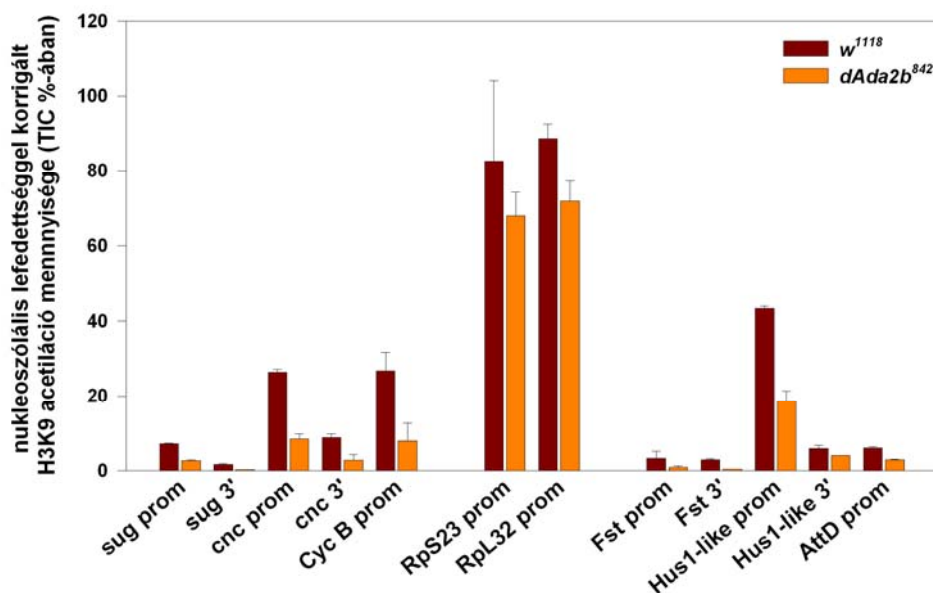
Látható, hogy a dSAGA-független, erősen expresszázó riboszómális fehérjék génjein (*RpS23* és *RpL32*) rendkívül magas a H3K9ac szintje, és ez a nagymértékű acetiláltság a dADA2b fehérje hiányában is fennmaradt. Ezzel szemben a dSAGA-függő gének közül, mind a csökkent, mind az emelkedett transzkripciót mutató géneken a dADA2b hiányában lecsökkent a H3K9 acetiláció szintje. A kontrollként használt intergenikus génszakaszokon az acetiláció szintje jóval alacsonyabb volt, mint az átírt régiókon, amit a dSAGA komplex nem befolyásolt. A látott acetilációs különbségek adódhatnak abból, hogy a különböző régiókon és különböző genotípusok esetében eltérő lehet a nukleoszómák mennyisége, ezért hiszton H3 fehérje elleni ellenanyag segítségével elvégzett ChIP kísérletben a vizsgált régiók nukleoszómális lefedettségét is meghatároztuk (29. ábra). Mind a vad típus, mind a *dAda2b* mutáns esetében hasonló mértékű lefedettséget kaptunk az összes vizsgált régióon, ami arra utal, hogy a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció hiánya nem okoz jelentős változást a DNS nukleoszóma lefedettségében. Egy genotípuson belül a vizsgált genomi régiók nukleoszómákkal történő borítottsága között viszont jelentős különbség figyelhető meg. Ezért a H3K9 acetilációs szintre vonatkozó adatokat korrigáltuk, leosztottuk a nukleoszómális lefedettséggel, így megkaptuk, hogy a kérdéses régiókban található nukleoszómák a hiszton H3-as fehérje 9-es lizinjén milyen mértékben acetiláltak (30. ábra). Látható, hogy a magas expressziójú riboszómális fehérjék génjeinek (*RpS23*, *RpL32*) promóter régiójában található nukleoszómák nagymértékben acetiláltak, és ez a H3K9 acetiláció a dSAGA hiányában is fennmarad. Az alacsonyabb mértékben expresszázó, dSAGA-függő gének területén lévő nukleoszómák alacsonyabb szinten acetiláltak, és ez a H3K9 acetiláció egy része dSAGA-függő, ugyanis a *dAda2b* mutáció hatására szintje jelentősen lecsökken. Mind a csökkent, mind a növekedett expressziót mutató gének területén megfigyelhető ez a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció jelenléte.

Ezen eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a dSAGA és az általa létrehozott H3K9 acetiláció összefügg a látott transzkripció változásokkal, viszont önmagában nem határozza meg azok irányát.



29. ábra: A vad típus és a *dAda2b* mutáns esetében ChIP kísérletben vizsgált régiók nukleoszómális lefedettsége hasonló, viszont egy genotípuson belül a különböző régiók között a nukleoszómák mennyiségét illetően jelentős eltérés tapasztalható

Az ábrán a *w¹¹¹⁸* és *dAda2b⁸⁴²* mutáns mintákban Q-PCR-rel meghatározott, H3 hiszton fehérjére specifikus ellenanyag által kötött genomi régiók mennyisége látható a teljes bemért kromatin %-ában (TIC %) ábrázolva.



30. ábra: Az erősen expresszálandó gének területén lévő nukleoszómák a dSAGA komplextől függetlenül magas szinten acetiláltak, míg a dSAGA-független gének kisebb mértékű, dSAGA specifikus acetilációs mintázatot mutatnak

Az ábrán a *w¹¹¹⁸* és *dAda2b⁸⁴²* mutáns minták esetén a nukleoszómális lefedettséggel (H3 specifikus ChIP eredmények) korrigált H3K9 acetilációt felismerő ellenanyaggal kapott ChIP eredmények látható a teljes bemért kromatin %-ában (TIC %) ábrázolva.

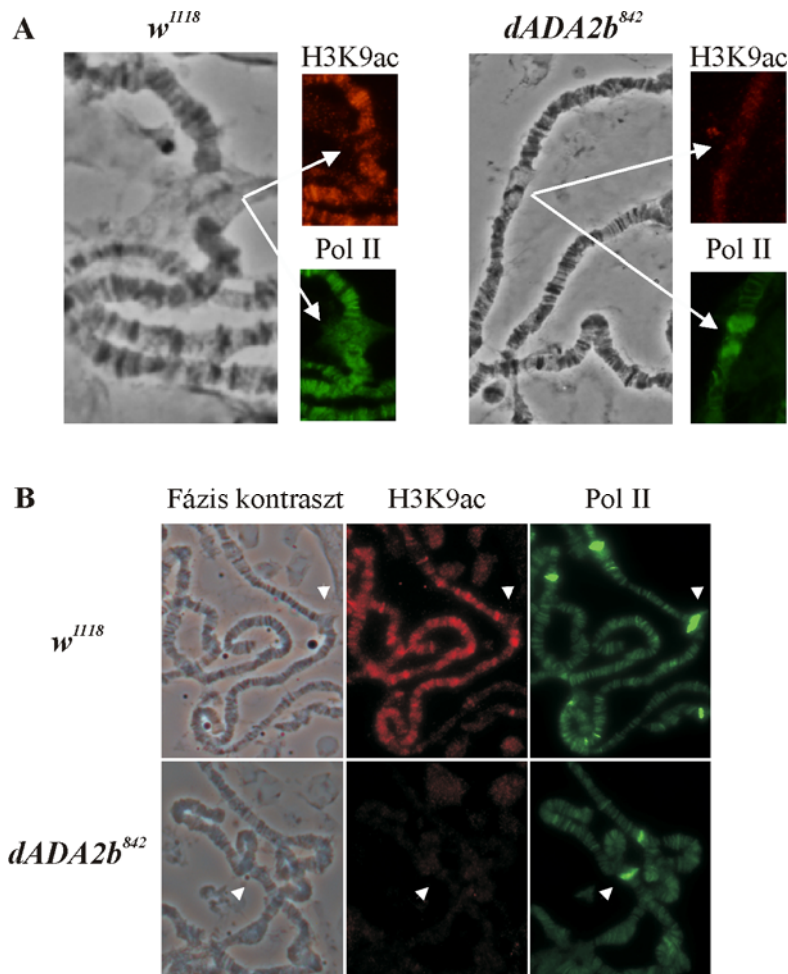
4.4 A dSAGA specifikus H3K9 acetiláció génaktivációban betöltött szerepének vizsgálata

Az eddigi eredményekből láthattuk, hogy egy jól meghatározott fejlődési állapotban a H3K9 acetiláció meghatározó szerepet tölt be bizonyos gének expressziójának szabályozásában, viszont arról, hogy a génaktiváció folyamatának szabályozásához hogyan is járul hozzá ez az acetiláció, még keveset tudunk. A dSAGA specifikus H3K9 acetiláció a génextpresszió szabályozásában betöltött szerepének további vizsgálatára egy *in vivo*, jól indukálható rendszert kerestünk, ahol könnyen feltérképezhető a génaktivációt kísérő acetilációs mintázat alakulása.

4.4.1 A H3K9 acetiláció szintjének meghatározása az aktivált hősokk gének területén

Először egy durvább megközelítésben vizsgáltuk meg, hogy egy erőteljes géningdukció folyamatát hogyan befolyásolja a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció szintje. A génextpresszió durvább, de *in vivo* nyomon követésére a hősokk géneket választottuk, mint könnyen indukálható és jól detektálható modellt. A génaktivációhoz *w¹¹¹⁸* és *dAda2b⁸⁴²* mutáns vándorló L3 lárvákban 30 perces 37 °C-os inkubációval indukáltuk a hősokk gének átírását. Ezt követően a lárvák nyálmirigyeiből óriáskromoszómát preparáltunk, és immunfestéssel meghatároztuk az aktív génátírás helyén a H3K9 acetiláció és az RNS polimeráz II jelenlétét. A kísérlet során megvizsgáltuk, hogy a génaktivációval összekapcsolt H3K9 acetiláció hiányában is kialakulnak-e az aktív génműködést jelző, fellazult kromatinszerkezetből adódó puffok az óriáskromoszómán, valamint hogy itt, az aktív transzkripció helyén tapasztalható-e fokozott hiszton H3K9 acetiláció. A kromoszómák immunfestése során vad típus esetében sem tapasztaltuk a hősokk puffok területén az acetiláció felhalmozódását (31. ábra). Látható, hogy a *dAda2b* mutánsoknál a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció hiányában is kialakulnak a hősokk puffok, és az RNS polimeráz II is kötődik ezen régiókhoz (31. A. ábra). Az RNS polimeráz II C-terminális doménjének 5-ös pozícióban található szerin foszforilált formáját felismerő ellenanyaggal végzett immunfestésből azt láthatjuk, hogy ez az aktív, átírást végző polimeráz a dADA2b hiányában is képes a hősokk génekhez kötődni, tehát feltételezhető, hogy az RNS polimeráz II H3K9 acetiláció hiányában is képes a transzkripció iniciációjára (31. B. ábra). Ebből arra

következtethetünk, hogy a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció jelenléte a hősokk gének esetében nem kizárólagos előfeltétele a transzkripció iniciációjának.



31. ábra: w^{1118} és $dAda2b^{842}$ vándorló L3 lárvák nyálmirigy óriáskromoszóma preparátumain a hősokk gének aktiválásakor az RNS polimeráz II kötődik a hősokk puffokba, míg a H3K9 acetiláció szintjében nem figyelhető meg emelkedés

A. A 87A/87C citológiai régióban található hősokk gének aktiválásakor kialakuló hősokk puffok területén az RNS polimeráz II mennyisége, valamint a H3K9 acetiláció szintje látható vad típusú és $dAda2b$ mutáns vándorló L3 lárvákban.

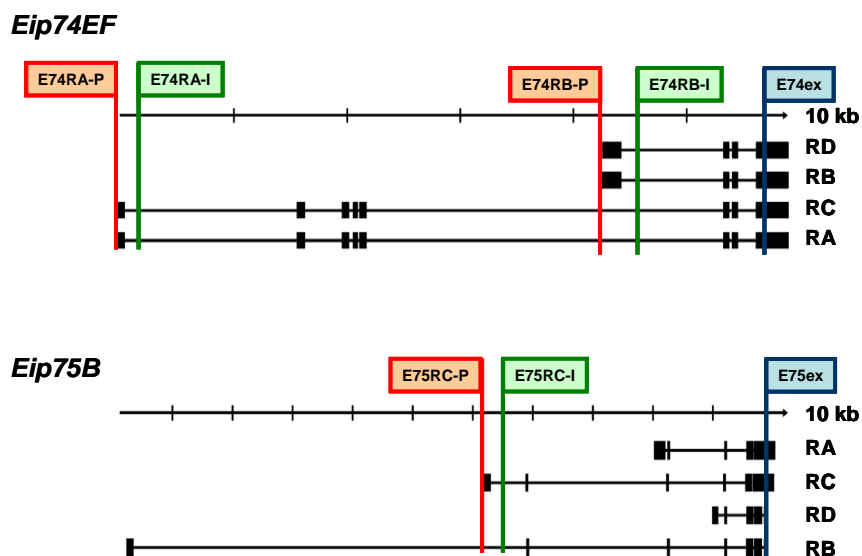
B. A 93D citológiai régióban található hősokk puffokban az aktív, a C-terminális domén 5-ös szerinjén foszforilált RNS polimeráz II, valamint a H3K9 acetiláció szintje látható vad típusú és $dAda2b$ mutáns vándorló L3 lárvákban.

4.4.2 A génaktivációt kísérő H3K9 acetiláció mintázatának meghatározása az *Eip74EF* és *Eip75B* ekdizon indukált korai géneken

A génaktiváció teljes folyamatát kísérő hiszton acetiláció részletesebb feltérképezéséhez az ekdizon hormon által szabályozott géneket választottuk modellnek. Ez a szteroid növekedési hormon a *Drosophila* egyedfejlődése során jól meghatározható

időpontokban jelenik meg, amikor a receptorához (EcR-USP) kötődve a kialakuló ligand-receptor komplex közvetlenül indukálja célgénjei transzkripcióját. Először az ún. korai gének indukálódnak, amelyek általában transzkripciós faktorokat kódolnak, amelyek további, ún. késői gének expresszióját aktiválják, amelyek kialakítják az adott állapotra jellemző génexpressziós mintázatot.

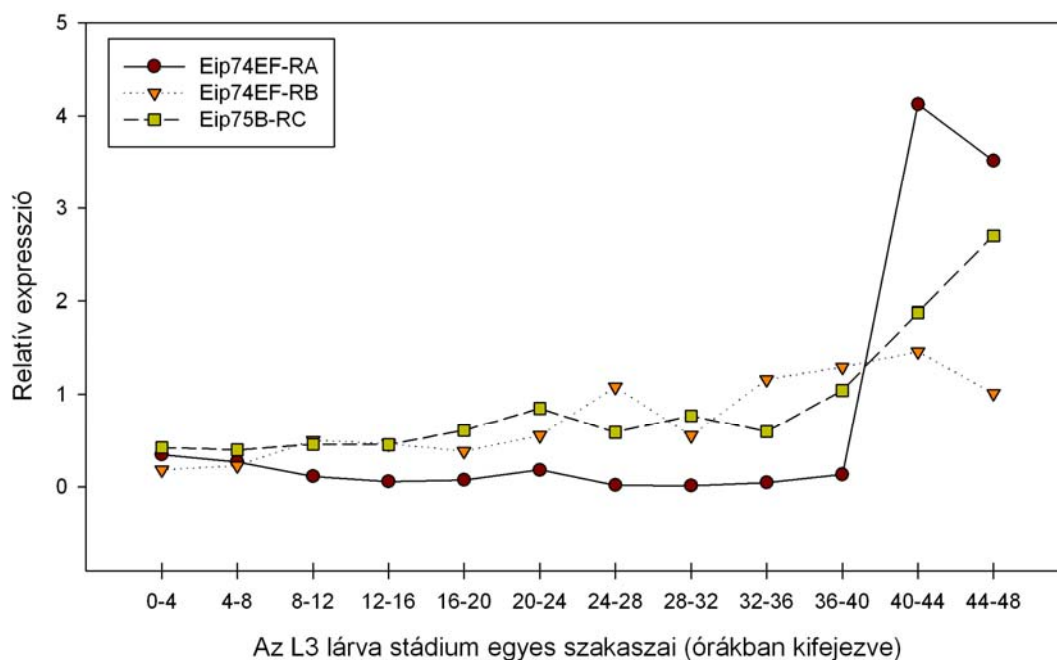
A génaktiváció során megjelenő acetilációs mintázat meghatározására két korai ekdizon által indukált gént - *Eip74EF* és *Eip75B* – választottunk ki. Mindkét gén összetett transzkripciós egység, amely több alternatív promóteréről számos transzkriptumvariáns termelődik (32. ábra). Az *Eip74EF* gén esetében az RA és az RB transzkriptum, az *Eip75B* génnél az RC variáns termelődését és promótereik acetiláltsági állapotát vizsgáltuk.



32. ábra: Az *Eip74EF* és *Eip75B* gének szerkezete

A FlyBase adatbázis alapján mindkét génről alternatív promóterek, valamint alternatív splicing mechanizmussal 4-4 transzkript variáns képződik (RA, RB, RC, RD). A génexpressziós analízis során az *Eip74EF*-RA, *Eip74EF*-RB és az *Eip75B*-RC variánsok termelődését vizsgáltuk az első intronok területére tervezett primer párok (E74RA-I, E74RB-I, E75BC-I) segítségével. Az ábra jelöli az ChIP során használt primer párok elhelyezkedését is.

A génműködéssel kapcsolatba hozható hiszton módosítási mintázat feltérképezéséhez először meghatároztuk az L3 lárvastádium során az *Eip74EF*-RA, *Eip74EF*-RB és az *Eip75B*-RC transzkriptumok kifejeződésének a mintázatát. Ehhez az L3 lárva stádium során 4 óránkénti felbontásban az RNS-ek első intronjára tervezett primerek segítségével megmértük a képződő transzkriptumok mennyiségét. Így az RT-PCR reakció során nem a felhalmozódó, érett mRNS-ek mennyiségét, hanem közvetlenül az indukció során termelődő nascens RNS mennyiségét határoztuk meg, amely sokkal jobban tükrözi a gén aktivitását.



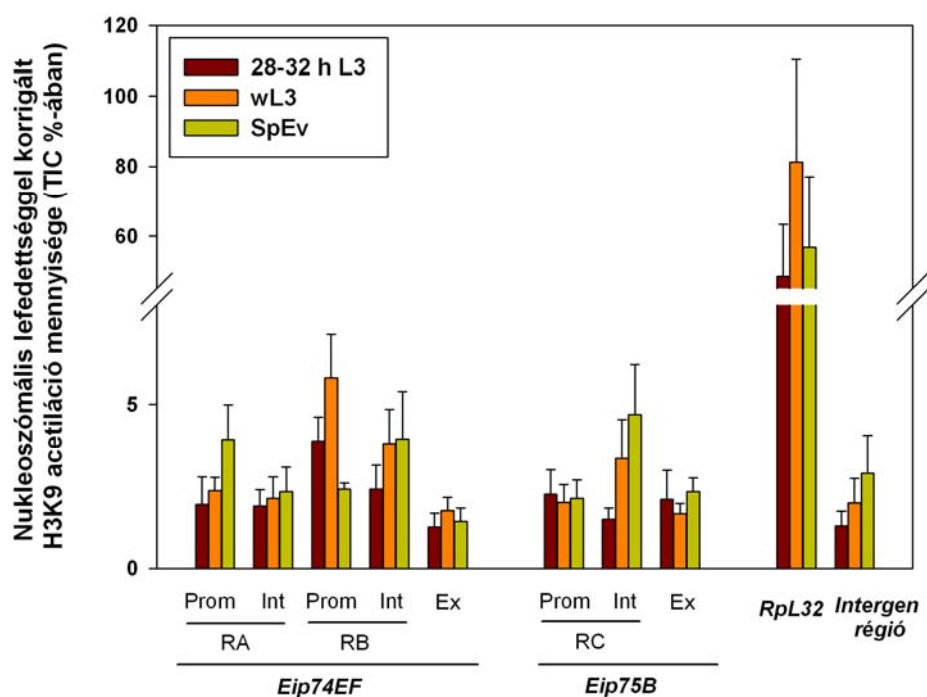
33. ábra Az *Eip74EF-RA*, *Eip74EF-RB* és az *Eip75B-RC* promóterek transzkripció aktivitása az L3 lárvastádium során

Az ábrán a w^{118} állatokban a harmadik lárvastádium során az *Eip74EF-RA*, *Eip74EF-RB* és az *Eip75B-RC* promóterekről képződő RNS-ek mennyisége a kontrollként alkalmazott *RpL32* gén expressziójához viszonyítva látható. Az ábrázolt értékek három független kísérlet átlagából származnak.

Az analízis alapján a különböző promóterek eltérő ekdizon koncentrációnál aktiválódnak, valamint a létrejött indukció mértéke is eltérő (33. ábra). Az *Eip74EF-RA* promóter alacsony ekdizon szintnél gyakorlatilag represszált állapotban van, majd csak az L3 lárvastádium legvégén megjelenő magas ekdizon szintnél aktiválódik. Az itt látott indukció mértéke rendkívül magas, az L3 lárvastádium elején mérthez képest több, mint húszszoros mennyiségben van jelen. Az *Eip74EF-RB* belső promóterrel képződő RNS az L3 lárvastádium első felében alacsony mennyiségben van jelen, ami a stádium második felében egy kisebb, legfeljebb háromszoros emelkedést mutat. Ezen promóter a teljes lárvastádium során egy közepes szintű aktivitást mutat. A másik korai gén, az *Eip75B-RC* belső promótere az *Eip74EF-RB*-hez hasonlóan már alacsonyabb ekdizon szintnél, az L3 stádium első felében közepes aktivitást mutat, ami az L3 stádium végére hatszorosára emelkedik. A mért génexpresszió szintje megközelíti az *Eip74EF-RA* promóter esetében mért szintet, viszont a létrejött indukció mértéke nem éri el az *Eip74EF-RA* promóter esetében tapasztaltat.

A génaktivációt kísérő H3K9 acetilációs szint meghatározásához három időpontot, egy ekdizon indukció előtti állapotot, valamint egy-egy, az indukció korai és késői fázisába eső

időpontot választottunk ki. Ezek az időpontok könnyen és jól azonosítható egyedfejlődési stádiumoknak felelnek meg. Az indukció előtti, alacsony ekdizon szinthez köthető állapotot (28-32 h) úgy azonosítottuk, hogy 4 órás ablakkal L2-L3 lárvastádium közötti vedlésre szinkronizáltuk az állatokat, majd ettől a null időponttól számolva 28 óra elteltével gyűjtöttük össze a lárvákat. Második vizsgálati időpontnak a vándorló L3 lárvastádiumot (wL3) választottuk. Ez az L3 lárva-előbáb átmenet előtt kb. 10 órával kezdődik el, amikor a lárvák elhagyják a táptalajt, nem táplálkoznak, a fiola falán „vándorolnak”. Ezt az egyedfejlődési állapotot az ekdizonszint emelkedése váltja ki. A harmadik vizsgálati időpontnak az L3 lárva állapot legvégét választottuk, amikor a rendkívül magas ekdizonszint beindítja a lárva-előbáb átalakulást (SpEv). Ezen folyamat során a lárva mozdulatlaná válik, teste rövidülni kezd, valamint megjelennek az anterior spirákulumok. Az említett három időpontban kromatin immunprecipitációt végeztünk acetilált H3K9 elleni ellenanyaggal, és meghatároztuk acetiláció mennyiségét az *Eip74EF* és *Eip75B* gének különböző szakaszain. Specifikus primerek segítségével az *Eip74EF-RA* (E74RA-P), *Eip74EF-RB* (E74RB-P) és az *Eip75B-RC* (E75RC-P) promótereknek megfelelő régiót, valamint mindhárom transzkriptum esetén a promótert követő első intron területét (E74RA-I, E74RB-I, E75RC-I), valamint a transzkriptumok 3' végi exonikus régióinak (E74ex, E75ex) megfelelő genomikus területeket vizsgáltuk meg (32. ábra). Kontrollként meghatároztuk egy intergenikus régió és egy konstitutívan magas szinten átíródó gén (*RpL32*) promóterén is az acetiláció mennyiségét. Az elvégzett ChIP kísérletben az összes általunk vizsgált genomi régióban sikerült detektálni a H3K9 acetilációt (34. ábra). Az eukromatikus területen elhelyezkedő intergenikus kontroll régióhoz viszonyítva az acetiláció szintje kisebb mértékű feldúsulást mutat a promóter és az intronikus régiók területén az adott promóter aktivitásának megfelelően. Például az *Eip74EF-RB* promóter a vándorló lárva stádium során mutat legnagyobb indukciót, amely a promóteren látható acetiláció mennyiségében is tükröződik. Az *Eip74EF-RA* és az *Eip75B-RC* promóterek a SpEv állapotban látott nagymértékű aktivációnak megfelelően ebben az állapotban a legnagyobb mértékben acetiláltak. Emelett a H3K9 acetiláció mennyisége arányos volt az adott génről folyó transzkripció erősségével, ugyanis ezen módosítás szintje a kontrollként használt magas szinten expresszálódó, riboszómális fehérjét kódoló gén (*RpL32*) promóterén egy nagyságrenddel magasabb volt, mint a vizsgált ekdizon indukált géneken. Tehát a H3K9 acetiláció az általunk vizsgált géneken egy általánosan előforduló módosítás, amely a promóterek környékén az expresszió mértékével arányos feldúsulást mutat.



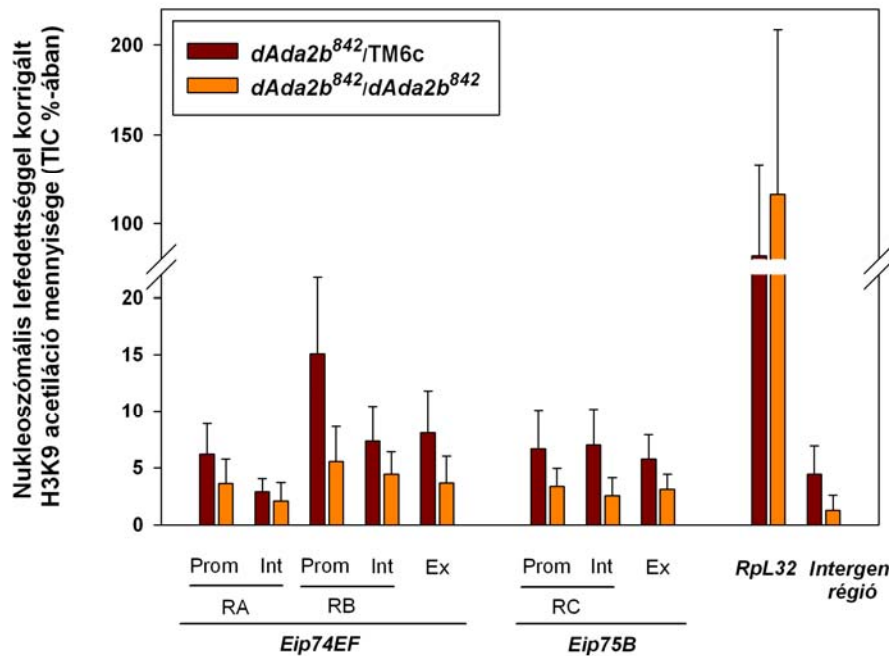
34. ábra A H3K9 acetiláció egy általánosan jelen lévő hiszton módosítás, amelynek szintje korrelál a transzkripció erősségével

Az ábrán a Q-PCR-rel meghatározott, H3K9ac ellenanyag által kötött genomi régiók mennyisége látható a teljes bemért kromatin %-ában (TIC %) ábrázolva, korrigálva az adott régió nukleoszómális lefedettségével. A grafikon három független kísérlet során kapott értékek átlagait és szórásait mutatja.

4.4.3 Az *Eip74EF* és *Eip75B* gének aktivációja során megjelenő H3K9 acetilációs mintázat létrehozásáért felelős HAT azonosítása

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a dSAGA komplex felelős-e az *Eip74EF* és *Eip75B* gének aktivációja során jelen lévő H3K9 acetiláció létrehozásáért. Ehhez H3K9ac ellen specifikus ellenanyaggal kromatin immunprecipitációt végeztünk *dAda2b^{d842}* deléciót heterozigóta valamint homozigóta formában hordozó vándorló L3 stádiumú lárvákban (wL3) (35. ábra). Látható, hogy az *Eip74EF* és *Eip75B* ekdizon indukált géneken általánosan előforduló H3K9 acetiláció létrehozásáért a dSAGA komplex a felelős, ugyanis a *dAda2b* gént inaktiváló deléciót homozigóta formában hordozó lárvákban a H3K9 acetiláció szintje ezeken az ekdizon indukált géneken a felére esik vissza. A heterozigóta kontroll esetében az ekdizon indukált gének promóterei közül ebben a fejlődési állapotban a legerősebben expresszálódó *Eip74RB* izoforma promótere (*Eip74EF-RB prom*) a legmagasabban acetilált. A magas szinten átírt, dSAGA-független *RpL32* gén promóterének H3K9 acetilációs szintje

egy nagyságrenddel magasabb az ekdizon indukált génekénél. Ezek az eredmények is alátámasztják a vad típusú lárvákban a H3K9 acetilációról tett megállapításunkat, miszerint ezen acetiláció mennyisége arányos az adott génről folyó transzkripció erősségével.



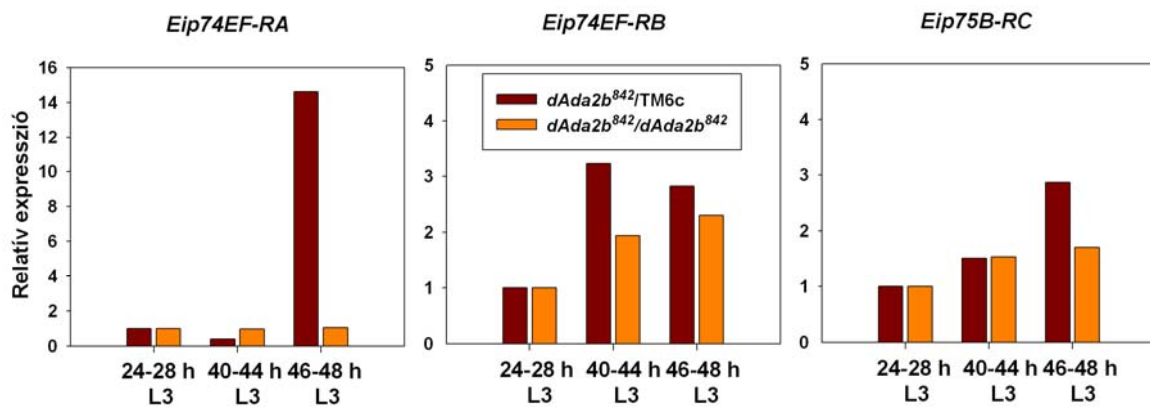
35. ábra Az *Eip74EF* és *Eip75B* ekdizon indukált gének területén jelen lévő H3K9 acetiláció létrehozásáért a dADA2b tartalmú dSAGA komplex a felelős

Az ábrán a *dAda2b^{d842}* homozigóta mutáns (*dAda2b⁸⁴²/dAda2b⁸⁴²*) és heterozigóta kontroll (*dAda2b⁸⁴²/TM6c*) vándorló L3 stádiumú lárvákban a Q-PCR-rel meghatározott, H3K9ac ellenanyag által kötött genomi régiók mennyisége látható a teljes bemért kromatin %-ában (TIC %) ábrázolva, korrigálva az adott régió nukleoszómális lefedettségével. A grafikon három független kísérlet során kapott értékek átlagait és az átlag szórásokat (SEM) mutatja.

4.4.4 A dSAGA specifikus H3K9 acetiláció szerepe az *Eip74EF* és *Eip75B* ekdizon indukált gének aktivációjában

Láthattuk, hogy a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció a génaktiváció során jelen van az *Eip74EF* és *Eip75B* gének területén, és szintje összefügg az adott génről folyó transzkripció erősségével. Annak megfejtésére, hogy milyen funkciót tölt be az ezeken a géneken megfigyelt H3K9 acetiláció azok aktivációja során, megmértük hogyan alakul az *Eip74EF* és *Eip75B* ekdizon indukált gének aktivációja a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció hiányában. Ehhez RT-Q-PCR kísérletben a *dAda2b^{d842}* deléció homozigóta, valamint kontrollként heterozigóta formában hordozó L3-as lárvákban meghatároztuk indukáció előtt, az

indukció korai és késői fázisában a termelődő Eip74-RA, Eip74-RB valamint az Eip75-RC transzkriptum mennyiségét. Az indukció előtti állapotnak az L3 lárva stádium kezdetétől számított 24-28 órás időpontot tekintettük, a mért indukciók mértékét ehhez a kiindulási expressziós adatokhoz viszonyítottuk. A korai, valamint a késői indukciós periódusoknak az L3 lárva stádium kezdetét 40-44, valamint 46-48 órával követő időszakokat tekintettük. A korábban leírt expressziós profiloknak megfelelően az *Eip74EF-RB* valamint az *Eip75B-RC* promóterek esetében az indukció korai és késői fázisában két-háromszoros mértékű aktivációt tapasztaltunk, amely kis mértékben csökken a dADA2b hiányában (36. ábra). Az eközön indukció késői fázisában az Eip74RA transzkriptum mennyiségében tapasztalt nagymértékű növekedés a dADA2b fehérje hiányában elmarad, tehát az *Eip74EF-RA* promóter nagymértékű indukciójához szükséges az dSAGA specifikus általános acetiláció jelenléte.



36. ábra Az *Eip74EF-RA* promóter aktivációja elmarad, az *Eip74EF-RB* és *Eip75B-RC* promóter indukciója csak kis mértékben csökken a dSAGA specifikus acetiláció hiányában

Az ábrán a *dAda2b^{d842}* homozigóta mutáns és heterozigóta kontroll egyedekben az L3 lárva stádium három különböző szakaszában Q-PT-PCR kísérlettel mért Eip74RA, Eip74RB valamint Eip75RC transzkriptumok mennyisége a 24-28 órás/indukció előtti értékekhez viszonyítva látható.

5. Eredmények megvitatása

A nukleoszómális hiszton fehérjék acetilációja nagymértékben hozzájárul a kromatinszerkezet dinamikus átalakításához, így fontos funkciót tölt be a transzkripció szabályozásában. Számos megfigyelés alapján a hiszton fehérjék acetilációja az aktív transzkripcióval hozható összefüggése, viszont a szabályozási folyamat pontos részletei még kevésbé ismertek. A szabályozás részleteinek megismeréséhez nagymértékben hozzájárulnak a hiszton acetiltranszferáz (HAT) enzimek vizsgálata során nyert információk. Az egyik legjobban jellemzett HAT aktivitású fehérje a Gcn5, amely több alegységes fehérje komplex tagjaként látja el acetilációs funkcióját [45]. A Gcn5-tartalmú HAT komplexek ADA-típusú adaptor fehérjéket is tartalmaznak, amelyek a Gcn5 fehérje aktivitásának és specificitásának a meghatározásában játszanak szerepet [47]. A *Drosophila*-ban előforduló egyik Gcn5-tartalmú HAT komplex, a dSAGA acetilációs moduljának egyik alegysége a dADA2b fehérje, amely szükséges a komplex H3 hiszton 9-es és 14-es lizinjére specifikus acetilációs aktivitásához [72]. A dolgozatomban a dADA2b funkciót eltávolító (*dAda2b*⁸⁴²) deléció alkalmazásával meghatároztuk, mely gének szabályozásában vesz részt a dSAGA specifikus H3K9 és H3K14 acetiláció, valamint hogy e módosítások szintje hogyan befolyásolja a génaktivációt. Az ismertetett eredmények segítségével újabb információkat nyerhettünk a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció transzkripció szabályozásában betöltött szerepéről.

5.1 A dSAGA acetiltranszferáz komplex szabályozása alatt álló gének

Teljes transzkriptum analízist végeztünk vad típusú és *dAda2b* mutáns egyedeken, hogy meghatározzuk adott egyedfejlődési stádiumokban mely gének expresszióját befolyásolja a dSAGA specifikus acetiláció. Ehhez két olyan fejlődési állapotot – késői L3 lárva és korai báb állapot – választottunk, ahol a *dAda2b*⁸⁴² deléció által okozott H3K9 és H3K14 acetiláció csökkenése egyértelműen kimutatható volt. Ezekben a stádiumokban összehasonlítva a vad típus és a *dAda2b* mutánsok génexpressziós profilját meghatároztuk, hogy a dADA2b fehérje hiányában mely gének működése tér el a vad típusétól. Mindkét fejlődési állapotban kevés, a gének mintegy 5 %-a mutatott dADA2b-függő génexpresszió-változást. Ezen dADA2b-függő géneknek több mint a fele nem csökkent, hanem emelkedett mértékű expressziót mutatott a dSAGA-specifikus acetiláció hiányában. Ez azért is meglepő, mivel a ySAGA komplex több alegységét is eredetileg transzkripciót aktiváló funkcióval

rendelkező fehérjeként azonosították, valamint az élesztő yGcn5 fehérje hiányában a gének 63 %-ának lecsökkent az expressziója [86] [87]. A mi adatainkhoz hasonlóan más magasabbrendű organizmusok esetében is azt találták, hogy bizonyos transzkripciós koaktivátorok hiányában az általuk szabályozott gének csak egy részének csökkent le a transzkripciója, a másik része viszont megemelkedett expressziót mutatott. Például *Arabidopsis* esetében az *AtGcn5* és *AtAda2b* hiányában mintegy kétszer annyi gén emelkedett expressziót mutatott, mint amennyinek a transzkripciója lecsökkent [88]. Sőt, arra is találtak példát, hogy a HAT-okkal antagonistá hatású, a transzkripció repressziójával kapcsolatba hozott HDAC-ok, mint például az yRPD3 fehérje hiányában több gén mutatott csökkent expressziót, mint amennyinek megemelkedett a transzkripciója [89].

Mindkét fejlődési állapotban hasonló funkcióval rendelkező gének mutattak dADA2b-függő expressziót. A biológiai folyamatoknak megfelelő génontológiai csoportosítás során a csökkent expressziót mutató gének között mindkét stádiumban biokémiai metabolikus folyamatokban szerepet játszó gének mutattak szignifikáns felhalmozódást. Főként a báb állapotban az emelkedett expressziót mutató gének között jelentősen felülreprezentáltak a különböző immunvdekezési folyamatoknak megfelelő génontológiai csoportokba tartozó gének. Ezek az adatok a dADA2b fehérje stresszválaszban betöltött funkciójára utalhatnak, amelyet már más organizmusban is leírtak. Például élesztőben a ySAGA komplexet a környezeti stresszválaszban részt vevő gének egyik fő aktivátoraként írták le [87]. Emellett az *Arabidopsis* AtADA2b fehérjéről kimutatták, hogy szerepet játszik mind a hideg-, mind a sóindukált stresszválaszban résztvevő fehérjék átíródásának a szabályozásában [88] [90].

5.2 A dSAGA komplexre specifikus dADA2b alegység rövid izoformájának szerepe a dSAGA működésében

Előzetes kísérleti adatok azt bizonyították, hogy a *dAda2b* génről kétféle mRNS forma képződik [58]. Ezért megvizsgáltuk, hogy a *dAda2b* mutáció okozta, eltérő irányú génexpressziós változások háttérében állhat-e az, hogy a dADA2b alegység tekintetében kétféle felépítésű dSAGA komplex létezik, amelyek esetleg más-más transzkripciós faktorokkal képesek kölcsönhatást kialakítani, és ezáltal az egyik típus génaktivációs, míg a másik repressziós folyamatokban részt venni.

Először kimutattuk, hogy mindkét dADA2b fehérje izoforma termelődik *Drosophilá*-ban, valamint az intracelluláris eloszlásukat vizsgálva mindkettő sejtmagi lokalizációt mutatott. Expressziójuk vizsgálatakor változó mennyiségben ugyan, de az egyedfejlődés

minden szakaszában jelen volt mindkét izoforma, legnagyobb mennyiségben az embrionális valamint a báb állapot során. Ez összhangban van azzal, hogy a *dAda2b* gén működését megszüntető (*dAda2b*⁸⁴²) mutáció is a báb fejlődésének korai szakaszában okoz letalitást, így feltételezhetjük, hogy a dADA2b fehérjék fontos funkciót töltenek be a metamorfózis folyamatában [72] [73].

Megvizsgáltuk, hogy a *dAda2b* génről termelődő két dADA2b fehérje közül a rövid izoforma önmagában hogyan képes ellátni a teljes dADA2b funkciót. Ennek kapcsán először megállapítottuk, hogy a dADA2bS izoforma túltermeltetése csak részben, az egyedek kb. 50%-ában képes a *dAda2b*⁸⁴² deléción okozta báb állapotban jelentkező letalítás menekítésére. A dSAGA komplex acetilációs aktivitását tekintve a dADA2bS fehérje jelenlétében a vad típushoz képest csökkent H3K9 acetilációs szintet észleltünk, tehát egyedül a rövid dADA2b izoforma jelenlétében a dSAGA komplex csak részleges acetilációs aktivitásra képes. Megvizsgálva a dADA2bS izoforma funkcióját az apoptotikus folyamatok szabályozásában azt tapasztaltuk, hogy a rövid izoforma jelenléte nem állította vissza a vad típusban mért szintre az ionizáló sugárzás miatt apoptózisba lépő sejtek számát. Összességében elmondhatjuk, hogy bár a két dADA2b izoforma csak a C-terminálison régió területén különbözik egymástól, funkcionálisan mégsem ekvivalensek, ugyanis – több funkciót is tesztelve – a harmadik ADA motívumot nem tartalmazó dADA2bS fehérje önmagában nem képes a teljes *dAda2b* funkció ellátására. Elképzelhető, hogy a kétféle izoforma a C-terminálison lévő különbségei miatt eltérő fehérjékkel alakít ki kölcsönhatást, ezáltal más alegység összetételű és funkciójú komplexek felépítésében vehet részt.

A dADA2bS izoforma jelenlétében tapasztalt részleges *dAda2b* funkció háttérében feltételezhetünk egy olyan esetet, amikor is a dADA2bS fehérje jelenlétében létrejövő dSAGA komplex esetleg csak az egyik irányú génexpressziós változások szabályozásában képes részt venni. Ezen feltételezés helytállóságának vizsgálata céljából a dADA2bS izoformát kifejező, egyébként *dAda2b* mutáns lárvákon transzkriptum analízist végeztünk, amely során megállapítottuk, hogy a dADA2bS izoforma mind a csökkent, mind az emelkedett expressziójú dADA2b-függő gének egy részének (20 illetve 40 %) visszaállította az expressziós szintjét. Ezek alapján elmondható, hogy a dADA2bS fehérje jelenlétében létrejövő dSAGA komplex mind az emelkedett, mind a csökkent expressziójú gének szabályozásában részt vesz. Bár a represszió közvetítésében hatékonyabbnak bizonyult a rövid izoforma, itt sem volt képes betölteni a teljes *dAda2b* funkciót. A dADA2b-függő gének több, mint a felének a szabályozásához a rövid izoforma önmagában nem volt elegendő, ezen gének megfelelő átírásához valószínűleg a dADA2bL fehérjére, vagy mindkét izoforma

egyidejű jelenlétére szükség lehet. Elképzelhető, hogy a dSAGA komplex a dADA2b izoformák segítségével valósít meg egy génspecifikus transzkripciós szabályozást, de ez nem olyan formában történik, hogy a rövid izoforma jelenlétében a dSAGA komplex kizárólag aktiváló, vagy represszálo hatást lenne képes kifejteni.

5.3 A dSAGA komplex és az általa létrehozott H3K9 acetiláció szerepe a génexpresszió szabályozásában

A SAGA komplex több szinten is részt vesz a génműködés szabályozásában. Egyrészt elősegíti a transzkripció iniciációját azáltal, hogy különböző aktivátor fehérjékkel alakít ki kölcsönhatást, és így a gén promóterén és 5' régiójában acetilálja az ott elhelyezkedő nukleoszómákat. Másrészt a TBP-vel kölcsönhatva a transzkripciós iniciációs komplex összeszerelődésén keresztül is képes befolyásolni a transzkripció aktivációját. A SAGA komplex mind az acetilációs, mind a deubiquitinációs aktivitása révén fokozza a transzkripció elongációját, valamint segíti az mRNS érésében és exportjában részt vevő fehérjekomplexek összeszerelődését [51]. Az általunk vizsgált dADA2b fehérje a dSAGA komplex hiszton acetilációt létrehozó moduljának az egyik felépítő eleme [91], amelyben meghatározza a dGcn5 fehérje szubsztrát specificitását [72].

Megvizsgáltuk, hogy a dADA2b fehérjék hiányában megfigyelt expressziós változások közül mind a csökkent, mind pedig az emelkedett mértékű génexpresszió is a dADA2b acetilációt befolyásoló hatásához köthető-e. Ehhez w^{1118} és *dAda2b* mutáns lárvákon végzett kromatin immunprecipitációs kísérletekben dSAGA-függő (emelkedett és csökkent expresszió), illetve dSAGA-független transzkripciót mutató géneken is meghatároztuk a H3K9 acetiláció szintjét, valamint a dADA2b fehérje jelenlétét.

A dADA2b fehérje kötődése alapján több dSAGA-függő expressziót mutató gént (*sug*, *cnc*, *CycB*, *Hus1*) is direkt dSAGA célgénként tudtunk azonosítani. Mind a csökkent, mind az emelkedett expressziót mutató gének esetében is sikerült dADA2b kötődést kimutatnunk, tehát mindkét irányú expressziós változás háttérében a dSAGA komplex közvetlen működése állhat. A dADA2b fehérje jelenléte nemcsak a gének promóterhez közeli részén, hanem a 3' végi régiójában is kimutatható volt. Ez az adat azért meglepő, mivel korábbi *Saccharomyces cerevisiae*-ben végzett genom szintű vizsgálatok a yGcn5 fehérje jelenlétét és az általa létrehozott acetilációt a transzkripciósan aktív gének promóter és 5' végi régiójához kötötték [80] [92]. Újabb adatok szerint *Schizosaccharomyces pombe* yGcn5 fehérjéje erősen expresszálo gének esetében nem csak a promóterhez közeli, hanem a teljes átírt régióhoz is

kapcsolódik [93]. Emellett *Drosophila* embrionális izomsejteken a közelmúltban elvégzett vizsgálat során is több gén 3' végi régiójában is kimutatható volt a dADA2b fehérje jelenléte [94]. Az általunk elvégzett kromatin immunprecipitációban a SAGA-független expressziót mutató *RpS23* és *RpL32* gének transzkripciós kezdőpontjához közeli régióiban is kimutatható volt a dADA2b fehérje. Ezekhez az eredményhez hasonlóan az *S. pombe* esetében a yGcn5 fehérjétől független transzkripciót mutató gének átíródo régiójához is kapcsolódott a yGcn5, míg a yGcn5-függő gének esetében az átíródo régió mellett a transzkripciós kezdőpont előtti szabályozó szakaszokon is megjelent a yGcn5 fehérje. Ezt a megfigyelést a yGcn5 fehérje transzkripció elongációban betöltött szerepével hozzák összefüggésbe, mégpedig hogy a yGcn5 fehérje számos, erősen kifejeződő gén elongációját is szabályozza, viszont ez a funkciója redundáns, ezért a yGcn5 hiányában ezen gének expressziója nem mutat jelentős változást. yGcn5-függő transzkripciót mutató gének esetében nem csak az elongációban, hanem a transzkripció iniciációjában is jelentős és esszenciális funkciót tölt be a yGcn5 fehérje [93]. Mindemellett *Drosophila* embrionális sejtekben a dSAGA komplex főként a gének promóterhez közeli régiójához kötődött, viszont számos esetben az átíródo régió egészén is kimutatható volt. Ebben az esetben a dSAGA az RNS polimeráz II-höz teljesen hasonló kötődési mintázatot mutatott, mely ugyancsak a komplex elongációban való részvételére utalhat [94]. Ehhez hasonlóan az általunk kimutatott dADA2b kötődési mintázat háttérben is állhat az, hogy a dSAGA komplex nem csak a transzkripció iniciációs, hanem elongációs lépését is szabályozhatja. Az, hogy ezekhez a folyamatokhoz a komplex acetilációs, illetve a deubiquitinációs aktivitása milyen mértékben járul hozzá, még kevésbé tisztázott.

Megvizsgálva a dSAGA-függő expressziót mutató gének H3K9 acetilációs szintjét azt tapasztaltuk, hogy mind a csökkent (*sug*, *cnc*, *CycB*), mind az emelkedett (*Fst*, *Hus1*, *AttD*) expressziójú gének területén megjelent a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció. Élesztő és *Drosophila* sejtekből származó adatokhoz hasonlóan – miszerint a dSAGA specifikus H3 acetiláció a gének promóter és 5' végi régiójában dúsul fel [94] [95] – az általunk vizsgált dSAGA specifikus H3K9 acetiláció is a vizsgált gének promóterhez közeli régióján jelent meg magasabb szinten. A dSAGA-független (*RpS23*, *RpL32*), erősen expresszálódó géneken jelen lévő nagymértékű H3K9 acetiláció a dADA2b fehérje jelenlététől függetlenül is fennmaradt. Megállapíthatjuk, hogy a promóterhez közeli régióban a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció jelenléte számos gén szabályozása során esszenciális, viszont a transzkripció folyamata során nem csak aktiváló, hanem represszáló hatás kialakításához is hozzájárulhat.

5.4 A dSAGA specifikus H3K9 acetiláció szerepe a génaktiváció folyamatában

A fenti kísérletekkel azonosítottuk azokat a géneket, amelyek kifejeződését a két vizsgált fejlődési állapotban befolyásolja a dSAGA specifikus hiszton acetiláció. Hogy megtudjuk, ez az acetiláció hogyan járul hozzá a génaktiváció folyamatához, feltérképeztük a génműködés során a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció szintjét, valamint annak az adott gén transzkripciójára kifejtett hatását is. A nyálmirigy óriáskromoszómákon elvégzett immunfestés során megállapítottuk, hogy a dSAGA specifikus hiszton acetiláció nem kizárólagos előfeltétele a transzkripció iniciációjának, ugyanis az átírást végző RNS polimeráz csökkent H3K9 acetiláció mellett is képes az aktiválódó hősokk génekhez kötődni. Az acetiláció szerepének részletesebb tanulmányozásához az ekdizon hormon által indukált *Eip74EF* és *Eip75B* korai gének vizsgálatát választottuk eszköznünk. Először feltérképeztük ezen gének aktivációs profiljait, majd az ezek alapján kiválasztott indukció előtti és két indukció alatti időpontban kromatin immunprecipitációs kísérlettel meghatároztuk, hogy hogyan alakul a H3K9 acetiláció mennyisége a gének promóter, promóterhez közeli intronikus, valamint 3' véghez közeli exonikus régiókban. Mindkét gén szerkezete erősen összetett, több alternatív promóter régióról több transzkriptum variáns képződik. Ezek közül az *Eip74EF* esetében két (RA és RB), az *Eip75B* esetében pedig egy (RC) transzkriptum képződését és átírásának szabályozását vizsgáltuk. Az említett három transzkriptum eltérő expressziós mintázatot mutatott: más ekdizon koncentrációnál aktiválódtak, valamint expressziójuk szintje is jelentősen eltért. Az elvégzett ChIP kísérlet eredménye azt sugallja, hogy a H3K9 acetiláció a vizsgált régióban egy általánosan jelen lévő hiszton módosítás, ami nem mutat kifejezett régió specificitást. A génaktiváció folyamatával kapcsolatban sem tapasztaltunk olyan jellegű összefüggést, hogy csak az adott transzkriptum expressziója idején jelenne meg ez a módosítás. Egyedül az adott promóterek működésének megfelelően a promóterekhez közeli régiókban mutatott enyhe emelkedést a H3K9 acetiláció mennyisége. Emellett az általunk vizsgált géneken az acetiláció mennyisége arányos volt a transzkripció mértékével, az erőteljesebben expresszáldó gének promóterén magasabb H3K9 acetilációs szint volt megfigyelhető.

Megvizsgáltuk, hogy az *Eip74EF* és *Eip75B* gének aktivációja során detektált H3K9 acetilációhoz milyen mértékben járul hozzá a dSAGA komplex működése. A *dAda2b* mutáns vándorló L3 stádiumú lárvákon (wL3) elvégzett kromatin immunprecipitációs kísérletekből látható, hogy a *dADA2b* hiányában a H3K9 acetiláció szintje az általunk vizsgált összes génszakaszon és intergenikus régióban lecsökkent. Tehát a dSAGA komplex az *Eip74EF* és

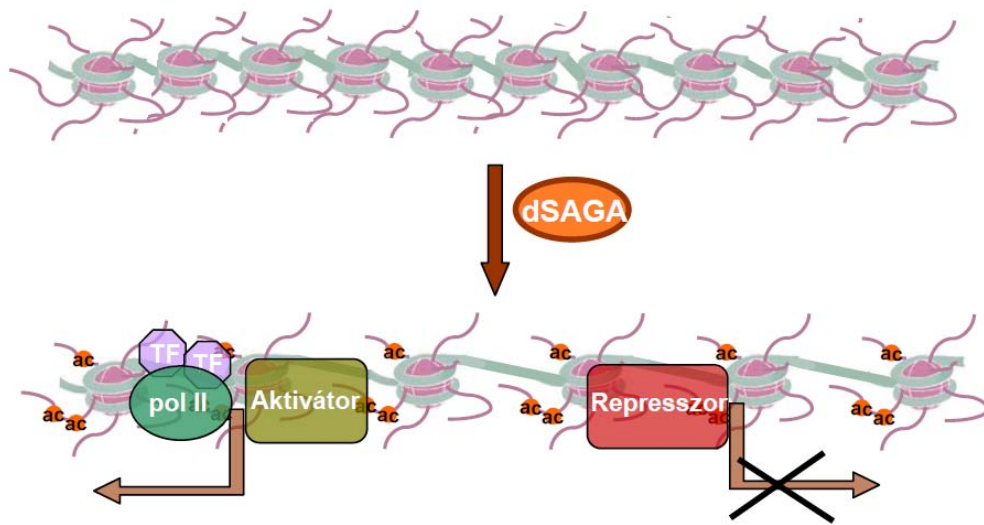
Eip75B gének esetében nemcsak a promótereken előforduló, hanem egy általánosan jelen lévő H3K9 acetilációs mintázat létrehozásáért felelős. Már az élesztő yGcn5 fehérjéről is leírtak egy ehhez hasonló, nagyobb kiterjedésű, kódoló és intergenikus területeket egyaránt érintő általános acetilációs aktivitást [31].

Az élesztő yGcn5 fehérje koaktivátor funkciója mellett az általa létrehozott általános acetilációs mintázat is hozzájárul a transzkripció szabályozásához [32]. Ebből kiindulva megvizsgáltuk, hogyan alakul az *Eip74EF* és *Eip75B* gének aktivációja a dADA2b fehérje hiányában. Az elvégzett Q-RT-PCR kísérletben azt tapasztaltuk, hogy a kisebb mértékben aktiválódó *Eip74EF-RB* és *Eip75B-RC* promóterek indukciója a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció hiányában csak kevésbé sérül, míg az erőteljes indukciót mutató *Eip74EF-RA* promóter aktivációja elmarad. Tehát az *Eip74EF* és *Eip75B* gének területén általánosan jelen lévő dSAGA specifikus H3K9 acetilációs mintázat fontos szabályozó szereppel bír ezen gének aktivációjának szabályozásában. Ezek az adatok is alátámasztják azt a tényt, hogy nem csak az irányított, a különböző szabályozó szekvenciákon megjelenő acetiláció, hanem az eukromatikus régiókban általánosan jelen lévő acetilációs mintázat is fontos szerepet tölt be a génexpresszió szabályozásában [96]. Ez az általános alapacetilációs mintázat a génműködés megfelelő kinetikájához is hozzájárulhat, például élesztő *rpd3* és *hda1* HDAC-okat érintő mutációk hatására a megemelkedett alapacetilációs mintázatnál a *PHO5* gén repressziója jelentős késéssel következik csak be. Feltételezhetően ennek az az oka, hogy az általános acetilációs mintázatot beállító HDAC-ok működésének részleges kiesése miatt több időre van szükség ahhoz, hogy a génaktivációt kísérő magasabb acetilációs szint visszatérjen az alapállapothoz [31]. Mivel ezt az általános alapacetilációs szintet az ellentétes aktivitású HAT és HDAC enzimek tartják fent, elképzelhető egy olyan mechanizmus, miszerint a HAT-ok működésének kiesése kapcsán létrejövő csökkent alapacetiláció mellett több időre van szükség ahhoz, hogy az adott gén elérje az aktivációhoz szükséges acetilációs szintet, és ezáltal sérül a génaktiváció kinetikája.

5.5 A dSAGA specifikus hiszton acetiláció feltételezett funkciója a génműködés szabályozásában

A dolgozatomban leírt eredmények összefoglalásául megállapíthatjuk, hogy a dSAGA HAT komplex rendkívül összetett módon járulhat hozzá a génműködés szabályozásához. Egyrészt különböző transzkripciót szabályozó fehérjékkel közvetlenül kölcsönhatva szerepet játszhat egy irányított, helyspecifikusan megjelenő acetiláció létrehozásában, amely

befolyásolhatja a transzkripció iniciációját és elongációját is [94]. Emellett a dSAGA részt vesz egy általánosan megjelenő acetilációs alapmintázat fenntartásában is [31]. *Drosophila* lárvák nyálmirigy óriáskromoszómáinak immunfestésén is megfigyelhettük ezt a teljes kromoszómán általánosan megjelenő dSAGA specifikus H3K9 acetilációt [72]. Ez a kétféle acetiláció nem egymástól függetlenül jelentkezik, hanem a HAT és HDAC komplexek koordinált működése következtében egy dinamikusan változó acetilációs háttéren jelenhet meg egy irányított, helyspecifikus acetiláció. Ez az általános acetiláció hozzájárulhat egy olyan kromatinszerkezet kialakításához, amely lehetőséget biztosít a különböző szabályozó fehérjék – aktivátorok és represszorok – szekvencia-specifikus kötődésére [96]. Az elvégzett kromatin immunprecipitációs kísérletben láthattuk, hogy a dSAGA elégtelen működése következtében sérült az eukromatikus részek általános H3K9 acetilációs mintázata. Elképzelhető, hogy ennél az alacsonyabb acetiláltságú kromatinszerkezethöz gyengül a szabályozó fehérjék kromatinhoz való kötődési képessége, és ezáltal – attól függően, hogy aktivátor vagy represszor hatású fehérjéről van szó – módosul az általuk szabályozott gének működése. Részben ez magyarázhatja, hogy a dSAGA specifikus acetiláció hiányában nem csak csökkent, hanem emelkedett expressziójú géneket is azonosítottunk (37. ábra). Ezenfelül ez az általánosan megjelenő, dinamikusan változó acetilációs mintázat hozzájárulhat a génszabályozás megfelelő kinetikájához [96]. Az általunk használt *in vivo* modell géneken (*Eip74EF* és *Eip75B*) bizonyítottuk, hogy a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció hiányában sérül a génaktiváció folyamata. Ezt a megfigyelést támasztja alá az a – munkacsoportunk által elvégzett – kísérlet is, amelyben látható, hogy a *Drosophila* egyedfejlődés több állapotában a *dAda2b* mutáció hatására számos gén esetében az aktivációs (*Eig71Ec*, *Eig71Ed*, *Eig71Eg*, *Eig71Eh*) és a repressziós (*Lcp1*, *Lcp4*) folyamatok kinetikája is sérül [85]. Tehát elképzelhető, hogy a dSAGA specifikus általános H3K9 acetilációs mintázat hiányában bizonyos gének aktivációja nem a megfelelő időben történik meg, és ezáltal teljesen felborulhat a sejtre jellemző koordinált génexpressziós mintázat. Tehát a dSAGA komplex acetilációs aktivitása közvetett módon, egy transzkripciót megengedő kromatinszerkezet fenntartásán keresztül is hozzájárul a génműködés szabályozásához (37. ábra).



37. ábra: A modell a dSAGA specifikus acetilációs alapmintázat – egy transzkripciót megengedő kromatinszerkezet fenntartásán keresztül – a génműködés szabályozására kifejtett hatását mutatja be

6. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Boros Imrének a munkámban, szakmai előmenetelemben való lelkiismeretes irányításáért, és a lehetőségért, hogy laboratóriumában betekintést nyerhettem a tudományos kutatómunka világába.

Hálás köszönettel tartozom Dr. Bodai Lászlónak, hogy rendkívüli türelemmel és kitartással precíz és önálló kutatómunkára tanított, valamint hogy bármikor fordulhattam hozzá kérdéseimmel és számíthattam támogatására.

Szeretném megköszönni Dr. Komonyi Orbánnak és Dr. Pankotai Tibornak, hogy megtanították a genetika és a molekuláris biológia gyakorlati alkalmazását, valamint a kísérletek elvégzése során nyújtott segítségüket.

Köszönettel tartozom a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék összes jelenlegi és volt munkatársának, hogy szakmai és személyes támogatásukkal segítették munkámat. Külön köszönöm Gáspár Renátának, Kristó Ildikónak, Csebella-Bakota Adriennek és Pataki Edinának a kísérletekben nyújtott segítségüket és barátságukat.

Végül köszönöm Matusek Norbertnek és családom minden tagjának a biztatást és a támogatást.

7. Irodalomjegyzék

1. Kornberg RD: **Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA.** *Science* 1974, **184**(4139):868-871.
2. Peterson CL, Laniel MA: **Histones and histone modifications.** *Curr Biol* 2004, **14**(14):R546-551.
3. Cockerill PN: **Structure and function of active chromatin and DNase I hypersensitive sites.** *FEBS J*, **278**(13):2182-2210.
4. W. H. Freeman Pierce B: **Genetics: A Conceptual Approach**, 2nd edn: New York: W. H. Freeman and Company; 2005.
5. Richmond TJ, Finch JT, Rushton B, Rhodes D, Klug A: **Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution.** *Nature* 1984, **311**(5986):532-537.
6. Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ: **Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution.** *Nature* 1997, **389**(6648):251-260.
7. Turner BM: **Chromatin and Gene Regulation:** Blackwell Science Ltd 2001.
8. Zheng C, Hayes JJ: **Structures and interactions of the core histone tail domains.** *Biopolymers* 2003, **68**(4):539-546.
9. Xiao T, Kao CF, Krogan NJ, Sun ZW, Greenblatt JF, Osley MA, Strahl BD: **Histone H2B ubiquitylation is associated with elongating RNA polymerase II.** *Mol Cell Biol* 2005, **25**(2):637-651.
10. Kouzarides T: **Snapshot: Histone-modifying enzymes.** *Cell* 2007, **131**(4):822.
11. Kouzarides T: **Chromatin modifications and their function.** *Cell* 2007, **128**(4):693-705.
12. Mutskov V, Gerber D, Angelov D, Ausio J, Workman J, Dimitrov S: **Persistent interactions of core histone tails with nucleosomal DNA following acetylation and transcription factor binding.** *Mol Cell Biol* 1998, **18**(11):6293-6304.
13. Shahbazian MD, Grunstein M: **Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation.** *Annu Rev Biochem* 2007, **76**:75-100.
14. Henikoff S: **Histone modifications: combinatorial complexity or cumulative simplicity?** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(15):5308-5309.
15. Jacobson RH, Ladurner AG, King DS, Tjian R: **Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module.** *Science* 2000, **288**(5470):1422-1425.
16. Lo WS, Trievel RC, Rojas JR, Duggan L, Hsu JY, Allis CD, Marmorstein R, Berger SL: **Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14.** *Mol Cell* 2000, **5**(6):917-926.
17. Daujat S, Bauer UM, Shah V, Turner B, Berger S, Kouzarides T: **Crosstalk between CARM1 methylation and CBP acetylation on histone H3.** *Curr Biol* 2002, **12**(24):2090-2097.
18. Dover J, Schneider J, Tawiah-Boateng MA, Wood A, Dean K, Johnston M, Shilatifard A: **Methylation of histone H3 by COMPASS requires ubiquitination of histone H2B by Rad6.** *J Biol Chem* 2002, **277**(32):28368-28371.
19. Strahl BD, Allis CD: **The language of covalent histone modifications.** *Nature* 2000, **403**(6765):41-45.
20. Jenuwein T, Allis CD: **Translating the histone code.** *Science* 2001, **293**(5532):1074-1080.
21. Kouzarides T BS: **Epigenetics:** CSHL Press; 2006.
22. Nowak SJ, Corces VG: **Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation.** *Trends Genet* 2004, **20**(4):214-220.

23. Jasencakova Z, Groth A: **Restoring chromatin after replication: how new and old histone marks come together.** *Semin Cell Dev Biol*, **21**(2):231-237.
24. Xu F, Zhang K, Grunstein M: **Acetylation in histone H3 globular domain regulates gene expression in yeast.** *Cell* 2005, **121**(3):375-385.
25. Hassan AH, Prochasson P, Neely KE, Galasinski SC, Chandy M, Carrozza MJ, Workman JL: **Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes.** *Cell* 2002, **111**(3):369-379.
26. de la Cruz X, Lois S, Sanchez-Molina S, Martinez-Balbas MA: **Do protein motifs read the histone code?** *Bioessays* 2005, **27**(2):164-175.
27. Grune T, Brzeski J, Eberharter A, Clapier CR, Corona DF, Becker PB, Muller CW: **Crystal structure and functional analysis of a nucleosome recognition module of the remodeling factor ISWI.** *Mol Cell* 2003, **12**(2):449-460.
28. Brownell JE, Zhou J, Ranalli T, Kobayashi R, Edmondson DG, Roth SY, Allis CD: **Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation.** *Cell* 1996, **84**(6):843-851.
29. Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL: **A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p.** *Science* 1996, **272**(5260):408-411.
30. Roth SY, Denu JM, Allis CD: **Histone acetyltransferases.** *Annu Rev Biochem* 2001, **70**:81-120.
31. Vogelauer M, Wu J, Suka N, Grunstein M: **Global histone acetylation and deacetylation in yeast.** *Nature* 2000, **408**(6811):495-498.
32. Imoberdorf RM, Topalidou I, Strubin M: **A role for gen5-mediated global histone acetylation in transcriptional regulation.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**(5):1610-1616.
33. Gregory PD, Schmid A, Zavari M, Munsterkottter M, Horz W: **Chromatin remodelling at the PHO8 promoter requires SWI-SNF and SAGA at a step subsequent to activator binding.** *EMBO J* 1999, **18**(22):6407-6414.
34. Nourani A, Utley RT, Allard S, Cote J: **Recruitment of the NuA4 complex poises the PHO5 promoter for chromatin remodeling and activation.** *EMBO J* 2004, **23**(13):2597-2607.
35. Wang A, Kurdistani SK, Grunstein M: **Requirement of Hos2 histone deacetylase for gene activity in yeast.** *Science* 2002, **298**(5597):1412-1414.
36. De Nadal E, Zapater M, Alepuz PM, Sumoy L, Mas G, Posas F: **The MAPK Hog1 recruits Rpd3 histone deacetylase to activate osmoresponsive genes.** *Nature* 2004, **427**(6972):370-374.
37. Grant PA, Berger SL: **Histone acetyltransferase complexes.** *Semin Cell Dev Biol* 1999, **10**(2):169-177.
38. Lee KK, Workman JL: **Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, **8**(4):284-295.
39. Carrozza MJ, Utley RT, Workman JL, Cote J: **The diverse functions of histone acetyltransferase complexes.** *Trends Genet* 2003, **19**(6):321-329.
40. Dyda F, Klein DC, Hickman AB: **GCN5-related N-acetyltransferases: a structural overview.** *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2000, **29**:81-103.
41. Marmorstein R, Trievel RC: **Histone modifying enzymes: structures, mechanisms, and specificities.** *Biochim Biophys Acta* 2009, **1789**(1):58-68.
42. Smith ER, Belote JM, Schiltz RL, Yang XJ, Moore PA, Berger SL, Nakatani Y, Allis CD: **Cloning of Drosophila GCN5: conserved features among metazoan GCN5 family members.** *Nucleic Acids Res* 1998, **26**(12):2948-2954.
43. Candau R, Berger SL: **Structural and functional analysis of yeast putative adaptors. Evidence for an adaptor complex in vivo.** *J Biol Chem* 1996, **271**(9):5237-5245.

44. Carre C, Szymczak D, Pidoux J, Antoniewski C: **The histone H3 acetylase dGcn5 is a key player in Drosophila melanogaster metamorphosis.** *Mol Cell Biol* 2005, **25**(18):8228-8238.
45. Grant PA, Duggan L, Cote J, Roberts SM, Brownell JE, Candau R, Ohba R, Owen-Hughes T, Allis CD, Winston F *et al*: **Yeast Gen5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex.** *Genes Dev* 1997, **11**(13):1640-1650.
46. Grant PA, Eberharter A, John S, Cook RG, Turner BM, Workman JL: **Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes.** *J Biol Chem* 1999, **274**(9):5895-5900.
47. Balasubramanian R, Pray-Grant MG, Selleck W, Grant PA, Tan S: **Role of the Ada2 and Ada3 transcriptional coactivators in histone acetylation.** *J Biol Chem* 2002, **277**(10):7989-7995.
48. Lee KK, Sardu ME, Swanson SK, Gilmore JM, Torok M, Grant PA, Florens L, Workman JL, Washburn MP: **Combinatorial depletion analysis to assemble the network architecture of the SAGA and ADA chromatin remodeling complexes.** *Mol Syst Biol*, **7**:503.
49. Daniel JA, Grant PA: **Multi-tasking on chromatin with the SAGA coactivator complexes.** *Mutat Res* 2007, **618**(1-2):135-148.
50. Baker SP, Grant PA: **The SAGA continues: expanding the cellular role of a transcriptional co-activator complex.** *Oncogene* 2007, **26**(37):5329-5340.
51. Koutelou E, Hirsch CL, Dent SY: **Multiple faces of the SAGA complex.** *Curr Opin Cell Biol*, **22**(3):374-382.
52. Friedrich B, Quensel C, Sommer T, Hartmann E, Kohler M: **Nuclear localization signal and protein context both mediate importin alpha specificity of nuclear import substrates.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**(23):8697-8709.
53. Kohler A, Schneider M, Cabal GG, Nehrbass U, Hurt E: **Yeast Ataxin-7 links histone deubiquitination with gene gating and mRNA export.** *Nat Cell Biol* 2008, **10**(6):707-715.
54. Candau R, Moore PA, Wang L, Barlev N, Ying CY, Rosen CA, Berger SL: **Identification of human proteins functionally conserved with the yeast putative adaptors ADA2 and GCN5.** *Mol Cell Biol* 1996, **16**(2):593-602.
55. Barlev NA, Candau R, Wang L, Darpino P, Silverman N, Berger SL: **Characterization of physical interactions of the putative transcriptional adaptor, ADA2, with acidic activation domains and TATA-binding protein.** *J Biol Chem* 1995, **270**(33):19337-19344.
56. Sterner DE, Wang X, Bloom MH, Simon GM, Berger SL: **The SANT domain of Ada2 is required for normal acetylation of histones by the yeast SAGA complex.** *J Biol Chem* 2002, **277**(10):8178-8186.
57. Gangloff YG, Romier C, Thuault S, Werten S, Davidson I: **The histone fold is a key structural motif of transcription factor TFIID.** *Trends Biochem Sci* 2001, **26**(4):250-257.
58. Muratoglu S, Georgieva S, Papai G, Scheer E, Enunlu I, Komonyi O, Cserpan I, Lebedeva L, Nabirochkina E, Udvardy A *et al*: **Two different Drosophila ADA2 homologues are present in distinct GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes.** *Mol Cell Biol* 2003, **23**(1):306-321.
59. Kusch T, Guelman S, Abmayr SM, Workman JL: **Two Drosophila Ada2 homologues function in different multiprotein complexes.** *Mol Cell Biol* 2003, **23**(9):3305-3319.

60. Stockinger EJ, Mao Y, Regier MK, Triezenberg SJ, Thomashow MF: **Transcriptional adaptor and histone acetyltransferase proteins in Arabidopsis and their interactions with CBF1, a transcriptional activator involved in cold-regulated gene expression.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**(7):1524-1533.
61. Guelman S, Suganuma T, Florens L, Swanson SK, Kiesecker CL, Kusch T, Anderson S, Yates JR, 3rd, Washburn MP, Abmayr SM *et al*: **Host cell factor and an uncharacterized SANT domain protein are stable components of ATAC, a novel dAda2A/dGcn5-containing histone acetyltransferase complex in Drosophila.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**(3):871-882.
62. Suganuma T, Gutierrez JL, Li B, Florens L, Swanson SK, Washburn MP, Abmayr SM, Workman JL: **ATAC is a double histone acetyltransferase complex that stimulates nucleosome sliding.** *Nat Struct Mol Biol* 2008, **15**(4):364-372.
63. Nagy Z, Riss A, Fujiyama S, Krebs A, Orpinell M, Jansen P, Cohen A, Stunnenberg HG, Kato S, Tora L: **The metazoan ATAC and SAGA coactivator HAT complexes regulate different sets of inducible target genes.** *Cell Mol Life Sci*, **67**(4):611-628.
64. Guelman S, Suganuma T, Florens L, Weake V, Swanson SK, Washburn MP, Abmayr SM, Workman JL: **The essential gene wda encodes a WD40 repeat subunit of Drosophila SAGA required for histone H3 acetylation.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**(19):7178-7189.
65. Weake VM, Swanson SK, Mushegian A, Florens L, Washburn MP, Abmayr SM, Workman JL: **A novel histone fold domain-containing protein that replaces TAF6 in Drosophila SAGA is required for SAGA-dependent gene expression.** *Genes Dev* 2009, **23**(24):2818-2823.
66. Myster SH, Wang F, Cavallo R, Christian W, Bhotika S, Anderson CT, Peifer M: **Genetic and bioinformatic analysis of 41C and the 2R heterochromatin of Drosophila melanogaster: a window on the heterochromatin-euchromatin junction.** *Genetics* 2004, **166**(2):807-822.
67. Kurshakova MM, Krasnov AN, Kopytova DV, Shidlovskii YV, Nikolenko JV, Nabirochkina EN, Spehner D, Schultz P, Tora L, Georgieva SG: **SAGA and a novel Drosophila export complex anchor efficient transcription and mRNA export to NPC.** *EMBO J* 2007, **26**(24):4956-4965.
68. Weake VM, Lee KK, Guelman S, Lin CH, Seidel C, Abmayr SM, Workman JL: **SAGA-mediated H2B deubiquitination controls the development of neuronal connectivity in the Drosophila visual system.** *EMBO J* 2008, **27**(2):394-405.
69. Spedale G, Timmers HT, Pijnappel WW: **ATAC-king the complexity of SAGA during evolution.** *Genes Dev*, **26**(6):527-541.
70. Ciurciu A, Komonyi O, Pankotai T, Boros IM: **The Drosophila histone acetyltransferase Gcn5 and transcriptional adaptor Ada2a are involved in nucleosomal histone H4 acetylation.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**(24):9413-9423.
71. Grau B, Popescu C, Torroja L, Ortuno-Sahagun D, Boros I, Ferrus A: **Transcriptional adaptor ADA3 of Drosophila melanogaster is required for histone modification, position effect variegation, and transcription.** *Mol Cell Biol* 2008, **28**(1):376-385.
72. Pankotai T, Komonyi O, Bodai L, Ujfaludi Z, Muratoglu S, Ciurciu A, Tora L, Szabad J, Boros I: **The homologous Drosophila transcriptional adaptors ADA2a and ADA2b are both required for normal development but have different functions.** *Mol Cell Biol* 2005, **25**(18):8215-8227.
73. Qi D, Larsson J, Mannervik M: **Drosophila Ada2b is required for viability and normal histone H3 acetylation.** *Mol Cell Biol* 2004, **24**(18):8080-8089.

74. Gamper AM, Kim J, Roeder RG: **The STAGA subunit ADA2b is an important regulator of human GCN5 catalysis.** *Mol Cell Biol* 2009, **29**(1):266-280.
75. Aravind L, Iyer LM: **The SWIRM domain: a conserved module found in chromosomal proteins points to novel chromatin-modifying activities.** *Genome Biol* 2002, **3**(8):RESEARCH0039.
76. Da G, Lenkart J, Zhao K, Shiekhattar R, Cairns BR, Marmorstein R: **Structure and function of the SWIRM domain, a conserved protein module found in chromatin regulatory complexes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(7):2057-2062.
77. Eden E, Navon R, Steinfeld I, Lipson D, Yakhini Z: **GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists.** *BMC Bioinformatics* 2009, **10**:48.
78. Hebbes TR, Clayton AL, Thorne AW, Crane-Robinson C: **Core histone hyperacetylation co-maps with generalized DNase I sensitivity in the chicken beta-globin chromosomal domain.** *EMBO J* 1994, **13**(8):1823-1830.
79. Braunstein M, Rose AB, Holmes SG, Allis CD, Broach JR: **Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation.** *Genes Dev* 1993, **7**(4):592-604.
80. Pokholok DK, Harbison CT, Levine S, Cole M, Hannett NM, Lee TI, Bell GW, Walker K, Rolfe PA, Herbolsheimer E *et al*: **Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast.** *Cell* 2005, **122**(4):517-527.
81. Yan C, Boyd DD: **Histone H3 acetylation and H3 K4 methylation define distinct chromatin regions permissive for transgene expression.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**(17):6357-6371.
82. Wang T, Kobayashi T, Takimoto R, Denes AE, Snyder EL, el-Deiry WS, Brachmann RK: **hADA3 is required for p53 activity.** *EMBO J* 2001, **20**(22):6404-6413.
83. Ollmann M, Young LM, Di Como CJ, Karim F, Belvin M, Robertson S, Whittaker K, Demsky M, Fisher WW, Buchman A *et al*: **Drosophila p53 is a structural and functional homolog of the tumor suppressor p53.** *Cell* 2000, **101**(1):91-101.
84. Goto SG: **A novel gene that is up-regulated during recovery from cold shock in Drosophila melanogaster.** *Gene* 2001, **270**(1-2):259-264.
85. Zsindely N, Pankotai T, Ujfaludi Z, Lakatos D, Komonyi O, Bodai L, Tora L, Boros IM: **The loss of histone H3 lysine 9 acetylation due to dSAGA-specific dAda2b mutation influences the expression of only a small subset of genes.** *Nucleic Acids Res* 2009, **37**(20):6665-6680.
86. Silverman N, Agapite J, Guarente L: **Yeast ADA2 protein binds to the VP16 protein activation domain and activates transcription.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**(24):11665-11668.
87. Huisinga KL, Pugh BF: **A genome-wide housekeeping role for TFIID and a highly regulated stress-related role for SAGA in Saccharomyces cerevisiae.** *Mol Cell* 2004, **13**(4):573-585.
88. Vlachonasios KE, Thomashow MF, Triezenberg SJ: **Disruption mutations of ADA2b and GCN5 transcriptional adaptor genes dramatically affect Arabidopsis growth, development, and gene expression.** *Plant Cell* 2003, **15**(3):626-638.
89. Bernstein BE, Tong JK, Schreiber SL: **Genomewide studies of histone deacetylase function in yeast.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**(25):13708-13713.
90. Kaldis A, Tsementzi D, Tanriverdi O, Vlachonasios KE: **Arabidopsis thaliana transcriptional co-activators ADA2b and SGF29a are implicated in salt stress responses.** *Planta*, **233**(4):749-762.

91. Nagy Z, Tora L: **Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation.** *Oncogene* 2007, **26**(37):5341-5357.
92. Robert F, Pokholok DK, Hannett NM, Rinaldi NJ, Chandy M, Rolfe A, Workman JL, Gifford DK, Young RA: **Global position and recruitment of HATs and HDACs in the yeast genome.** *Mol Cell* 2004, **16**(2):199-209.
93. Johnsson AE, Wright AP: **The role of specific HAT-HDAC interactions in transcriptional elongation.** *Cell Cycle*, **9**(3):467-471.
94. Weake VM, Dyer JO, Seidel C, Box A, Swanson SK, Peak A, Florens L, Washburn MP, Abmayr SM, Workman JL: **Post-transcription initiation function of the ubiquitous SAGA complex in tissue-specific gene activation.** *Genes Dev*, **25**(14):1499-1509.
95. Roh TY, Ngau WC, Cui K, Landsman D, Zhao K: **High-resolution genome-wide mapping of histone modifications.** *Nat Biotechnol* 2004, **22**(8):1013-1016.
96. Kurdistani SK, Grunstein M: **Histone acetylation and deacetylation in yeast.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, **4**(4):276-284.

8. A doktori értekezés összefoglalója

Az eukarióta sejtek működéséhez nélkülözhetetlen a genom nagymértékű, ugyanakkor dinamikus összetömörítése. Ezt a különböző fehérje faktorok közreműködésével létrejövő kromatinszerkezet biztosítja, amely alapegységeit a hiszton (H2A, H2B, H3, H4) fehérjékre feltekeredő 147 bázispárnyi DNS-ből felépülő nukleoszómak alkotják. A tömörödés különböző szintjei eltérő mértékű hozzáférhetést biztosítanak a DNS szálon lezajló folyamatokat (transzkripció, DNS replikáció és hibajavítás) végző faktorok számára. Így a kromatinszerkezet tömörsége, illetve annak dinamikus átalakítását végző mechanizmusok fontos szabályozó szerepet töltenek be a transzkripció folyamata során. A kromatinszerkezet dinamikus átalakításáért felelős mechanizmusok egyike a nukleoszómalis hiszton fehérjéken megjelenő poszttranszlációs módosítások. Az egyik, intenzíven tanulmányozott ilyen módosítás a hiszton fehérjék acetilációja. A nukleoszómak hiperacetilált állapota egy nyitottabb, míg a hipoacetilált nukleoszómak egy tömörebb kromatinszerkezettel hozhatók összefüggésbe. Számos megfigyelés alapján az aktív transzkripció folyamatához egy hiperacetilált, nyitott kromatin szerkezet köthető, viszont az acetiláció szabályozó szerepének pontos részletei még kevésbé ismertek. Ezek felderítéséhez nagymértékben hozzájárulnak a hiszton acetiltranszferáz (HAT) enzimek vizsgálata során nyert információk. Az egyik legjobban jellemzett HAT aktivitású fehérje a Gcn5, amely több alegységes fehérje komplex tagjaként látja el acetilációs funkcióját. A Gcn5-tartalmú HAT komplexek ADA-típusú adaptor fehérjéket is tartalmaznak, amelyek a Gcn5 fehérje aktivitásának és specificitásának meghatározásában játszanak szerepet. A *Drosophila melanogaster*-ben előforduló egyik Gcn5-tartalmú HAT komplex, a dSAGA acetilációs moduljának egyik alegysége a dADA2b fehérje, amely szükséges a komplex H3 hiszton 9-es és 14-es lizinjére specifikus acetilációs aktivitásához. Az ADA2 fehérjék sokszínű funkciójára utal, hogy a *Drosophila Ada2b* génről több mRNS és fehérje izoforma termelődik. A két dADA2b fehérje izoforma N-terminális régiója azonos, mindkettő tartalmaz egy-egy, az ADA2 fehérjékre jellemző ZZ cink-ujj és SANT domént, viszont a C-terminális régió eltérő. Itt, az ADA2 fehérjékre specifikus ADA motívumból a rövidebb izoformában (dADA2bS) csak kettő, míg a hosszabb izoformában (dADA2bL) három darab található meg. Mivel ezeknek az ADA motívumoknak feltételezhetően az ADA2 fehérjék más komplex alegységekkel kialakított kölcsönhatásaik létrejöttében fontos szerepe lehet, az eltérő számú ADA motívumot tartalmazó dADA2b izoformák más folyamatok szabályozásában betöltött szerepét feltételezhetjük.

A dolgozatomban a teljes dADA2b funkciót eltávolító (*dAda2b*⁸⁴²) deléció, valamint a rövid dADA2bS izoformát kifejező transzgenikus törzsek alkalmazásával megvizsgáltam, hogy a dADA2b fehérjéken keresztül a dSAGA acetilációs aktivitása hogyan járul hozzá a génműködés szabályozásához.

A dSAGA acetiltranszferáz komplex szabályozása alatt álló gének

Először meghatároztuk, hogy adott fejlődési állapotokban mely gének expresszióját szabályozza a dSAGA specifikus acetiláció. Ehhez vad típusú és *dAda2b* mutáns egyedeken két fejlődési állapotban (késői L3 lárvá és korai báb állapot) teljes transzkriptum analízist végeztünk. Összehasonlítva a génextpressziós profilokat meghatároztuk, hogy a dADA2b fehérje hiányában mely gének expressziója tér el a vad típusétól. A dSAGA komplex mindkét fejlődési állapotban a gének csak egy kis részének (kb. 5 %) a szabályozásában vesz részt. Az acetiláció szerepéről eddig kialakított képtől eltérően ezen dSAGA-függő géneknek több mint a fele nem csökkent, hanem emelkedett mértékű expressziót mutatott a dSAGA specifikus acetiláció hiányában. Ehhez hasonlóan a szakirodalomban más magasabbrendű organizmus esetében (*Arabidopsis thaliana*) is azt találták, hogy az *AtGcn5* és *AtAda2b* transzkripciók koaktivátorok hiányában a gének egy részének megemelkedett az expressziója. Mind a két vizsgált fejlődési állapotban hasonló funkcióval rendelkező gének mutattak dADA2b-függő expressziót. A dADA2b fehérje stresszválasz szabályozásában betöltött funkciójára utalhat, hogy az emelkedett expressziójú gének között nagy számban találunk az immunfunkcióknak valamint a mikroorganizmusok elleni védekezési folyamatoknak megfelelő génontológiai csoportokba tartozó géneket.

A dSAGA komplexre specifikus dADA2b alegység rövid izoformájának szerepe a dSAGA működésében

Előzetes kísérleti adatok azt mutatták, hogy a *dAda2b* génről kétféle mRNS és fehérje izoforma képződik, így megvizsgáltuk, hogy a dSAGA komplexre specifikus dADA2b alegység ezen két izoformája hogyan járul hozzá a dSAGA génműködés szabályozásában betöltött funkciójához. A kétféle mRNS formának megfelelő fehérje izoformák változó mennyiségben ugyan, de az egyedfejlődés minden szakaszában jelen voltak. Ezért megvizsgáltuk, hogy a dADA2b rövid izoforma önmagában hogyan képes ellátni a teljes dADA2b funkciót. Mind a *dAda2b* deléció okozta letalítás tekintetében, mind a dSAGA komplex acetilációs aktivitását, mind az apoptotikus folyamatok szabályozására kifejtett hatását tekintve a rövid dADA2b fehérje csak részlegesen tudta pótolni a dADA2b funkciót. Összességében elmondhatjuk, hogy a két dADA2b izoforma csak a C-terminálison elhelyezkedő harmadik ADA motívum jelenlétében különbözik egymástól, funkcionálisan

mégsem ekvivalensek. A dADA2bS esetében tapasztalt részleges funkció háttérében azt feltételezhetjük, hogy a rövid izoforma jelenlétében létrejövő dSAGA komplex csak az egyik irányú génexpressziós változások szabályozásában képes részt venni. Ezért a dADA2bS izoformát kifejező, egyébként *dAda2b* mutáns lárvákon transzkriptum analízist végeztünk, amely során megállapítottuk, a dADA2bS fehérje jelenlétében létrejövő dSAGA komplex mind az emelkedett, mind a csökkent expressziójú gének szabályozásában részt vesz. Az emelkedett expressziót mutató gének 40%-ának az expresszióját visszaállította a vad típusban mért szintre, tehát megállapíthatjuk, hogy a represszió közvetítésében hatékonyabbnak bizonyult a rövid izoforma, viszont itt sem volt képes betölteni a teljes *dAda2b* funkciót. A dADA2b-függő gének több, mint felének szabályozásához a rövid izoforma önmagában nem volt elegendő, ezen gének megfelelő átírásához valószínűleg a dADA2bL fehérjére, vagy mindkét izoforma egyidejű jelenlétére szükség lehet. Elképzelhető, hogy a dSAGA komplex a dADA2b izoformák segítségével valósít meg egy génspecifikus transzkripció szabályozást, de ez nem olyan formában történik, hogy a rövid izoforma jelenlétében a dSAGA komplex kizárólag aktiváló, vagy represszálo hatást lenne képes kifejteni.

A dSAGA komplex és az általa létrehozott H3K9 acetiláció szerepe a génexpresszió szabályozásában

A dADA2b fehérje a dSAGA komplex hiszton acetilációt létrehozó moduljának egyik felépítő eleme, amely meghatározza a dGcn5 fehérje szubsztrát specificitását. Így megvizsgáltuk, hogy a dADA2b fehérjék hiányában megfigyelt expressziós változások közül mind a csökkent, mind pedig az emelkedett mértékű génexpresszió is a dADA2b acetilációt befolyásoló hatásához köthető-e. Ehhez *w¹¹¹⁸* és *dAda2b* mutáns SpEv lárvákon végzett kromatin immunprecipitációs kísérletekben dSAGA-függő (emelkedett és csökkent expresszió), illetve dSAGA-független transzkripciót mutató géneken is meghatároztuk a dADA2b fehérje jelenlétét, valamint a H3K9 acetiláció szintjét.

A dADA2b fehérje kötődése alapján több dSAGA-függő expressziót mutató gént (*sug*, *cnc*, *CycB*, *Hus1*) is direkt dSAGA célgénként sikerült azonosítani. Mind a csökkent, mind az emelkedett expressziót mutató gének esetében is sikerült dADA2b kötődést kimutatnunk, tehát mindkét irányú expressziós változás háttérében a dSAGA komplex közvetlen működése állhat. A dADA2b fehérje jelenléte nemcsak a gének promóterhez közeli részén, hanem a 3' végi régiójában is kimutatható volt. Ezekhez az adatokhoz hasonlóan a *Schizosaccharomyces pombe* yGcn5 fehérje bizonyos gének esetében nem csak a promóterhez közeli, hanem a teljes átírt régiókhoz is kapcsolódott, valamint *Drosophila* embrionális izom sejtekben is több gén esetében a promóterhez közeli szakaszok mellett a 3' végi régiókban is kimutatható volt a

dADA2b fehérje jelenléte. Az általunk kimutatott dADA2b kötődési mintázat hátterében az állhat, hogy a dSAGA komplex nem csak a transzkripció iniciációs, hanem elongációs lépését is szabályozhatja, és így a gének teljes átírt régióján megjelenik a dSAGA komplex.

A dSAGA-függő expressziót mutató gének H3K9 acetilációs szintjét megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy mind a csökkent (*sug*, *cnc*, *CycB*), mind az emelkedett (*Fst*, *Hus1*, *AttD*) expressziójú gének területén megjelent a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció. Élesztő és *Drosophila* sejtekből származó adatokhoz hasonlóan az általunk vizsgált dSAGA specifikus H3K9 acetiláció is a vizsgált gének promóterhez közeli régióján jelent meg magasabb szinten. Ezen adatok alapján megállapíthatjuk, hogy a promóterhez közeli régióban a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció jelenléte számos gén szabályozása során esszenciális, viszont a transzkripció folyamata során nem csak aktiváló, hanem represszáló hatás kialakításához is közvetlenül hozzájárulhat.

A dSAGA specifikus H3K9 acetiláció szerepe a génaktiváció folyamatában

Hogy megtudjuk, a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció hogyan járul hozzá a génaktiváció folyamatához, feltérképeztük a génaktiváció során az acetiláció szintjét, valamint annak az adott gén transzkripciójára kifejtett hatását is. A nyálmirigy óriáskromoszómákon elvégzett immunfestés során megállapítottuk, hogy a dSAGA specifikus hiszton acetiláció nem kizárólagos előfeltétele a hősokk gének aktivációjának, ugyanis az átírást végző RNS polimeráz csökkent H3K9 acetiláció mellett is képes az aktivált hősokk génekhez kötődni. Az acetiláció szerepének részletesebb tanulmányozásához az ekdizon hormon által indukált *Eip74EF* és *Eip75B* korai gének vizsgálatát választottuk eszköznek. Először feltérképeztük ezen gének aktivációs profiljait, majd az ezek alapján a génaktivációt kísérő acetilációs mintázat vizsgálatához kiválasztottunk egy indukció előtti és két indukció alatti időpontot. Ezekben az időpontokban kromatin immunprecipitációs kísérlettel meghatároztuk a H3K9 acetiláció mennyiségét a gének promóter, promóterhez közeli intronikus, valamint 3' véghez közeli exonikus régiókban. Az elvégzett CHIP kísérlet eredménye azt sugallja, hogy a H3K9 acetiláció a vizsgált régiókban egy általánosan jelen lévő hiszton módosítás, ami nem mutat kifejezett régió specificitást. A génaktiváció folyamatával kapcsolatban sem tapasztaltunk olyan jellegű összefüggést, hogy csak az adott transzkriptum expressziója idején jelenne meg ez a módosítás. Egyedül az adott promóterek működésének megfelelően a promóterekhez közeli régiókban mutatott enyhe emelkedést a H3K9 acetiláció mennyisége. *dAda2b* mutáns vándorló L3 stádiumú lárvákon (wL3) elvégzett kromatin immunprecipitációs kísérletekből megállapítottuk, hogy a dADA2b hiányában a H3K9 acetiláció szintje az általunk vizsgált összes génszakaszon és intergenikus régióban

lecsökkent. Tehát a dSAGA komplex az *Eip74EF* és *Eip75B* gének esetében nemcsak a promótereken előforduló, hanem egy általánosan jelen lévő H3K9 acetilációs mintázat létrehozásáért felelős. Már az élesztő yGcn5 fehérjéről is leírtak egy ehhez hasonló, nagyobb kiterjedésű, kódoló és intergenikus területeket egyaránt érintő általános acetilációs aktivitást.

Megvizsgáltuk, hogy ez a dSAGA specifikus általános acetilációs mintázat hozzájárul-e az *Eip74EF* és *Eip75B* gének expressziójának szabályozásához, melyhez megmértük a dADA2b fehérjék hiányában az *Eip74EF* és *Eip75B* gének promótereiről képződő nascens RNS-ek mennyiségét. Ennek során megállapítottuk, hogy a kisebb mértékben aktiválódó *Eip74EF-RB* és *Eip75B-RC* promóterek indukciója a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció hiányában csak kevésbé sérül, míg az erőteljes indukciót mutató *Eip74EF-RA* promóter aktivációja elmarad. Tehát az *Eip74EF* és *Eip75B* gének területén általánosan jelen lévő dSAGA specifikus H3K9 acetilációs mintázat fontos szabályozó szereppel bír ezen gének aktivációjának szabályozásában. Ezek az adatok is alátámasztják azt a tényt, hogy az eukromatikus régiókban általánosan jelen lévő acetilációs mintázat hozzájárulhat a génműködés megfelelő kinetikájához, és ezáltal fontos szerepet tölt be a génexpresszió szabályozásában.

A dSAGA specifikus hiszton acetiláció feltételezett funkciója a génműködés szabályozásában

A dolgozatomban részletezett eredmények is rámutatnak, hogy a dSAGA HAT komplex rendkívül összetett módon járulhat hozzá a génműködés szabályozásához. Egyrészt transzkripciót szabályozó fehérjékkel közvetlenül kölcsönhatva szerepet játszhat egy irányított, helyspecifikusan megjelenő acetiláció létrehozásában, másrészt részt vesz egy általánosan megjelenő acetilációs alapmintázat fenntartásában is. Ez a kétféle acetiláció nem egymástól függetlenül jelentkezik, hanem egy dinamikusan változó acetilációs háttéren jelenhet meg egy irányított, helyspecifikus acetiláció. Az elvégzett kromatin immunprecipitációs kísérletben láthattuk, hogy a dSAGA elégtelen működése következtében sérült az eukromatikus részek általános H3K9 acetilációs mintázata. Elképzelhető, hogy ennél az alacsonyabb acetiláltságú kromatinszerkezetnél gyengül a szabályozó fehérjék kromatinhoz való kötődési képessége, és ezáltal – attól függően, hogy aktivátor vagy represszor hatású fehérjéről van szó – módosul az általuk szabályozott gének működése. Részben ez magyarázhatja, hogy a dSAGA specifikus acetiláció hiányában nem csak csökkent, hanem emelkedett expressziójú géneket is azonosítottunk. Ezenfelül ez az általánosan megjelenő, dinamikusan változó acetilációs mintázat hozzájárulhat a génszabályozás megfelelő kinetikájához is. Ezt igazolja, hogy az általunk használt *in vivo*

modell géneken (*Eip74EF* és *Eip75B*) a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció hiányában módosult a génaktiváció folyamata. Tehát elképzelhető, hogy a dSAGA specifikus általános H3K9 acetilációs mintázat hiányában bizonyos gének aktivációja nem a megfelelő időben történik meg, és ezáltal teljesen felborulhat a sejtre jellemző koordinált génexpressziós mintázat.

Tehát a dSAGA komplex acetilációs aktivitása közvetett módon is, egy transzkripciót megengedő kromatinszerkezet fenntartásán keresztül is hozzájárul a génműködés szabályozásához.

9. Summary

Considerable and dynamic compaction of the genome is essential for normal function of eukaryotic cells. This is carried out by the chromatin structure, in which 147 base pairs of DNA is wound around a core of four basic histone proteins (H2A, H2B, H3, H4) to form the basic building blocks, the nucleosomes. Individual nucleosomes can pack against each other and adopt several higher-order chromatin structures which are thought to be the major obstacles to transcription, replication and repair. Therefore, compaction level and dynamic changing of chromatin packaging can possess a major regulatory role in gene expression regulation. Posttranslational modifications of histone proteins are one of the various known mechanisms altering the accessibility of the chromatin template. Among several described modifications acetylation of lysine residues is one of the most studied ones. Histone acetylation is a major determinant of chromatin compaction: hyperacetylation state is coupled to an open conformation, whereas hypoacetylated nucleosomes are characteristic for a compact, folded chromatin. Hyperacetylated, open chromatin has long been linked to active transcription; however, the exact details of its regulatory effect have not yet been established. Considerable knowledge provided from characterization of histone acetyltransferases (HAT) can contribute to better understanding the regulatory role of histone acetylation. One of the well characterized HAT enzymes is Gcn5, which functions as a subunit of large multiprotein complexes. These Gcn5-containing HAT complexes harbour ADA-type adaptor proteins, which regulate the template recognition and lysine specificity of Gcn5. dADA2b protein is a subunit of the acetylation modul of dSAGA, one of the two different *Drosophila* Gcn5-containing HAT complexes, that determines the histone H3 lysine 9 and 14 acetylation specificity of the complex. Diverse functions of ADA2 proteins are demonstrated by the fact *dAda2b* gene produces two mRNAs and protein forms. The N-terminal parts of dADA2b isoforms are identical; these shared parts harbor a zinc finger-like ZZ and a SANT domain, characteristic for all known ADA2 proteins. The isoforms differ in their C-terminal regions, which contain ADA2 protein specific α -helical motifs so-called ADA boxes. The short isoform (dADA2bS) of dADA2b harbors two ADA boxes, while a third ADA box is present only in the longer isoform (dADA2bL). If these ADA boxes could contribute to the capability of ADA2 proteins to interact with other subunits of the complex, we hypothesized that the dADA2b isoforms varying in the number of the ADA boxes could function in different regulatory processes.

In my thesis I examined the presumed role of dSAGA specific histone acetylation in gene regulation by utilizing a *dAda2b*⁸⁴² deletion eliminating complete dADA2b function and dADA2bS isoform expressing transgenic strains.

Genes are regulated by the dSAGA acetyltransferase complex

We determined the genes regulated by dSAGA specific acetylation in well defined developmental stages. For this purpose, we performed transcriptome analysis on wild type and *dAda2b* mutant animals in two developmental stages (late L3 larvae and early pupa). By comparing the mRNA profiles we determined genes showing altered expression level in the absence of dADA2b. At both time points analyzed only a small subset of genes (5 %) were regulated by dSAGA complex. Despite the supposed role of histone acetylation in transcription activation, more than half of the dSAGA-dependent genes showed increased transcription levels in the absence of dSAGA specific acetylation. Similarly to our data, in higher eukaryotes (*Arabidopsis thaliana*) elimination of transcriptional coactivators *AtGcn5* and *AtAda2b* also resulted in upregulation of more than half of the affected genes. In both analyzed developmental stages the dSAGA-regulated genes showed similar distribution according to biological function. The significant enrichment of the upregulated genes in gene ontology categories involved immune response, might suggest the potential role of dADA2b protein in stress response.

Role of short isoform of dADA2b subunit in dSAGA functions

Previous studies revealed that *dAda2b* gene gave rise to two mRNAs and protein isoforms (dADA2bS and dADA2bL). Therefore, we examined whether these two dSAGA specific dADA2b subunits could contribute to the functional complexity of dSAGA in transcription regulation. By western blot analysis we demonstrated that the dADA2b protein isoforms corresponding to the above mentioned mRNA forms could be detected during *Drosophila* development in various amount in different stages. Therefore we studied the potential of the short isoform to occupy the *dAda2b* function. We concluded that the dADA2b short isoform alone can partially provide the *dAda2b* function both in development, in acetylation activity and in the regulation of apoptotic processes. Taken together, the two dADA2b isoforms differ only in their C-terminus however functionally they are not equivalent. The partial functional rescue effect of dADA2bS can be explained by the fact the dADA2bS-containing dSAGA complex regulates the transcription of only the down- or only the upregulated dSAGA-dependent genes. In order to answer this question we performed transcriptom analysis on larvae expressing only the short dADA2b isoform in *dAda2b* mutant background. We concluded that the dADA2bS-containing dSAGA complex could contribute

to the regulation of both the increased and the decreased ones of dSAGA-regulated genes but it was more effective in mediating of repressive function. Besides this, the presence of the short isoform alone was not sufficient for the proper regulation of more than the half of the dSAGA-dependent genes. Thus the normal expression of these genes might require the presence of either the long isoform or both dADA2b isoforms. Our data can not exclude the possibility that dSAGA could perform gene-selective transcription regulation by using distinct dADA2b isoforms however it is most probably not accomplished by the mechanism in which the dADA2bS-containing dSAGA induces or represses the expression of the regulated genes.

The role of dSAGA complex and dSAGA specific H3K9 acetylation in regulation of gene expression

The dADA2b protein is a component of the acetylation module of dSAGA complex and determinates substrate specificity of dGcn5. Therefore, we examined whether both the decreased and increased transcription in the absence of dADA2b can be the consequence of the role of dADA2b in histone acetylation. For this in *w¹¹¹⁸* and *dAda2b* mutant SpEv larvae we determined the presence of dADA2b protein and the H3K9 acetylation level on dSAGA-dependent (both up- and downregulated) and dSAGA-independent genes.

According to the presence of dADA2b protein more dSAGA-dependent genes (*sug*, *cnc*, *CycB*, *Hus1*) could be identified as direct dSAGA target genes. Both on up- and downregulated genes we could detect dADA2b binding so the dSAGA function could be directly responsible for either expression changes. The presence of dADA2b could be detected not only on promoters but also on 3' end regions. Similarly, the presence of *Schizosaccharomyces pombe* yGcn5 on promoters, its binding to coding regions was also demonstrated on several genes. Moreover, in *Drosophila* embryonic muscle cells in case of several genes dADA2b was found on promoters and 3' end regions. Our data about dADA2b binding pattern suggests the possible role of dSAGA in transcription initiation and elongation phases.

By examining the H3K9 acetylation level of dSAGA-dependent genes we detected the presence of dSAGA specific H3K9 acetylation on both up- (*Fst*, *Hus1*, *AttD*) and downregulated (*sug*, *cnc*, *CycB*) genes. Similarly to data from yeast and *Drosophila* cells, we also could detect higher levels of the H3K9 acetylation on promoters. Thus we concluded that the presence of the dSAGA specific acetylation on promoters is essential in the transcription regulation of several genes but it can contribute not only to gene activation but also to gene repression.

The function of dSAGA specific H3K9 acetylation in the process of gene activation

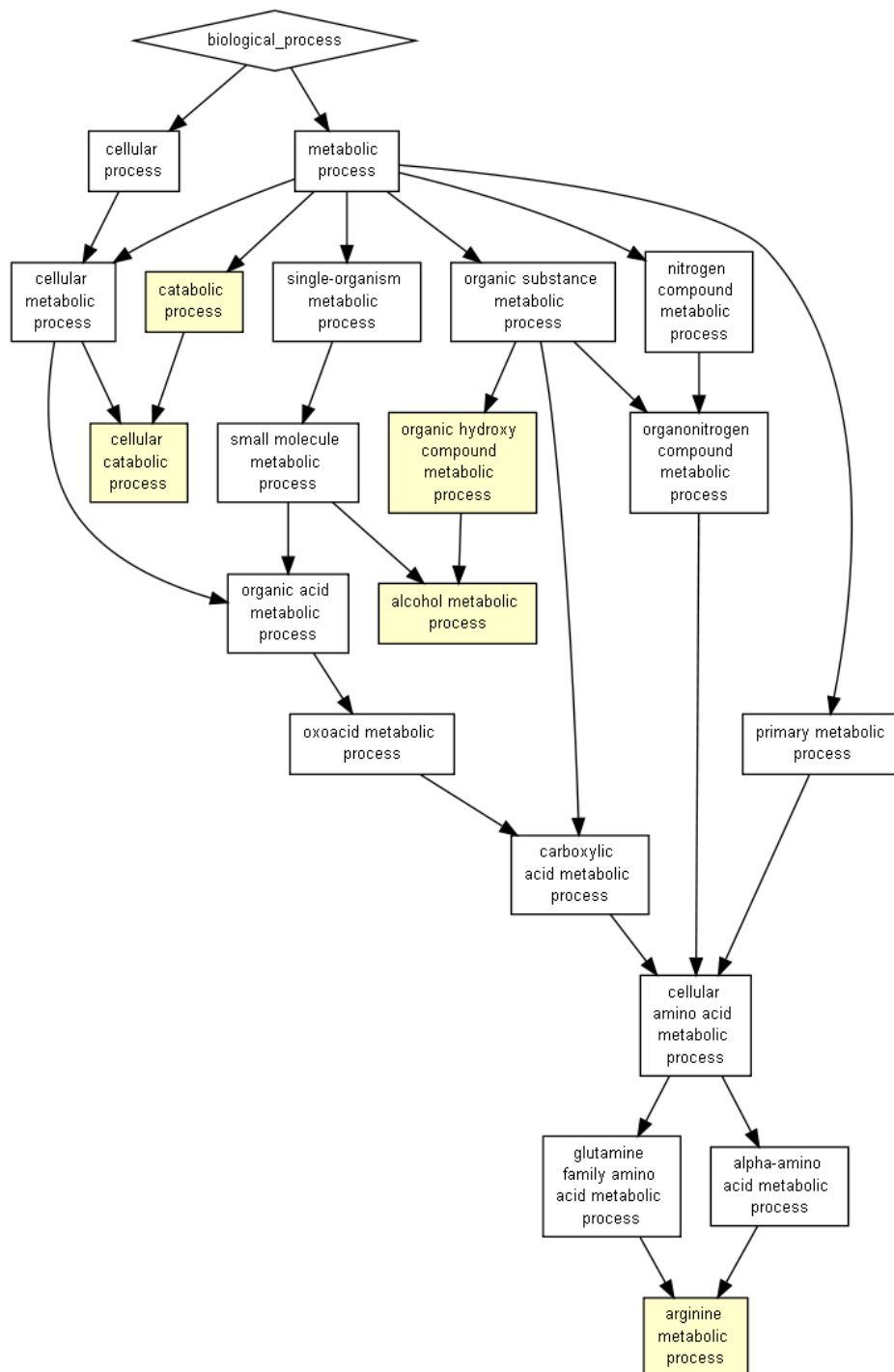
To understand whether the dSAGA specific H3K9 acetylation can contribute to the process of gene activation, we determined the level of histone acetylation during the progress of gene activation and its effect on the efficiency of transcription. According to immunostaining of polytene chromosomes of salivary gland in *Drosophila* we established that the presence of dSAGA specific acetylation is not an obligate prerequisite of gene activation as the active RNA polymerase could bind to activated heat shock genes in the loss of dSAGA specific H3K9 acetylation. To clarify in details the role of acetylation during gene activation *in vivo* we used two early ecdysone induced genes (*Eip74EF* and *Eip75B*) as models. First we defined the activation patterns of these genes, therefore three time points were selected (one before activation, two during activation) for the analysis of the acetylation pattern. At these time points we determined the level of H3K9 acetylation on the promoter, on the first intronic and on the 3' end exonic regions of these genes by chromatin immunoprecipitation. Our results demonstrated that the H3K9 acetylation occurred globally on the tested genes, its regional and temporal distribution could not be detected. Only moderate increase in the H3K9 acetylation level but not obligate appearance of it was observable nearby the promoter regions during active transcription. Chromatin immunoprecipitation analysis performed on *dAda2b* mutant wandering (wL3) larvae showed that the level of H3K9 acetylation decreased on all of the examined genes and intergenic regions in the absence of dADA2b. Therefore, the dSAGA complex is responsible for the establishment of a global H3K9 acetylation pattern on the *Eip74EF* and *Eip75B* genes. A similar global acetylation activity of yeast yGcn5 on large ranging coding and intergenic regions was previously described.

To examine how this dSAGA specific global acetylation pattern could contribute to the transcription regulation of *Eip74EF* and *Eip75B* genes, we measured the level of nascent RNA produced from *Eip74EF* and *Eip75B* promoters in the absence of dADA2b proteins. We found that the induction of the moderately activated *Eip74EF-RB* and *Eip75B-RC* promoters did not change significantly, whereas the activation of the strongly induced *Eip74EF-RA* promoter failed to occur in the loss of dSAGA specific H3K9 acetylation. So the dSAGA specific global acetylation pattern on *Eip74EF* and *Eip75B* genes can play an important regulatory role in the activation of these genes. These data confirm that the global histone acetylation pattern in the euchromatic regions promotes proper kinetics of transcription thus has remarkable function in gene regulation.

The supposed function of dSAGA specific histone acetylation in gene regulation

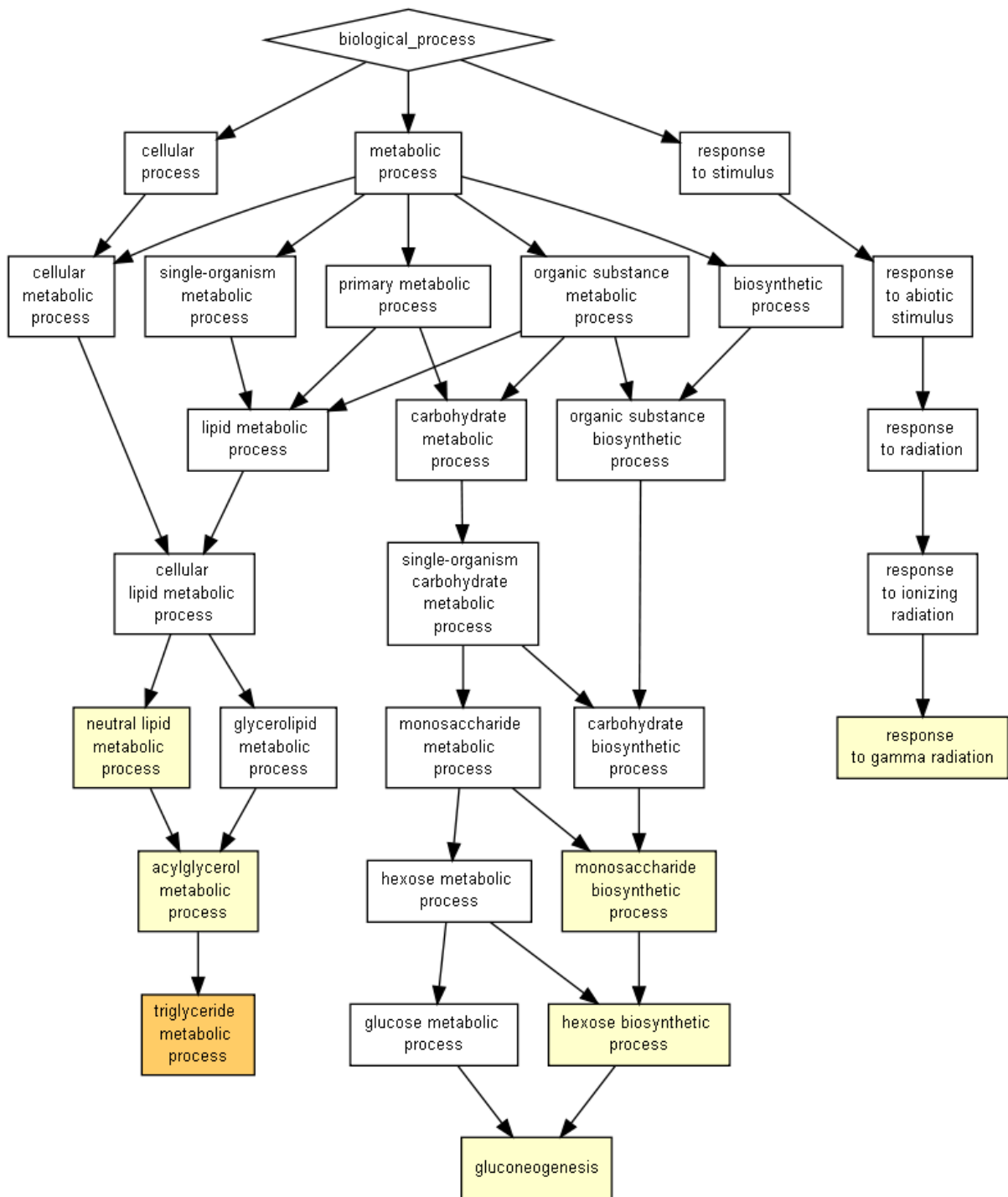
Previously detailed results in my thesis indicate the multiple role of dSAGA HAT complex in gene regulation. On one hand, interacting directly with transcription factors dSAGA functions in the generation of a site-specific acetylation, on the other hand it contributes to the establishment and maintenance of a global acetylation pattern. The two acetylation types do not occur independently, but on a dynamic global acetylation background a site-specific acetylation pattern can appear. Our results derived from chromatin immunoprecipitation analysis revealed that the H3K9 acetylation pattern of euchromatic regions changed in the loss of dSAGA activity. It is possible that the hypoacetylated chromatin structure weakens the binding affinity of regulatory factors – which can be either activators or repressors – and hence the transcription of genes under their control could be changed according to the loss of the regulatory function. Similar hypothesis can partially explain the fact that down- and upregulated genes could be identified in the loss of dSAGA specific acetylation. Moreover, this dynamic global acetylation pattern may also contribute to the suitable kinetics of transcription regulation. This concept can be proven by data indicating altered kinetics of the activation of the *in vivo* model genes (*Eip74EF* and *Eip75B*) by the loss of dSAGA specific H3K9 acetylation. Therefore, in the loss of the dSAGA specific global H3K9 acetylation pattern activation of specific genes can not be performed in proper time, which can cause the shuffling of coordinated gene expression pattern characteristic for the cell.

10. Függelék



F1. ábra: Az ábrán a *dAda2b* mutánsban SpEv állapotban csökkent expressziót mutató gének között azonosítható, szignifikánsan felülreprezentált biológiai folyamatoknak megfelelő génontológiai csoportok láthatóak.

A fehér színel jelölt kategóriákba eső gének feldúsulásának szignifikancia szintje $P > 10^{-3}$; a citromsárgára színezett kategóriákba esőké $10^{-3} > P > 10^{-5}$.



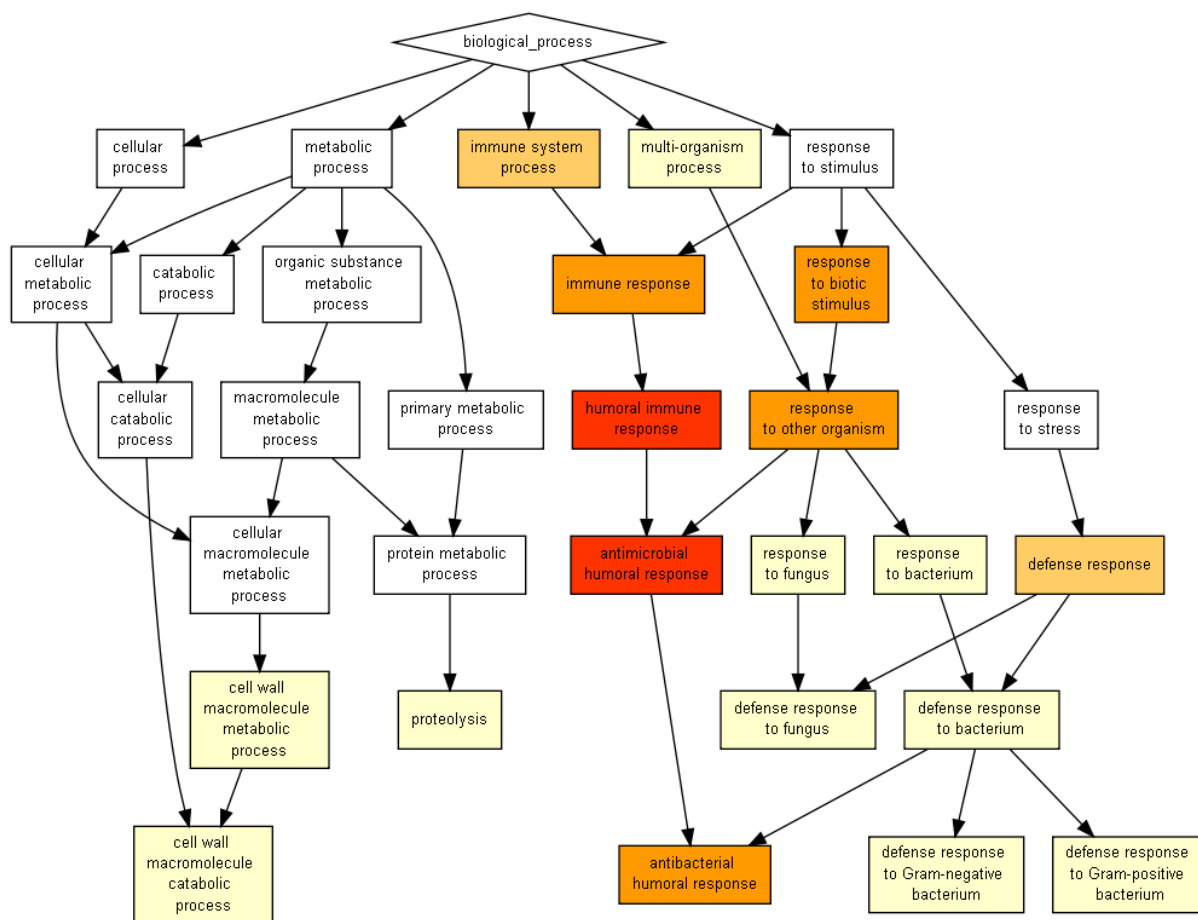
F2. ábra: Az ábrán a *dAda2b* mutánsban korai báb állapotban csökkent expressziót mutató gének között azonosítható, szignifikánsan felülreprezentált biológiai folyamatoknak megfelelő géntológiai csoportok láthatóak.

A fehér színel jelölt kategóriákba eső gének feldúsulásának szignifikancia szintje $P > 10^{-3}$; a citromsárgára színezett kategóriákba esőké $10^{-3} > P > 10^{-5}$; a narancssárgákba eső géneké pedig $10^{-5} > P > 10^{-7}$.



F3. ábra: Az ábrán a *dAda2b* mutánsban SpEv állapotban emelkedett expressziót mutató gének között azonosítható, szignifikánsan felülreprezentált biológiai folyamatoknak megfelelő géntológiai csoportok láthatóak.

A fehér színel jelölt kategóriákba eső gének feldúsulásának szignifikancia szintje $P > 10^{-3}$; a citromsárgára színezett kategóriákba esőké $10^{-3} > P > 10^{-5}$; a narancssárgákba eső géneké pedig $10^{-5} > P > 10^{-7}$.



F4. ábra: Az ábrán a *dAda2b* mutánsban korai báb állapotban emelkedett expressziót mutató gének között azonosítható, szignifikánsan felülreprezentált biológiai folyamatoknak megfelelő géntológiai csoportok láthatóak.

A fehér színnel jelölt kategóriákba eső gének feldúsulásának szignifikancia szintje $P > 10^{-3}$; a citromsárgára színezett kategóriákba esőké $10^{-3} > P > 10^{-5}$; a narancssárgákba esőké $10^{-5} > P > 10^{-7}$; a pirosba tartozóké $10^{-7} > P > 10^{-9}$.