

**Az ENHANCER OF ZESTE fehérje szerepe az epigenetikus represszió
létrehozásában *Drosophila melanogaster*ben**

Ph.D. Értekezés

Készítette: Bajusz Izabella

Témavezető: Dr. Gyurkovics Henrik

Magyar Tudományos Akadémia

Szegedi Biológiai Központ

Genetikai Intézet

Szeged, 2003.

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK.....	2
1. ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS.....	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS ÉS TUDOMÁNYOS HÁTTÉR.....	11
2. 1. A <i>DROSOPHILA MELANOGASTER BITHORAX</i> -KOMPLEXÉNEK MOLEKULÁRIS FELÉPÍTÉSE, ÉS MŰKÖDÉSÉNEK MODELLJE.....	11
2. 1. 1. Általános felépítés.....	11
2.1.2. A BX-C korai kifejeződési mintázatának kialakulása.....	16
2.1.3. A BX-C cisz-regulátorainak korai működése és felépítése.....	17
2.1.4. A BX-C kifejeződési mintázatának fenntartása.....	19
2.2. A CISZ-REGULÁTOROK INAKTÍV ÁLLAPOTÁNAK FENNTARTÁSA.....	21
2.2.1. A Polycomb-csoportba tartozó gének azonosítása muslicában.....	21
2.2.2. A <i>Drosophila</i> Polycomb-csoportba tartozó génjeinek homológjai.....	23
2.2.3. A Polycomb-csoport génjeinek és fehérjéinek kölcsönhatásai.....	23
2.2.4. A POLYCOMB-csoport fehérjéit tartalmazó komplexek izolálása.....	24
2.2.5. Az inaktív állapot fenntartását mediáló DNS szakaszok.....	25
2.2.6. A PRE-k és a POLYCOMB-fehérjék in vivo kapcsolata.....	28
2.2.7. Az inaktív állapot fenntartásának módja.....	28
2.2.8. Az inaktív állapot kromatinszerkezeti alapjai.....	31
2.2.9. A hisztonok kovalens módosításainak szerepe a génregulációs folyamatokban: a hiszton- kód hipotézis.....	35
2.2.10. Repressziós kromatinszerkezeti modellek.....	37
2.3. A CISZ-REGULÁTOROK AKTÍV ÁLLAPOTÁNAK FENNTARTÁSA.....	40
2.3.1. A <i>trx</i> -csoportba tartozó gének azonosítása muslicában.....	41
2.3.2. A TRX-rendszer működésére felállított modellek.....	42
2.3.3. SET-doménnel rendelkező TRX-G fehérjék.....	43
2.3.4. Hiszton-metil-transzferáz aktivitású TRX-G fehérjék és komplexek.....	45
2.3.5. Nukleoszómák mozgására képes komplexek.....	46
2.4. AZ <i>ENHANCER OF ZESTE</i> GÉN SZEREPE A KROMATINSZERKEZET KIALAKÍTÁSÁBAN.....	48
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	51
3.1. <i>DROSOPHILA</i> TENYÉSZET ÉS TÖRZSEK.....	51
3.2. ÁLTALÁNOS MÓDSZEREK.....	51
3.2.1. EMS mutagenézis.....	51
3.2.2. Komplementáció ismert, <i>trithorax</i> -csoportba tartozó mutánsokkal.....	51
3.2.3. Röntgen-reverzió.....	52
3.2.4. A letálfázis meghatározása.....	52
3.2.5. Nyálmirigy kromoszómapreparátum készítés.....	52
3.2.6. Az $E(z)^{Trm}$ nos-szuppressziójának vizsgálatához alkalmazott petéztetés.....	53
3.2.7. Embriónális kutikula preparátum készítése.....	54
3.2.8. Adult kutikula preparátumok készítése.....	54
3.2.9. A <i>Trithorax</i> -mimic mutáns genetikai interakcióinak vizsgálata.....	55
3.2.9.1. Adult fenotípusos interakciók vizsgálata.....	55
3.2.9.2. Az embriónális nos-szuppresszor fenotípus vizsgálata.....	57
3.2.10. Rekombinációval előállított kromoszómák.....	58
3.2.10.1. A <i>Trm</i> kromoszóma megtisztítása a másodlagos mutációktól.....	58
3.2.10.2. $E(z)^{Trm}$ <i>e211</i> rekombinánsok létrehozása.....	59
3.2.10.3. $E(z)^{Trm}$ <i>hb^{7M}nos^{L7}</i> rekombinánsok létrehozása.....	59
3.2.11. PRE szakaszt tartalmazó P-elemek ugratása.....	60
3.3. IMMUNOLÓGIAI, MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI, BIOKÉMIAI MÓDSZEREK.....	61
3.3.1. Lárvális óriáskromoszómák immunohisztokémiai festése.....	61
3.3.2. Kompetens sejtek készítése.....	62
3.3.3. A mutáns allélok szekvenálása.....	62

3.3.4. <i>In vitro</i> mutagenézis.....	62
3.3.5. Az E(Z) fehérjék <i>in vitro</i> translációja	63
3.3.6. Kötési kísérletek radioaktívan jelölt <i>in vitro</i> transzlált fehérjékkel	65
3.3.6.1. Kötési kísérletek Sulfolink-kötött peptidekkel	66
3.3.7. A FLAG jelölt C-terminális E(Z) fehérje fragmentek kifejeztetése Sf9 sejtekben	66
3.3.7.1. Transzfecció.....	66
3.3.7.2. Amplifikáció.....	67
3.3.7.3. Fehérjetermelés	68
3.3.7.4. A termelt fehérje ellenőrzése.....	68
3.3.8. Kötési kísérletek termelt fehérjékkel	69
3.3.9. Hiszton-metil-transzferáz aktivitás mérése	69
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	71
4.1. A TRITHORAX-MIMIC MUTÁCIÓ IZOLÁLÁSA ÉS GENETIKAI JELLEMZÉSE	71
4.1.1. A mutáció izolálása.....	71
4.1.2. A mutáció fenotípusa és lokalizációja.....	71
4.1.3. A mutáció reverziója.....	74
4.1.4. Az E(z) ^{Trm} mutáció fenotípusának változása az E(z) gén dózisének függvényében.....	76
4.1.5. Az E(z) ^{Trm} mutáció letálfázisának, és hemizigóta fenotípusának meghatározása	77
4.1.6. Az E(z) ^{Trm} mutáció alléltípusának meghatározása.....	80
4.2. AZ E(Z) ^{TRM} HATÁSA A Z ^I ÉS Z ^I W ^S ALLÉLOK ÁLTAL LÉTREHOZOTT WHITE INAKTIVÁCIÓRA.....	81
4.3. A TRITHORAX-MIMIC MUTÁCIÓ MOLEKULÁRIS JELLEMZÉSE	83
4.3.1. A trx-típusú SET-domént tartalmazó mutáns E(z) fehérje lehetséges szerepének vizsgálata	85
4.4. AZ E(Z) ^{TRM} FEHÉRJE KÖTŐDÉSÉNEK VIZSGÁLATA ÓRIÁSKROMOSZÓMÁKON.....	87
4.5. AZ E(Z) ^{TRM} TÁMADÁSPONJÁNAK TÉRKÉPEZÉSE PRE-T TARTALMAZÓ PÁROSODÁS- ÉRZÉKENY TRANZGENIKUS RIPTERGEN KONSTRUKCIÓK SEGÍTSÉGÉVEL	89
4.6. AZ E(Z) ^{TRM} INTERAKCIÓI HŐMÉRSÉKLET-ÉRZÉKENY ÉS ANTIMORF E(Z) ALLÉLOKKAL.....	95
4.7. AZ E(Z) ^{TRM} HATÁSA MATERNÁLIS NANOS MUTÁCIÓRA	99
4.8. AZ E(Z) ^{TRM} INTERAKCIÓJA MÁS POLYCOMB-CSOPORTBA TARTOZÓ MUTÁCIÓKKAL....	101
4.9. AZ E(Z) ^{TRM} INTERAKCIÓI TRITHORAX-CSOPORTBA TARTOZÓ MUTÁNSOKKAL	108
4.10. AZ E(Z) ^{TRM} FENOTÍPUS ÉRZÉKENY A HISZTONOK SZINTJÉBEN BEKÖVETKEZŐ VÁLTOZÁSOKRA	111
4.11. AZ E(Z) ^{TRM} ÉRZÉKENY A HISZTON ACETILÁCIÓS-SZINT VÁLTOZÁSÁIRA.....	112
4.12. AZ E(Z) ^{TRM} HOMEOTIKUS FENOTÍPUSA ÉRZÉKENY A PP1 NUKLEÁRIS FOSZFATÁZ DÓZISÁRA	116
4.13. AZ E(Z) ^{TRM} HOMEOTIKUS FENOTÍPUSA ÉRZÉKENY A HISZTONOK FOSZFORILÁLÁSÁRA IS KÉPES KINÁZOK DÓZISÁRA	119
4.14. AZ MESTERSÉGESEN TERMELT E(Z) FEHÉRJÉK.....	121
4.15. KÖTÉSI KÍSÉRLETEK MÓDOSÍTOTT HISZTON FARKI PEPTIDEKKEL	122
4.16. HISZTON-METIL TRANSZFERÁZ AKTIVITÁSMÉRÉSEN ALAPULÓ KÍSÉRLETEK	125
4.17. AZ E(Z) SET-DOMÉNEK KÖZTI INTERAKCIÓK <i>IN VITRO</i> KIMUTATÁSA	130
5. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA.....	132
6. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	136
6.1. AZ E(Z) FEHÉRJE SZEREPE AZ EPIGENETIKUS REPRESSZIÓBAN	136
6.2. AZ E(Z) ^{TRM} MUTÁNS SEGÍTSÉGÉVEL SZERZETT ÚJ INFORMÁCIÓK AZ ENHANCER OF ZESTE FEHÉRJE INAKTIVÁLÓ MŰKÖDÉSÉRŐL	141
6.3. AZ E(Z) ^{TRM} FEHÉRJE TÁMADÁSPONTJA	143
6.4. AZ E(Z) ^{TRM} SET- DOMÉNJÉNEK SZEREPE A PC-G-FÜGGŐ INAKTIVÁCIÓBAN	145
6.5. AZ E(Z) ^{TRM} FEHÉRJE EGYÜTTMŰKÖDŐ PARTNEREI	147
6.6. A HISZTON-ACETILÁCIÓ FONTOS AZ AKTÍV KROMATINDOMÉNEK KIJELEZÉSÉBEN	149
6.7. A FOSZFORILÁCIÓ SZEREPE AZ AKTÍV KROMATINDOMÉNEK KIJELEZÉSÉBEN	149
6.8. AZ E(Z) ^{TRM} FEHÉRJE HISZTON-METIL-TRANSZFERÁZ AKTIVITÁSA	152

6.9. AZ E(Z) FEHÉRJE SZEREPE ÉS MŰKÖDÉSE A KROMATINDOMÉNEK FELISMERÉSÉBEN ÉS INAKTIVÁCIÓJÁBAN.....	154
7. FÜGGELÉK.....	156
7.1. A <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> MORFOLÓGIÁJA	156
7.2. A <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> EGYEDFEJLŐDÉSE ÉS ÉLETCIKLUSA.	158
7.3. A <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> KORAI EGYEDFEJLŐDÉSE ÉS AZ AZT SZABÁLYOZÓ FAKTOROK	159
7.4. A HOMEOTIKUS GÉNKOMPLEXEK FELÉPÍTÉSE ÉS MŰKÖDÉSI MÓDJA	164
SUMMARY	169
IRODALOMJEGYZÉK	178
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	196
KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	199
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	200

1. ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A magasabbrendű eukarióta szervezetek közös jellemzője az egyedfejlődés során létrejövő, majd az egyes szövetekre, szervekre jellemző mintázatban fenntartott differenciális génexpresszió. Az eukarióta szervezet minden egyes sejtjében jelenlévő azonos genetikai információ a petesejt megtermékenyítése után, a sejtosztódások során keletkező diploid utódsejtekben különböző módon használandó fel. A különböző sejtek fejlődési programjuknak megfelelően a rendelkezésükre álló azonos készletből más és más géneket működtetnek vagy kapcsolnak ki; a sejtvonalspecifikus génkifejeződési mintázat kialakulása a génexpresszió epigenetikus determinációjának folyamata. A determinálódás megelőzi a morfológiai különbségek kialakulását, és ha a determináció hibás, a fejlődésben zavarok lépnek fel. Mivel a bekapcsolt gének által termelt fehérjék minősége és mennyisége szabja meg a szervezetben a különféle fejlődési utakat választó egyes sejtek működését és azok egymással való kölcsönhatásait, ezért a génexpresszió epigenetikus determinációjának vizsgálata a fejlődésbiológia központi feladata.

Mi alakítja ki és őrzi meg a megtermékenyítés után osztódni kezdő sejtek identitását, a különböző sejt típusokra, szövetekre jellemző egyéni génkifejeződési mintázatot? A génexpresszió epigenetikus determinációjának a létrejöttéhez szükséges a determinációt kialakító korai morfogén faktorok megfelelő eloszlása és a működési mechanizmusukat biztosító jelátviteli utak épsége, a megőrződéséhez pedig elengedhetetlen a gének aktív és inaktív állapotának fenntartását biztosító rendszer stabil működése. Az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) különösen hasznos modellorganizmusnak bizonyult az epigenetikus determináció folyamatában résztvevő fehérjéket kódoló gének azonosításához. A későbbiekben kiderült, hogy míg a különböző szövetek, testtájak kialakításáért felelős faktorokat és jelátviteli utakat a szerteágazó sokféleség jellemzi, addig az epigenetikus

determinációt konzerváló faktorok homológjai megtalálhatók minden magasabbrendű eukariótában, sőt a génaktivitási mintázat fenntartásának alapmechanizmusa is hasonló.

A megtermékenyített *Drosophila melanogaster* petében a legkorábbi sejtsors determinációt több, anyai eredetű morfogén gradiens hozza létre. A lokálisan ható, anyai eredetű transzkripció faktorok eltérő koncentrációja a fejlődő embrió anterior és poszterior, illetve háti és hasi részén eltérő mintázatban kapcsolja be a *gap*-, *pair-rule* és a *segment polaritási* géneket. A zigotikus - a korai embriógenézis során csak rövid ideig jelenlévő faktorok - differenciális expressziója a homeotikus gének szelvényt-specifikus kifejeződéséhez vezet. A homeotikus gének azon konzervált, az egyedfejlődés folyamán korán bekapcsolódó, és mindvégig szelvény-specifikusan expresszáldó mestergének, transzkripció regulátorok, melyekről termelődő fehérjék minden egyes szelvényben különböző minősége, illetve mennyisége, a realizátor gének szintjének beállításán keresztül, végső soron az egyedi szelvényt-morfológia kialakulásához vezet.

A *Drosophila melanogaster* esetében a testszerveződést befolyásoló fő homeotikus gének két génkomplexet alkotnak: az *Antennapedia*-komplex (ANT-C) a fejtől a középtorig, míg a *bithorax*-komplex (BX-C) a középtortól hátrafelé elhelyezkedő szelvények identitásának meghatározásáért felelős. A BX-C három homeotikus gént kódol. A három homeotikus gén a komplex hatása alatt álló kilenc szelvény identitását nagy kiterjedésű, bonyolult, szelvényt-specifikus *cisz*-regulátor elemek segítségével képes meghatározni. Minden egyes szelvényben egy új, az adott szelvényre specifikus *cisz*-regulátor elem kapcsol be, és kerül nyílt kromatinkonformációba, ez teszi lehetővé, hogy vagy újabb homeotikus gén aktiválódjon, vagy az előző szelvényben is expresszáldó homeotikus gén szintje az újabb szelvényben megemelkedjen. A *cisz*-regulátorok szelvényt-specifikus aktivitási mintázata és az általuk beállított homeotikus génexpressziós mintázat az embrió fejlődésének korai szakaszában alakul ki, és az egyedfejlődés teljes időtartama alatt változatlan marad.

A homeotikus gének szelvényt specifikus expressziójának fenntartását szolgáló fehérjék kétféle módon hatnak. A *Polycomb*-csoportba (*Pc-G*) tartozó gének termékei az adott szelvényben nem aktiválódott *cis*-regulátorok inaktív (zárt kromatin-konformációjú) állapotának fenntartásáért felelősek, míg a *TRITHORAX*-csoportba (*TRX-G*) tartozó fehérjék az aktiválódott *cis*-regulátorok aktív (nyílt kromatin-konformációjú) állapotát tartják fenn.

A heterozigóta *Pc-G* mutánsokban a szelvények részlegesen transzformálódnak a vad állapotban hátrébb elhelyezkedő szelvényre jellemző morfológia irányába. Ezek a transzformációk több, *Polycomb*-csoportba tartozó génre nézve egyidejűleg mutáns egyedekben súlyosbodnak. Hasonlóképpen, a heterozigóta *trx-G* mutánsokban is a szelvények részleges transzformációja figyelhető meg, de itt - az előzőekkel ellentétben - anterior irányban, tehát a szelvények az eggyel előrébb elhelyezkedő szelvényre kezdenek hasonlítani. Ez esetben is jellemző az azonos (*trithorax*-) csoportba tartozó gének mutációinak szinergista hatása a vizsgált homeotikus fenotípusokra. Gyakran az antagonista csoportba tartozó mutációk a fenotípus szintjén szuppresszálják egymás hatását, ami arra utal, hogy az inaktiváló és aktiváló rendszer azonos szinten hat, és érzékeny egyensúlyban van egymással.

Az utóbbi években a homeotikus gének szabályozásában szerepet játszó faktorok általános génszabályozási szerepének felismerése ezt a kutatási területet az érdeklődés középpontjába állította. Kiderült, hogy egy adott szabályozó régió kromatin szerkezetének megváltozása aktiváció, illetve inaktiváció hatására egyáltalán nem csak a *Drosophila*-ra és a *BX-C*-re jellemző különleges jelenség. Éppen ellenkezőleg, valójában az aktív transzkripció, illetve gének kikapcsolódása („silencing”) általában szorosan összefügg a kromatinszerkezet megváltozásával.

Az aktív és inaktív promóterek és más transzkripciós regulátor szakaszok közti különbséget egyre jobban megismertük, azt azonban továbbra sem tudjuk, mi jelöli meg az embrionális fejlődés korai szakaszában az aktiválódott, illetve inaktív *cis*-regulátorokat, mi

teszi lehetővé a fenntartó POLYCOMB-TRITHORAX rendszer számára felismerésüket, minek alapján, mely fehérjék, hogyan ismerik fel az aktívan, illetve inaktívan tartandó regulátorokat.

A kromatinszerkezet kutatásának új fejezetét jelentette az a felismerés, hogy az alap kromatin struktúra elsődleges építőelemei, a nukleoszómák, illetve a nukleoszómákat alkotó hiszton fehérjék nemcsak egyszerűen „becsomagolják” a DNS-t, hanem bonyolult jelző szerepet is betöltenek. A „hiszton-kód” hipotézis szerint a nukleoszómákat alkotó (mag, vagy „core”) hisztonok N-terminális, illetve C-terminális „farki” régiói különböző kovalens poszt-transzlációs módosulásokon eshetnek át. Más kovalens módosítások vannak jelen a vizsgált gének promóterén, ha az adott gén aktív, mintha inaktív; specifikus hiszton modifikációk jellemzőek a heterokromatinra, vagy a muslicában kétszeres aktivitással működő hím X-kromoszómára. Megindult a kutatás egyrészt az olyan fehérjék után, amelyek képesek a hisztonok kovalens módosítására, tehát a kód létrehozására, másrészt azok után, amelyek képesek felismerni, „lefordítani” a hiszton kódot, és bizonyos hiszton módosulatokat specifikusan kötni, majd aktivációt vagy repressziót kiváltani.

Értekezésem a laborunkban izolált, és általunk *Trithorax-mimic*-nek (*Trm*) nevezett domináns, trithorax fenotípust mutató mutáns molekuláris, immunhisztokémiai, biokémiai és részletes genetikai analízisét tartalmazza.

A mutáns vizsgálata során először is azt kívántuk meghatározni, melyik az a gén, amelynek mutációja felelős a megjelenő domináns fenotípusért. A mutáció genetikai és molekuláris vizsgálatával kerestük a választ arra a kérdésre, hogy milyen szerepet tölt be az érintett gén az epigenetikus represszióban, és a mutáns génben milyen molekuláris változások, hogyan vezethettek a tapasztalt fenotípus kialakulásához.

Miután sikerült bebizonyítanunk, hogy az általunk vizsgált fenotípus az *Enhancer of zeste* génben bekövetkezett pontmutáció következménye, és alapvetően a túlműködő epigenetikus represszió okozza, megpróbáltuk azonosítani azokat a partner fehérjéket,

amelyek együttműködnek a mutáns fehérjével a represszió kialakításában. Miután bizonyítottuk, hogy a mutáns $E(Z)^{TRM}$ fehérje a vad $E(Z)$ fehérje ismert partnereit igényli az epigenetikus represszió kialakításához, és a mutáns fehérje tökéletesen alkalmas a normális repressziós feladat ellátására, kutatási célul tűztük ki, hogy megértsük, miért és hogyan okozhat a bekövetkezett $E(z)^{Trm}$ pontmutáció zavart az aktív és inaktív *cisz*-regulátorok felismerésében. Úgy gondoltuk, hogy a mutáns segítségével megválaszolhatjuk azt az igen fontos kérdést, hogy mi lehet az aktív és inaktív *cisz*-regulátorokat megkülönböztető molekuláris jel. Azonosítani kívántuk azokat a géneket is, amelyek fehérjetermékei szerepet játszanak ennek a molekuláris jelnek a létrehozásában, illetve eltávolításában.

Az $E(z)^{Trm}$ heterozigóta mutáns fenotípusa minden eddig használt módszernél érzékenyebben reagál az epigenetikus represszióban szerepet játszó fehérjék mennyiségének megváltozására. Ennek alapján létrehoztunk egy genetikai interakción alapuló mutánsizolálási rendszert. A kifejlesztett $E(z)^{Trm}$ interakciós rendszer segítségével próbáltunk olyan géneket azonosítani, amelyek az aktív kromatindomének megjelöléséhez szükséges eddig ismeretlen faktorokat kódolnak, illetve szabályozzák az $E(Z)$ -függő represszió kialakulását. Az általunk végzett genetikai interakciós vizsgálatok valószínűsítették, hogy a vad ENHANCER OF ZESTE fehérje képes a *cisz*-regulátorok aktív állapotát jelző valamely foszforilációs jel felismerésére, mely gátolja represszor funkcióját, míg a mutáns fehérje ezt a jelet nem képes tökéletesen felismerni. Célul tűztük ki, hogy biokémiai módszerekkel is megvizsgáljuk, képes-e az $E(Z)$ fehérje egyáltalán kötődni a hisztonok N-terminális farki részéhez, illetve különbözik-e a vad és mutáns $E(Z)$ fehérje affinitása különböző kovalens módosításokat hordozó N-terminális hiszton peptidek kötésében.

Biokémiaiilag kívántuk alátámasztani azt a genetikai kísérletek által sugallt megállapításunkat, hogy az $E(Z)$ fehérje az inaktivációban homo-dimerként (vagy multimerként) vesz részt.

Saját kísérleti eredményeink, illetve homológia vizsgálatok felvetették annak a lehetőségét, hogy az E(z) fehérje nemcsak bizonyos hiszton módosítások felismerésére, de esetleg ezek létrehozására is képes. Be kívántuk bizonyítani, hogy a *Drosophila* E(z) fehérje inaktiváló szerepe összefügg hiszton-metil-transzferáz aktivitásával, és az általunk vizsgált pontmutáció nem okoz funkcióvesztést a katalitikus aktivitás tekintetében.

Kíváncsiak voltunk arra, hogy különbözik-e a vad és a mutáns fehérje kötődésének erőssége különböző kovalens módosításokat hordozó hiszton H3 fehérjékhez, illetve hogyan befolyásolják a hiszton H3-on lévő kovalens módosítások a vad és mutáns E(z) fehérje által kiváltott metiláció létrejöttét.

Össze kívántuk hasonlítani az E(z)^{TRM} fehérje kötőhelyeit a *Drosophila* óriáskromoszómákon a vad E(z) fehérje kötőhelyeivel. Különböző hosszúságú, transzgenikus riportergén konstrukciókba épített régiók segítségével kívántuk pontosabban térképezni a mutáns fehérje támadáspontját az *iab-7* régióban elhelyezkedő Polycomb Reaktív Elemhez (PRE) képest.

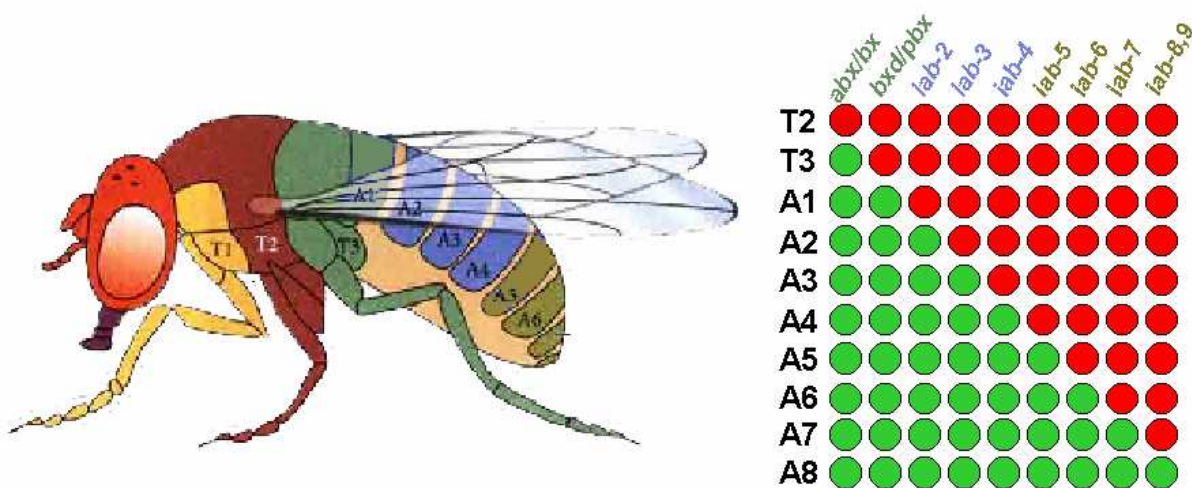
A genetikai interakción alapuló kísérleteink, mesterségesen termelt fehérjék biokémiai vizsgálata és más ismert, SET-domént tartalmazó fehérjék röntgenkristallográfiás szerkezetének ismerete alapján kívánjuk megmagyarázni milyen szerepet tölt be a vad E(z) fehérje az epigenetikus represszióban.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS ÉS TUDOMÁNYOS HÁTTÉR

2.1. A *DROSOPHILA MELANOGASTER BITHORAX*-KOMPLEXÉNEK MOLEKULÁRIS FELÉPÍTÉSE, ÉS MŰKÖDÉSÉNEK MODELLJE

2.1.1. Általános felépítés

A *bithorax*-komplex (BX-C) korai genetikai analízise arra utalt, hogy a régióban a komplex hatása alatt álló kilenc paraszegmentnek megfelelően (PS5-14) kilenc homeotikus szabályozó gén kódolódik (*abx/bx*, *bxd/pbx*, *iab-2*, *iab-3*, *iab-4*, *iab-5*, *iab-6*, *iab-7*, *iab-8*), amelyek mutációi homozigóta állapotban az embrionális szelvények specifikus homeotikus transzformációját okozzák (Lewis, 1978). E. Lewis pusztán genetikai módszerekkel, homeotikus mutánsok izolálásával, a homozigóta mutáns embriók kutikulájának vizsgálatával, illetve az izolált mutánsok rekombinációs térképezésével megállapította, hogy ezek a "gén" ugyanolyan sorrendben követik egymást a kromoszómán, mint ahogy az általuk szabályozott szelvények következnek egymás után a *Drosophila* hossz tengelye mentén (kolinearitás). Megalkotta modelljét (2.1. ábra), amely szerint az egyre hátrébb elhelyezkedő szelvényekben valamilyen faktor hatására újabb és újabb gének aktiválódnak (Lewis, 1978).

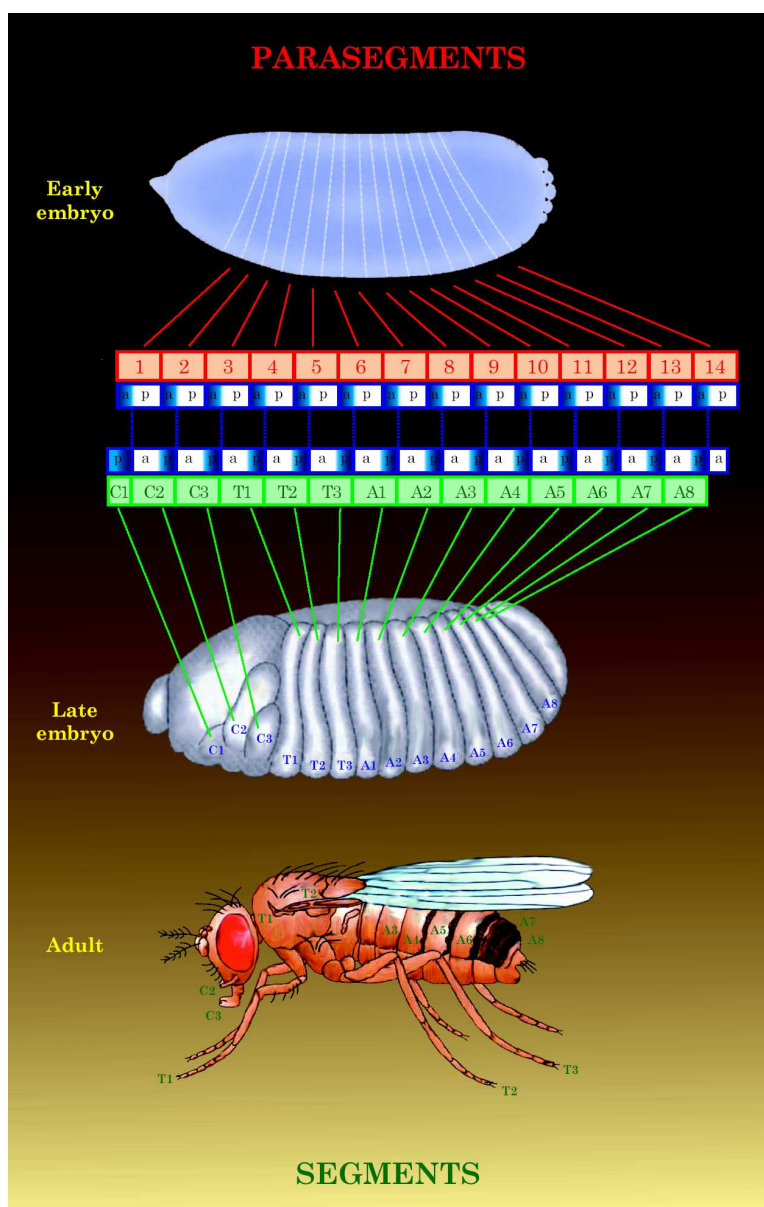


2.1. ábra. A *bithorax*-komplex működésének modellje

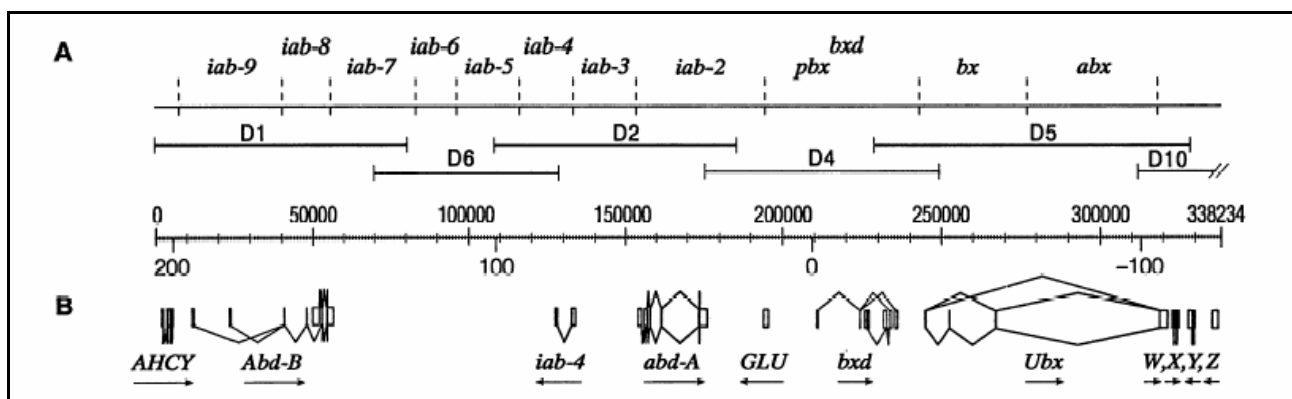
Az inaktív *cisz*-regulátorokat piros, az aktívakat zöld körök szimbolizálják. Az egyre hátrébb elhelyezkedő szelvényekben újabb és újabb *cisz*-regulátorok válnak aktívvá.

Bár későbbi kísérletekből kiderült, hogy a BX-C mutációk mindössze három letális komplementációs csoportot alkotnak (Sanchez-Herrero és mtsai, 1985; Tjong és mtsai, 1985), és a modell ennek megfelelően módosult, Lewis zseniális elképzelése mégis alapvetően helyesnek bizonyult. A három valódi homeotikus gén közül az *Ultrabithorax* a PS5-6 (pT2-aA1), az *abdominal-A* a PS7-9 (pA1-aA4), az *Abdominal-B* pedig a PS10-14 (pA4-aA9) identitásának meghatározásáért felelős. (A paraszegmentek és szelvények számozását a 2.2. ábra mutatja.) Ezen újabb ismeretek fényében a módosított modell szerint a komplex működését nagy kiterjedésű szelvényt specifikus szabályozó elemek biztosítják, minden szelvényben egy újabb ilyen *cis*-reguláló elem aktiválódik, és az aktív elemek állítják be az általuk szabályozott homeotikus gén kifejeződésének szelvény-specifikus szintjét.

2.2. ábra. Az embrionális paraszegmentek és a későbbi szegmentek elhelyezkedési viszonyai. Legfelül az embrionális paraszegmentek elhelyezkedése látható, ez alatt sematikus rajz jelzi a paraszegmentek és a valódi szegmentek elhelyezkedési viszonyait, amit a később létrejövő valódi embrionális szegmentek, illetve a felnőtt légy szegmentációjának rajza követ. (S. Barges nyomán)



A *bithorax*-komplex molekuláris megismerése bebizonyította a nagy kiterjedésű szabályozó elemek, és a megjósolt három homeotikus gén létezését (Kornfeld és mtsai, 1989; Karch és mtsai, 1990; DeLorenzi és mtsai, 1988; Celniker és mtsai, 1990; Zavortink és Sakonju, 1989). A BX-C teljes szekvenciája 1995-ben Martin és munkatársainak munkája nyomán vált ismertté (2.3. ábra **molekuláris** térkép). Meghatározták a BX-C-ben elhelyezkedő fehérjét kódoló gének és a komplex pontos határait. Megállapították, hogy a komplexnek mindössze 2%-a kódoló régió, míg a fennmaradó 98% regulátor szekvenciákat tartalmaz (GeneBank U31961). A komplex végein elhelyezkedő szabad olvasási keretek (Open Reading Frame: ORF) alapján a BX-C proximális (centromer közeli) határa a 322431 előtt (Martin és mtsai, 1995), míg disztális határa a 7535 bp után helyezkedik el, ezek szerint a komplexet egy 314896 bp hosszú szekvencia tartalmazza.



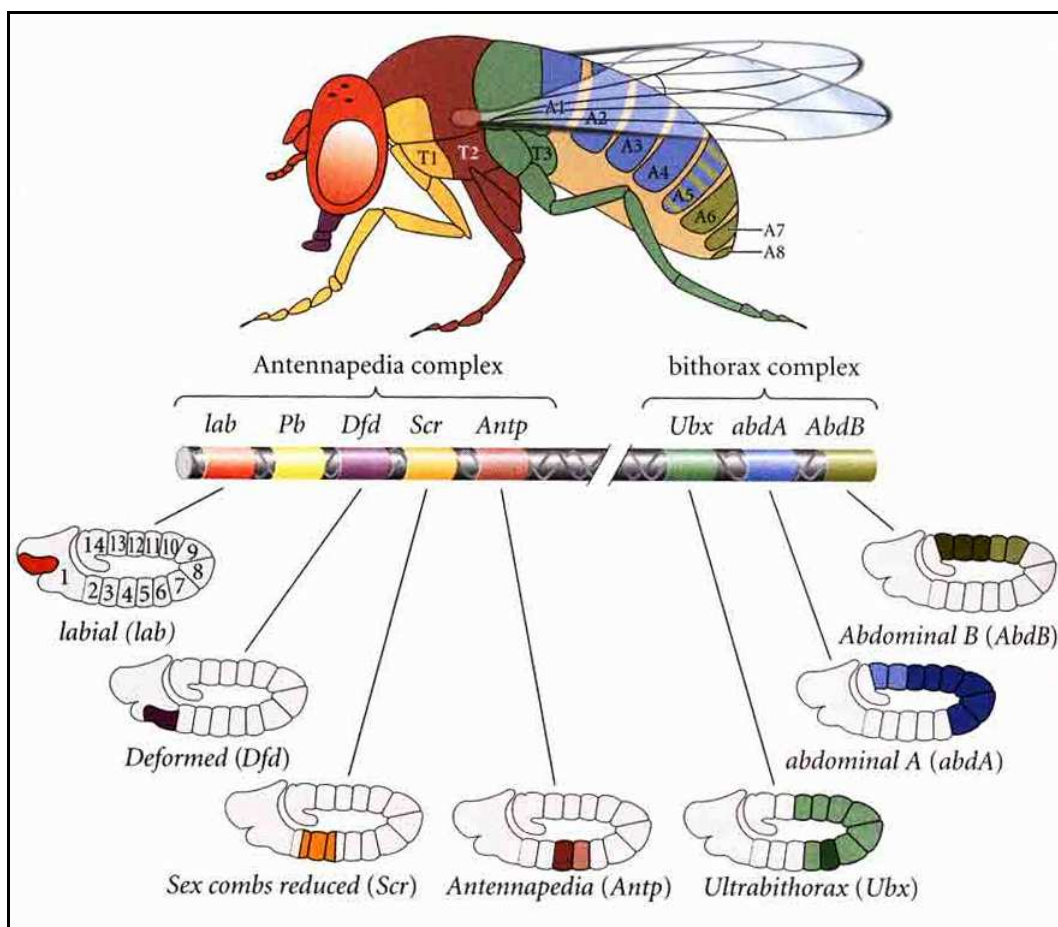
2.3. ábra. A *bithorax*-komplex molekuláris szerkezete

A térkép a *cisz*-regulátorok hozzávetőleges elhelyezkedését, és a kódoló homeotikus és egyéb géneket jelzi. A transzkripció irányára az adott gén alatti nyíl utal. (Martin és mtsai, 1995 alapján).

A homeotikus gének - részben átfedő - egymás utáni doménekből fejeződnek ki az állat anterior-poszterior testtengelye mentén. Az egyes homeotikus gének elhelyezkedése a kromoszómán molekulárisan is kolineárisnak bizonyult az általuk szabályozott szelvényekével (2.4. ábra).

A legegyszerűbb aktiválódó homeotikus gén, az *Ubx* teljes transzkripciós egysége 78.1 kb hosszú (242867-320921), amely öt különböző, alternatív splicing eredményeként keletkező,

de a homeodomént mindig tartalmazó fehérjét kódol. (O'Connor és mtsai, 1988; Kornfeld és mtsai, 1989). A fehérje az embrióban a PS5-től egészen a PS13-ig kifejeződik az ektodermában és a CNS-ben, a lárvában a T2 szárny és lábdiszkuszban, illetve a T3 lábdiszkuszban van jelen (White és Wilcox, 1984, 1985; Struhl és White, 1985; Beachy és mtsai, 1985). A funkcióvesztéses *Ubx* allélok heterozigóta formában a billér kismértékű, szárny irányába történő transzformációját okozzák.



2.4. ábra. A *Drosophila* ANT-C és BX-C gének kifejeződése az egyes embrionális és felnőtt szelvényekben, valamint a komplexek által kódolt homeotikus gének elhelyezkedése a kromoszómán
A könnyebb azonosítás érdekében minden homeotikus gént más-más szín jelöl, az egyes árnyalatok az adott gén kifejeződésének mértékét érzékeltetik. Az embrionális szelvényekben és a kifejlett állatban azonos szín azonos homeotikus génre utal (Wolpert, Principles of development nyomán).

Az *abd-A* transzkripciós egység hossza 22.4 kb (153391-175816) (Karch és mtsai, 1985). Az *abd-A* a komplex egyetlen nem haplo-insufficiens génje, funkcióvesztéses

mutációi teljes mértékben recesszívek. A PS7-13-ban fejeződik ki (Busturia és mtsai, 1989; Macias és mtsai, 1990).

Az *Abd-B*-ről négy transzkriptum képződik (DeLorenzi és mtsai, 1988; Kuziora és McGinnis, 1988a; Celniker és mtsai, 1989; Zavortink és Sakonju, 1989), amely két különböző funkciójú proteint („m”, és „r”) kódol (Celniker és mtsai, 1990; Boulet és mtsai, 1991). A transzkripció egység hossza 44.6 kb (11204-55760). Az *Abd-B* gén az embrió 10-15 paraszegmentumaiban fejeződik ki (Harding és mtsai, 1985; Hoey és mtsai, 1986; Harding és Levine, 1988; Kuziora és McGinnis, 1988a; Zavortink és Sakonju, 1989; Boulet és mtsai 1991), mégpedig az egyre hátrébb elhelyezkedő szelvényekben egyre magasabb szinten. Az *Abd-B* gén haplo-insufficiens, a heterozigóta mutáns hímekben a normálisan teljesen sötét 5. szelvény világos foltos (A4-szerű), az A6 sterniten szőrök találhatók (A5-szerű), míg a normálisan tergitlemezt nem képző A7-en A6-szerű, igen keskeny tergitlemez jelenik meg.

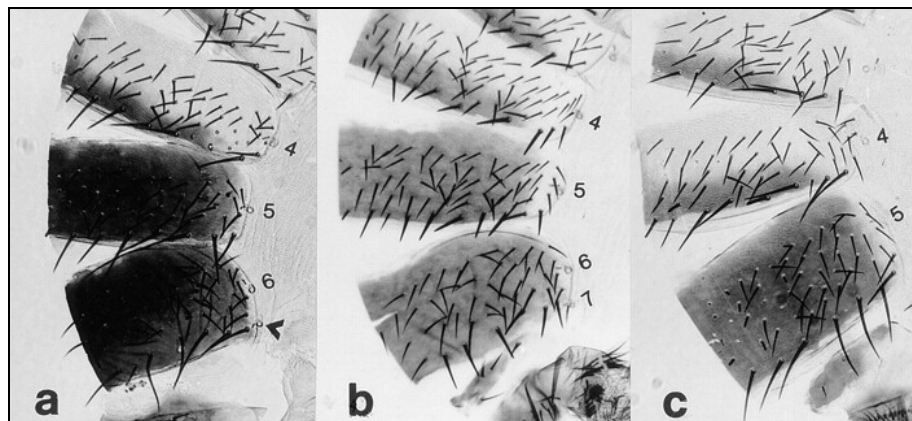
A korai embrióban a *cisz*-regulátor elemek is átíródnak. Megállapították, hogy a 14. osztódási ciklus elejétől kimutathatóak az *abd-A* és az *Abd-B* gén *cisz*-regulátorainak megfelelő DNS szakaszokról származó transzkriptumok (Sánchez-Herrero és Akam, 1989; Casares és Sánchez-Herrero, 1995). A képződő RNS-ek nem jelölnek ki jól elhatárolódó transzkripció egységeket, viszont megállapítható, hogy a teljes szabályozó régió átíródik valamilyen mértékben, mindkét szálról történik transzkripció, és a transzkriptumok átíródásának anterior határa mindig jellegzetes. Az *iab* régiókról íródó transzkriptumoknak semmilyen kódoló, vagy szabályozó szerepét nem sikerült azonosítani, általános vélemény szerint a BX-C aktiválódásának „melléktermékei”. Az *iab* régiók transzkripciója megelőzi a homeotikus génekét, és meghatározott *gap*-gének represszálo hatása alatt áll (Casares és Sánchez-Herrero, 1995). Bár az *iab* régiók transzkripciója nem mindig esik egybe a későbbi szegmenthatárokkal, de kolineáris az érintett *cisz*-regulátorok aktiválódásával és az embriógenézis teljes időszaka alatt megmarad.

2.1.2. A BX-C korai kifejeződési mintázatának kialakulása

A *bithorax*-komplex megfelelő működését a *cisz*-regulátor elemek teszik lehetővé. A *cisz*-regulátor elemek olyan szelvényt specifikus, komplex regulátor régiók, amelyek tartalmazzák mindazt az információt, ami a szabályozott homeotikus gének helyes kifejeződési mintázatának korai kialakításához (iniciáció) és fenntartásához szükséges.

Az egyes *cisz*-regulátorok normális körülmények között specifikusan egy adott homeotikus gént szabályoznak. Az *abx/bx* (PS5) és a *bxd/pbx* (PS6) az *Ubx*-et (White és Wilcox, 1984), az *iab-2* (PS7), *iab-3* (PS8) és *iab-4* (PS9) az *abd-A*-t (Karch és mtsai, 1990), míg az *iab-5* (PS10), *iab-6* (PS11), *iab-7* (PS12), *iab-8* (PS13) régiók az *Abd-B*-t szabályozzák a zárójelben megadott paraszegmentekben (Celniker és mtsai, 1989; Sanchez-Herrero, 1991). Az előzőekből jól látszik, hogy a kolinearitás nemcsak a homeotikus gének expressziójának, de a *cisz*-regulátorok aktiválódásának a szintjén is érvényesül (Duncan 1987).

A *cisz*-regulátorok funkcióvesztéses mutánsaiban csak a hibás *cisz*-regulátor által szabályozott szelvény érintett, a többi szelvény morfológiája változatlan marad. A módosított Lewis-modellnek megfelelően az érintett *cisz*-regulátor által szabályozott szelvényben az utolsó ép és aktív *cisz*-regulátor szabályoz, tehát az érintett szelvény a nála eggyel előrébb elhelyezkedő szelvénné transzformálódik. A csak az *iab-7* *cisz*-regulátort kiejtő *iab-7^{Sz}* mutáció (Sipos és mtsai, 1998) például homozigóta formában az *Abd-B* gén PS12-re jellemző, viszonylag magas expressziójának elvesztését, és a PS12-ben is a PS11-nek megfelelő *Abd-B* kifejeződést okoz. Ez a kifejlett hím állatban a tergitlemezt nem képző, hetedik szelvény hatodikká való transzformálódását, egy „plusz” szelvény megjelenését okozza (2.5. ábra b.). Azonban amíg egy újabb hatodik szelvény jelenik meg a hetedik helyén, az előrébb, illetve hátrébb elhelyezkedő, *Abd-B* által szabályozott szelvények morfológiája nem változik (Galloni és mtsai, 1993).



2.5. ábra. *Drosophila* hím abdominális tergitek

a.) Vad hímekben az 5. és a 6. tergitlemez egyforma vastagságú és sötét, míg a 7. szelvényhez tartozó tergitlemez eltűnik, a szelvény maradványa egy addicionális 7. tracheanyílás a 6. tergitlemez mellett (nyílhegy a.). b.) Az *Abd-B* expressziót beállító *cisz*-regulátor heterozigóta, funkcióvesztést okozó mutációja esetében (*iab-7^{Sz}*) a 7. szelvénynek megfelelő helyen kisméretű 7. tergitlemez jelenik meg. c.) Funkciónyeréses, az *iab-6* és *iab-7* *cisz*-regulátort érintő mutáció esetében (*Fab-7^l*), már az egyvel előrébb elhelyezkedő szelvényben aktiválódik az *iab-7* és ennek következményeképpen a 6. tergitlemez mérete redukálódik. (Sipos és mtsai, 1998 nyomán).

A *cisz*-regulátorok funkciónyeréses mutánsait is sikerült izolálni. Az ilyen mutációk ellentétes irányban változtatják meg a szelvényidentitást, egy adott szelvény a normálisan egyvel hátrébb lévő szelvénné transzformálódik. A *Fab-7^l* mutáció például homozigóta formában a hatodik szelvény hetedikké transzformálódását („eltűnését”) okozza, heterozigóta állapotban pedig a 7. szelvény méretének csökkenéséhez (2.5. ábra c.) vezet (Gyurkovics és mtsai, 1990). A *Lewis*-modellnek megfelelően ezekben az esetekben azt várjuk, hogy a jelenség oka az érintett *cisz*-regulátor (*iab-7*) egyvel előrébb elhelyezkedő szelvényben történő aktivációja, és ennek következtében az *Abd-B* gén PS12-re jellemző kifejeződésének a PS11-ben való megjelenése. Ezt a feltételezést a kísérleti adatok is alátámasztották (Galloni és mtsai, 1993).

2.1.3. A BX-C *cisz*-regulátorainak korai működése és felépítése

A *gap*-, és *pair-rule* gének szabályozó hatása felelős a *cisz*-regulátorok aktiválódásának és repressziójának korai kialakításáért (Casares és Sánchez-Herrero, 1995), de ezek a faktorok csak az embrió fejlődésének korai szakaszában hatnak. A fejlődés későbbi szakaszában kifejeződésük megszűnik, fehérje termékeik pedig rendkívül gyorsan lebomlanak, az iniciátor gradiensek eltűnnek (Gaul és mtsai, 1987; Tautz, 1988). A *cisz*-

regulátorok aktivitási mintázata, és vele együtt a homeotikus gének szegment specifikus expressziója viszont normális körülmények között az egyedfejlődés folyamán végig megmarad.

A *cisz*-regulátorok egyik funkciója a korai GAP-, és PAIR-RULE transzkripció szabályozó fehérjék kifejeződési mintázatának homeotikus génaktiválási mintázattá való leképezése (iniciációs működés). A *cisz*-regulátorok inaktívak az általuk szabályozott paraszegment előtti testszelvényekben, és itt később sem aktiválódnak. A korai aktiválódás után, aktívnak maradnak minden hátrébb elhelyezkedő szelvényben. Aktivitási mintázatukat sejtszétválásról sejtszétválásra fenntartják az egyedfejlődés teljes időtartama alatt (fenntartó működés). A *cisz*-regulátorok képesek arra, hogy hibátlanul felismerjék és kiválasszák az általuk specifikusan szabályozott homeotikus gén promóterét. Más homeotikus génekre a komplexen belül nem hatnak. A *cisz*-regulátorok autonóm módon működnek, azaz az egyes szelvényekben aktív, vagy inaktív *cisz*-regulátorok állapota nem befolyásolja a szomszédos *cisz*-regulátorokat.

Ezekért a sajátos feladatokért felelős *cisz* szekvencia elemek, az iniciátorok, a fenntartó elemek, a promóter kihorgonyzó régiók és határoló szekvenciák (boundary régiók) feltérképezése, illetve az ezekre ható *transz* faktorok azonosítása és működésük jellemzése már több *cisz*-regulátor esetében (*iab-2*, *iab-7*) sikerült.

A *cisz*-regulátor elemek építőköveinek azonosítását transzgenikus riportergén rendszerekben, illetve a BX-C-t érintő mutációk finomanalízisének segítségével végezték el. Enhanszer csapdázó transzpozonok beépítésével bizonyították, hogy az egyes *cisz*-regulátorokba beépült transzgének kifejeződését kizárólag az érintett *cisz*-regulátor egység szabályozza, míg a szomszédos régiók nem gyakorolnak rájuk hatást, azoktól valamilyen módon el vannak szigetelve (McCall és mtsai, 1994).

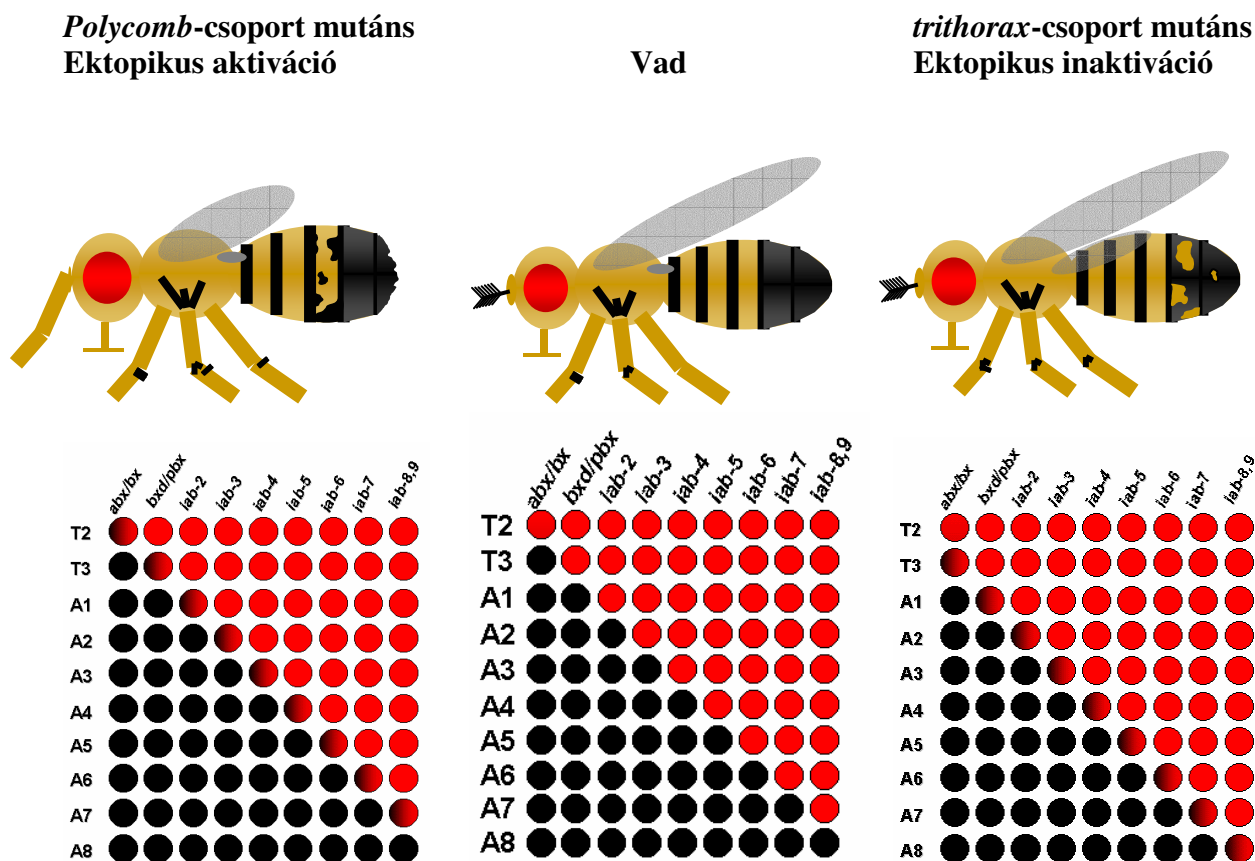
Transzgenikus *lac-Z* riportergén rendszerben sikerült az *iab-2* *cisz*-regulátor egy olyan, 1.7 kb hosszúságú szakaszát elkülöníteni, amely a normális *abd-A* expresszióhoz hasonló riportergén mintázatot hoz létre. Az *iab-2* esetében bizonyították azt is, hogy az *even-skipped* (*eve*) *pair-rule* gén a pozitív *transz*-regulátor.

Az *Ubx* kifejeződésének aktivátora a FUSHI TARAZU (*FTZ*) (Müller és Bienz, 1992), a kifejeződés anterior határvonalát pedig a HUNCHBACK (HB) fehérje állítja be (White és Lehmann, 1986; Irish és mtsai, 1989; Qian és mtsai, 1991), amely nagy koncentrációban represszorként hat az *abx/bx* régióban található kötőhelyein keresztül (Simon és mtsai, 1990; Zang és Bienz, 1992; Quian és mtsai, 1993). Az *iab-2* repressziójában pedig kritikus szerepet tölt be egy KRÜPPEL (*KR*) kötőhely, amelynek elrontása a *Hyperabdominal* pontmutásokban már a PS5-ben ektopikus *abd-A* expressziót, és a tor abdominális irányú transzformációját okozza (Lewis, 1978; Shimell és mtsai, 1994).

Az *iab-5* régiónak megfelelő DNS szakasz transzgenikus rendszerben történő vizsgálata egy 0,9 kb hosszú fragment azonosításához vezetett, amely csak a PS10-ben kapcsolódik be, az előrébb lévő paraszegmentekben inaktív, azonban hátrébb aktív marad a PS11, PS12 és PS13-ben (Busturia és Bienz, 1993). Bebizonyították, hogy az elülső represszióért főként a KR felelős, bár a KNIRPS (*KNI*) is gyenge represszorként viselkedik. Kiderült, hogy a késői poszterior *Hb* expresszió felelős az iniciátor fragment PS14 specifikus repressziójáért.

2.1.4. A BX-C kifejeződési mintázatának fenntartása

A homeotikus transzformációkat mutató mutások további analízise két új, a BX-C-n kívülre térképeződő mutánsosztály felfedezéséhez vezetett. Ezekben a mutásokban a *bithorax*-komplex homeotikus génjeinek korai kifejeződési mintázata megfelelően kialakul, az embrionális fejlődés további szakaszában azonban a helyesen beállított kifejeződés nem marad fenn (2.6. ábra).



2.6. ábra. A *Drosophila* homeotikus gének *cis*-regulátorait érintő ektopikus aktiváció és inaktiváció *Polycomb* és *trithorax*-típusú mutánsokban

Polycomb-típusú mutációk jelenlétében a korai állapotban megfelelően inaktiválódott *cis*-regulátorok a fejlődés későbbi szakaszában ektopikusan aktiválódnak. Ennek következményeképpen a *Scr* gén szintjének megnövekedése a második és harmadik lábdiszusban ektopikus szex fésűk fejlődéséhez vezet, ezért nevezik ezeket a mutánsokat *Polycomb*-típusúaknak. A *cis*-regulátor aktivációnak megfelelő homeotikus génexpresszió változások a BX-C által regulált szelvényekben poszterior irányú homeotikus transzformációkhoz vezetnek (csápok lábszerűek lesznek, szárnyak Cbx fenotípust mutatnak, redukálódnak, a hímek negyedik tergite sötét színű klónokat tartalmaz, az ötödik tergite hasonló, a hatodik tergitlemez redukálódik, a hetedikre jellemző állapot irányába transzformálódik). *trithorax*-típusú mutánsokban az előzőekkel ellentétes irányú változásokat tapasztalhatunk. A korai állapotban helyesen aktiválódott *cis*-regulátorok ektopikusan inaktiválódnak. A *cis*-regulátor inaktivációnak megfelelően lecsökkenő homeotikus génexpresszió anterior irányú homeotikus transzformációkhoz vezet (a billér megnövekszik, szárnyyszerűvé válik, a harmadik lábon a második lábra jellemző apikális szőrök jelennek meg, hímekben az ötödik tergitlemez a negyedikhez válik hasonlóvá).

A mutánsok elsőként leírt osztályában a fejlődés előrehaladtával a homeotikus gének mindegyike minden szelvényben aktiválódott (*Polycomb*-csoport), a másik mutáncsoportban pedig részlegesen, vagy teljesen inaktiválódott (*trithorax*-csoport). Mindezek alapján a PC-G fehérjék a BX-C *cis*-regulátorainak inaktív állapotát tartják fenn, míg a TRX-G fehérjék az aktív állapot fenntartásáért felelősek. A homeotikus gének aktív illetve inaktív állapotának fenntartása egymással érzékeny egyensúlyban áll.

2.2. A CISZ-REGULÁTOROK INAKTÍV ÁLLAPOTÁNAK FENNTARTÁSA

2.2.1. A *Polycomb*-csoportba tartozó gének azonosítása muslicában

Azonosítottak olyan mutánsokat, melyekben a T2-A8 szelvények az embrióban egyöntetűen az A8-ra hasonlítottak (Lewis, 1978; Wu és mtsai, 1989). Ez a fenotípus a *cisz*-regulátorok kiterjedő ektopikus aktivációjával magyarázható, amit az *Abd-B* génnek a fejlődés előrehaladtával párhuzamosan egyre előrébb terjedő magas szintű kifejeződése jelez (Simon és mtsai, 1992). Heterozigóta állapotban az ilyen típusú mutációk nemcsak egy adott szelvényben, vagy egy adott homeotikus gén által szabályozott testtájon okoztak fenotípust, mint az addig megismert, a homeotikus gén-komplexekbe térképeződő mutációk, hanem több szelvény részleges, poszterior irányú transzformációját eredményezték. A csápok lábszerűek (Puro és Nygren, 1975), a szárny részleges, billér irányú transzformációt mutat, a normálisan világos A4 tergiten sötét klónok láthatók, az A6 tergite mérete csökken (2.6. ábra). Az elsőként azonosított ilyen mutáns, a *Polycomb* (*Pc*) analízise Lewist 1978-ban arra a következtetésre vezette, hogy a kódolt fehérje a homeotikus gének represszora. A későbbiekben kiderült, hogy a *Pc* fehérjének valójában a *cisz*-regulátorok inaktív állapotának fenntartásában van szerepe. Ezért vezet a *Pc*-funkció teljes elvesztése - a korai szabályozó faktorok eltűnése után - a homeotikus fenotípus szintjén funkciónyeréshez, hiszen epigenetikus represszió hiányában a *cisz*-regulátorok minden szelvényben aktívvá válnak, ezért mindenütt a normális A8 szelvényéhez hasonló homeotikus génaktivitási mintázat jön létre. Heterozigóta mutánsokban a *cisz*-regulátorok részleges aktiválódásának következménye a homeotikus gének egy, vagy néhány szelvénnel előrébb való kifejeződése, és az ennek megfelelő általános poszterior irányú homeotikus fenotípusok megjelenése (Denell és Frederick, 1983).

A továbbiakban számos más, a komplexen kívül térképeződő, a *Polycomb*-csoportba (*Pc-G*) tartozó mutációt azonosítottak. Megállapították, hogy hasonló homeotikus transzformációkat mutatnak (Jones és Gelbart, 1990; McKeon és mtsai, 1994; Struhl és

Akkam, 1985; Simon és mtsai, 1992), amelyek több *Pc*-G mutáció együttes jelenléte esetében általában súlyosbodnak (Jürgens, 1985; Cheng és mtsai, 1994; Campbell és mtsai, 1995; Kehle és mtsai, 1998). Bizonyos *Pc*-G mutánsoknak nincs saját homeotikus fenotípusa, de ezek is erősítik más *Pc*-G mutánsok hatását (Soto és mtsai, 1995).

A *Polycomb*-csoportba tartozó gének

<i>Pc</i> -G gén neve	rövidítése	helye	allélok száma
<i>Additional sex combs</i>	<i>Asx</i>	51A5-6	27
<i>corto</i>	<i>corto</i>	82E7-8	18
<i>cramped</i>	<i>crm</i>	3B4-5	29
<i>Enhancer of Polycomb</i>	<i>E(Pc)</i>	47F13-14	8
<i>Enhancer of zeste</i>	<i>E(z)</i>	67E5	89
<i>extra sex combs</i>	<i>esc</i>	33A2	48
<i>multi sex combs</i>	<i>mxc</i>	8D10	11
<i>pleiohomeotic</i>	<i>pho</i>	102D6	8
<i>Polycomb</i>	<i>Pc</i>	78C6-7	74
<i>Polycomblike</i>	<i>Pcl</i>	55B8	31
<i>polyhomeotic distal</i>	<i>ph-d</i>	2D2	51
<i>polyhomeotic proximal</i>	<i>ph-p</i>	2D2	51
<i>Posterior sex combs</i>	<i>Psc</i>	49E6	31
<i>Rpd3</i>	<i>Rpd3</i>	64B13	14
<i>Sex combs extra</i>	<i>Sce</i>	-	4
<i>Sex combs on midleg</i>	<i>Scm</i>	85E2	26
<i>super sex combs</i>	<i>sxc</i>	41C1-2	6
<i>Suppressor of zeste 2</i>	<i>Su(z)2</i>	49E7	41
<i>Suppressor of zeste 2 distal</i>	<i>Su(z)2D</i>	49E7	
<i>Suppressor of zeste 12</i>	<i>Su(z)12</i>	74D	6

2.1. táblázat Az ismert *Polycomb*-csoportba tartozó gének neve, rövidítése, helye és az ismert mutáns allélok száma

A *PC*-G fehérjék a homeotikus gének regulációján kívül számos más gén esetében is az inaktív állapotot fenntartó szerepet töltenek be. Ilyen gének az *engrailed* (Moazed és O'Farrel, 1992), a *kni* és a *gi* (Pelegri és Lehmann, 1994), és más szegmentációs gének (McKeon és mtsai, 1994) is. Emellett az egyik csoporttag, a *polyhomeotic* (*ph*) saját maga is bizonyítottan a *PC*-G által szabályozott (Fauvarque és Dura, 1993). A *Polycomb*-csoportba tartozó gének

számát *Drosophilában* 30-40-re becsülték (Jürgens, 1985), máig körülbelül ennek a felét azonosították.

2.2.2. A *Drosophila Polycomb*-csoportba tartozó génjeinek homológjai

A *Polycomb*-géncsoport általános transzkripció represszor szerepe nemcsak a *Drosophilában* bizonyított. A PC-G fehérjék homológjai emlősök (Müller és mtsai, 1995; Faust és mtsai, 1998; Tomotsune és mtsai, 1999; Akasaka és mtsai, 2001), sőt növények (Goodrich és mtsai, 1997; Yoshida és mtsai, 2001) esetében is a homeotikus gének hasonló epigenetikus repressziójáért felelősek. Emlősök esetében sem csak a homeotikus gének kifejeződését szabályozzák POLYCOMB fehérjék. Bizonyos emlős PC-G homológok onkogénként viselkednek a vérképző sejtekben, mert mutációjuk valószínűleg a sejtosztódás és az epigenetikus determináció súlyos zavaraihoz vezet (Gould, 1997; Schumacher és Magnuson, 1997; Van Lohuizen, 1998 és 1999). A homológok szerepe minden esetben az, hogy sejtosztódásról sejtosztódásra fenntartják az általuk szabályozott géneknek a determináció folyamán kialakult represszált állapotát (Paro, 1993; Pirrotta, 1995; Simon, 1995; Pirrotta, 1997). Az inaktiváló funkció annyira konzervált, hogy az ép egér POLYCOMB homológ *muslicába* juttatva képes a *Drosophila Pc* homozigóta mutáns menekítésére (Müller és mtsai, 1995), ugyanez igaz a PHO emlős homológjára, a YY1-ra is (Atchison és mtsai, 2003).

2.2.3. A Polycomb-csoport génjeinek és fehérjéinek kölcsönhatásai

Több megfigyelés támasztja alá, hogy a *Polycomb*-csoport génjei (2.1. táblázat) a represszióban egymással együttműködő fehérjetermékeket kódolnak. Több *Polycomb* gén mutat egymással domináns genetikai interakciót. Mutációik általában erősítik egymás homeotikus fenotípusát az imágóban (Jürgens, 1985; Campbell és mtsai, 1995; Chang, 2001), a *polyhomeotic (ph)* mutáns változata pedig számos más *Pc-G* génnel egyenesen szintetikus letalitást, és erős korai poszterior fenotípust okoz (Cheng és mtsai, 1994). Ugyanakkor a *ph*

haplo-insufficiens fenotípusa menekíthető egy másik *Pc*-G gén (a *Pcl*) kópiaszámának emelésével (Cheng és mtsai, 1994).

Transzgenikus, GAL-4 kötőhelyet (UAS) tartalmazó riportergén konstrukciókon a *hb* promóter által vezérelt PCGAL-4 hibridprotein önmagában is képes az inaktiváló komplexnek más, endogén PC-G fehérjék együttműködésével való megszervezésére (Müller, 1995). Azt is kimutatták, hogy az így létrejött represszor komplex néhány *bxd* DNS-t tartalmazó konstrukton annyira stabil, hogy egyszeri hősokk pulzus időtartama alatt előállított PCGAL-4 mennyiség is elegendő a létrehozására és fenntartására a teljes embriógenézis folyamán.

A PC-G fehérjék valamennyien sejtmagi lokalizációt mutatnak. További immunocitológiai vizsgálatok feltárták, hogy az egyes PC-G fehérjék az óriáskromoszómákon általában 50-100 helyre kötődnek. A *PC*, *PCL* és *PH* kötőhelyek teljesen megegyeznek, és a *PSC* és az *RPD3* helyekkel is erősen átfednek (Zink és Paro, 1989; DeCamillis és mtsai, 1992; Franke és mtsai, 1992; Martin és Adler, 1993; Rastelli és mtsai, 1993; Lonie és mtsai, 1994; Chang és mtsai, 2001). Sok egybeesés van az előbb említett fehérjék kötőhelyei és a kizárólag azonos helyeken együtt kimutatható *E(z)* és *ESC* (Carrington és Jones, 1996; Tie és mtsai, 1998), valamint az *SCM*, *ASX* és *E(PC)* (Peterson és mtsai, 1997; Sinclair és mtsai, 1998; Stankunas és mtsai, 1998) kötőhelyek között is. Bizonyos esetekben az egyik PC-G fehérje jelenléte feltétele a másik kötődésének. Így például a hőmérséklet érzékeny $E(z)^{S2}$ allélt homozigóta formában tartalmazó 3. stádiumú lárvákat a restriktív hőmérsékleten növesztve az *E(z)* helyek mellett a *PSC* kötőhelyek döntő többsége is eltűnik az óriáskromoszómákról (Rastelli és mtsai, 1993).

2.2.4. A POLYCOMB-csoport fehérjéit tartalmazó komplexek izolálása

Immunoprecipitációs kísérletekkel már több mint egy évtizede bizonyították, hogy a *PC* és a *PH* egy nagy molekulásúlyú (2-3MDa) komplexben található (Franke és mtsai, 1992). A továbbiakban élesztő kettős hibrid rendszerrel és immunoprecipitációval több PC-G fehérje

egymáshoz való kötődését tárták fel *Drosophilában*. Bizonyították, hogy a PH és az SCM (Peterson és mtsai, 1997), a PSC, a PC és a PH (Kyba és Brock, 1998), az E(Z) és az ESC (Jones és mtsai, 1998; Tie és mtsai, 1998), az E(Z) és a PCL (O'Connel és mtsai, 2001), a PC és a HDAC1 (Chang és mtsai, 2001) képes interakcióba lépni egymással *in vitro* és *in vivo* egyaránt. Az egyes *Pc-G* gének pleiotróp fenotípusai azonban kisebb-nagyobb mértékben eltérnek egymástól, és bár az óriáskromoszómán a különböző *PC-G* tagok kötőhelyei részben átfednek, találunk olyan helyeket, amelyen csak egy, vagy néhány POLYCOMB fehérje köt. Ezek a megfigyelések arra utaltak, hogy nem egyetlen nagy molsúlyú represszor komplex felelős minden esetben a célgén inaktiválásáért. A biokémiai vizsgálatok alátámasztották független, és változó összetételű represszor komplexek létezését *Drosophilában*.

Először két különböző POLYCOMB-komplex biokémiai tisztítása sikerült, majd a komponenseket is részben vagy egészben meghatározták: a Polycomb Related Complex 1 (PRC1) tartalmazza a PC, PH, PSC és SCM fehérjéket (Kingston és mtsai, 1996; Shao és mtsai, 1999; Saurin és mtsai, 2001); a másik komplex Polycomb Related Complex 2 (PRC2) pedig az ESC, E(Z), PCL fehérjéket (Ng és mtsai, 2000; Tie és mtsai, 2001; O'Connel és mtsai, 2001). Előbb sikerrel járt a PRC1 komplex *in vitro* rekonstitúciója (Francis és mtsai, 2001), majd biokémiai vizsgálatok bizonyították a rekombináns PRC1-komplex represszor szerepét *in vitro* transzkripció rendszerben is (King és mtsai, 2002). Eközben emlősökben és *Xenopus*ban is kimutatták a *Drosophilában* megismert *PC-G* homológok közti interakciókat, illetve különböző analóg összetételű komplexeket is sikerült tisztítani (Alkema és mtsai, 1997; Gunster és mtsai, 1997; Levine és mtsai, 2002; Showell és Cunliffe, 2002).

2.2.5. Az inaktív állapot fenntartását mediáló DNS szakaszok

Eddig három *PC-G* fehérjéről közölték, hogy saját DNS-kötő képességgel rendelkeznek: ezek a PLEIOHOMEOTIC (PHO) (Brown és mtsai, 1998), illetve a PHO-LIKE (PHOL) (Brown és mtsai, 2002), valamint a PIPSQUEAK (PSQ) (Huang és mtsai, 2002).

Laboratóriumunkban sikerült bizonyítani egy negyedik Pc-jellegű fenotípust mutató gén a *grainy head* (*grh*) termékéről is, hogy specifikus DNS-kötő képességgel rendelkezik (Blastyák András közöletlen). Habár ezeket a fehérjéket nem találták meg az izolált PC-komplexekben, mégis valószínűsíthető, hogy felelősek a komplexek kihorgonyozódásáért. Az utóbbi időben két, eredetileg a TRX-csoportba sorolt fehérjéről, a TRTHORAX-LIKE (*TRL*) GAGA-faktorról (Farkas és mtsai, 1994) és a ZESTE-ről (*Z*) (Saurin és mtsai, 2001) is feltételezik, hogy szerepet játszik a PC-komplexek DNS-hez kapcsolásában (Horard és mtsai, 2000).

A represszor fehérjék egymással való kapcsolatának, és a különböző POLYCOMB represszor komplexeknek a megismerésével párhuzamosan zajlott a fenntartó működést lehetővé tévő *cisz*-hatású szekvenciaelemek, a PRE-k (Polycomb Reaktív Elemek, vagy eredeti angol nevükön Polycomb Response Element-ek, Simon és mtsai, 1993) azonosítása. Ezen elemek megismerése is több úton zajlott. Először olyan kisméretű *cisz*-regulátor szekvenciákat kerestek *lac-Z* riportergént tartalmazó transzgenikus konstrukciók felhasználásával, amelyek a riportergén korai embrionális enhanszerek által kialakított szegment specifikus aktivitási mintázatát POLYCOMB-függő módon képesek voltak fenntartani (Simon és mtsai, 1990; Müller és Bienz, 1991; Zang és Bienz, 1992; Busturia és Bienz, 1993; Simon és mtsai, 1993; Chan és mtsai, 1994). Bebizonyították, hogy a PRE tartalmú transzgének tetszőleges helyre történő inszerciója képes ektopikus PC-G kötőhelyet létrehozni az óriáskromoszómán (Zink és mtsai, 1991; Chan és mtsai, 1994; Chiang és mtsai, 1995; Zink és Paro, 1995). Az is kiderült, hogy a PRE tartalmú transzgének represszálódnak, ha nem tartalmaznak korai embrionális enhanszereket. Ez a represszió párosodás-függő, és POLYCOMB-érzékeny. Ha PRE-t és *miniwhite* riportergént tartalmazó, narancs szemszínt okozó transzgén beépüléseket vizsgálunk, ezek párosodott állapotban (homozigóta formában) sokszor teljesen represszálódnak, amit a transzgénre homozigóta állatok fehér szemszíne

jelez. A homozigóták világos szemszíne azonban *Pc* mutáns háttérben sötétebbé válik (Fauvarque és Dura, 1993; Chan és mtsai, 1994; Ginhard és Kaufman, 1995; Hagström és mtsai, 1997). A kialakuló represszió messzire terjed, még 6 kb távolságból is képes a PRE a vizsgált promotert inaktiválni (Chan és mtsai, 1994).

A PRE-t tartalmazó transzgéneknek egy másik érdekes tulajdonságára is fény derült: ezeket a szekvenciákat tartalmazó P-elem konstrukciók embrióba injektálva hajlamosak kromoszómális PRE-k szomszédságába beépülni („homing”: Fauvarque és Dura, 1993; Kassis, 1994; Chan és mtsai, 1994; Bender és Hudson, 2000). Az izolált PRE szakaszok tulajdonságai tehát sok szempontból megfelelnek azoknak az elképzeléseknek, melyek szerint ezek a szekvenciák több fehérjéből álló, kooperatívan működő represszor komplexek kialakulásának kiindulópontjai lehetnek.

Az eddig jellemzett PRE szakaszok néhány száz bázispár hosszúságúak, és szerkezetük meglehetősen változatos. Sikerült azonban azonosítani bennük egy konzervált szekvencia elemet (Mihály és mtsai, 1997), amelyről bebizonyosodott, hogy a bizonyítottan DNS-kötő PC-G tag, a PHO kötőhelyének felel meg. Azok a kísérletek, amelyek a minimális PRE-k meghatározására irányultak, arra a következtetésre vezettek, hogy a PRE-kat több gyenge, egymással kölcsönhatásban álló szekvencia-elem építi fel, amelyek csak együttesen képesek ellátni a teljes PRE funkciót (Poux és mtsai, 1996). Ezt a hipotézist támasztja alá az a megfigyelés is, hogy a genom különböző pontjain beépült azonos PRE szakaszt tartalmazó transzgenikus konstruktok inaktiváló képessége eltérhet (Fauvarque és Dura, 1993; Chan és mtsai, 1994; Ginhard és Kaufman, 1995; Hagström és mtsai, 1997). Ez azt valószínűsíti, hogy a beépült transzgenikus „fő” PRE-k kapcsolatba léphetnek és kiegészülhetnek a beépülés közelében lévő genomikus „mellék” PRE szakaszokkal, és ez nagymértékben megváltoztathatja tulajdonságaikat. Az egy adott PRE-t tartalmazó transzgenikus inszerten kialakuló repressziót nemcsak a homológ kromoszóma azonos szakaszára beépült „iker-

inszert” jelenléte képes stabilizálni, hanem bizonyos esetekben különböző helyre beépült inszertek is elősegítik egymás inaktiváló hatását (Sigrist és Pirrotta, 1997; Müller és mtsai, 1999).

2.2.6. A PRE-k és a POLYCOMB-fehérjék *in vivo* kapcsolata

Egy nemrégiben kifejlesztett módszer segítségével sikerült a PRE-ről és az inaktiváló POLYCOMB-komplexekről szerzett ismereteket összekapcsolni és kimutatni, hogy PRE-k fizikailag asszociáltak bizonyos PC-G fehérjékkel *in vivo*. Az X-ChIP (X-linked Chromatin Immunoprecipitation) módszernek a segítségével sikerült bebizonyítani, hogy a BX-C *cisz*-regulátorain és más géneken azonosított PRE szakaszok *in vivo* kovalensen keresztköthetőek bizonyos PC-G fehérjékkel (Strutt és mtsai, 1997; Orlando és mtsai, 1998). A PC-G fehérjék asszociációját a térképezett PRE szakaszok néhány kilobázisos környéki szekvenciáival sikerült kimutatni. Az is kiderült, hogy az egyes PRE-k különböző PC-G fehérjékkel keresztköthetők. Az *engrailed* PRE például köti a PC, PH és PSC fehérjéket, míg a hasonló szabályozás alatt álló *invected* PRE csak PC-vel keresztköthető (Strutt és Paro, 1997).

2.2.7. Az inaktív állapot fenntartásának módja

Az előzőekben megismert adatok birtokában joggal merül fel a kérdés, hogy a *cisz*-regulátorok PRE régiójához kötődő nagyméretű fehérjekomplexek milyen módon hozzák létre a sejtosztódásról sejtosztódásra fennmaradó inaktív állapotot. Az első analógiát egy már régebben ismert hasonló inaktiváló folyamat nyújtotta. Már évtizedekkel korábban leírták a Pozíció Effektus Variegáció (PEV) jelenségét (Baker, 1968), melynek lényege, hogy a heterokromatikus kromoszómarégiók (tipikusan centromerek, vagy telomerek) közelébe kerülő eukromatikus gének is inaktiválódnak (Spofford, 1967; Reuter és Wolff, 1981; Reuter és mtsai, 1982). A jelenséget azzal magyarázták, hogy a heterokromatinra jellemző kromatinszerkezet képes terjedni, miáltal a heterokromatikus blokk közelébe került eukromatikus régió erősen kondenzált, inaktív kromatinszerkezetet vesz fel, mely akadályozza az átíródást (Wallrath és Elgin, 1995). Ez az inaktiváció klonális jellegű, ezért például a *white*

gént a heterokromatin közelébe hozó és ezért annak részleges inaktivációját okozó átrendeződések (pl.: w^{m4h}) piros-fehér mozaikfoltos szemszínt okoznak (Reuter és mtsai, 1982). A w^{m4h} mozaikos szemszínt felhasználva azonosítottak olyan mutációkat, amelyek a heterokromatin-függő inaktivációt befolyásolják. Azokat a mutációkat, amelyek w^{m4h} háttérben a szemszín sötétédését, tehát a heterokromatinizáció terjedésének megakadályozását okozták, PEV-szuppresszoroknak, az ellentétes hatású, és ezáltal a szemszínt világosító mutációkat pedig PEV-enhanszereknek nevezték (Reuter és Wolff, 1981). A PEV-szuppresszor hatású mutációk közül többről sikerült bebizonyítani, hogy a heterokromatin felépítésében részt vevő fehérjéket azonosítanak (Eissenberg és mtsai, 1990). Ezek egyike a HP1 nevű heterokromatikus protein kromodomént tartalmaz, s ezt a domént a PC fehérjében is megtalálták (Paro és Hogness, 1991). Ez vetette fel azt a lehetőséget, hogy a *cisz*-regulátorok inaktiválódása valójában egy lokális heterokromatinizációs jelenség (Paro, 1990). Eszerint a *cisz*-regulátorok zárt konformációja a Polycomb-fehérjék együttműködő komplexe által létrehozott, kompakt kromatin-szerkezetet feltételez, ami akadályozza az aktiváló hatású transzkripciós faktorok hozzáférését a *cisz*-regulátoron belül lévő kötőhelyeikhez, és végső soron megakadályozza a *cisz*-regulátorok transzkripciós aktiváló hatását az általuk szabályozott homeotikus gén promóterén.

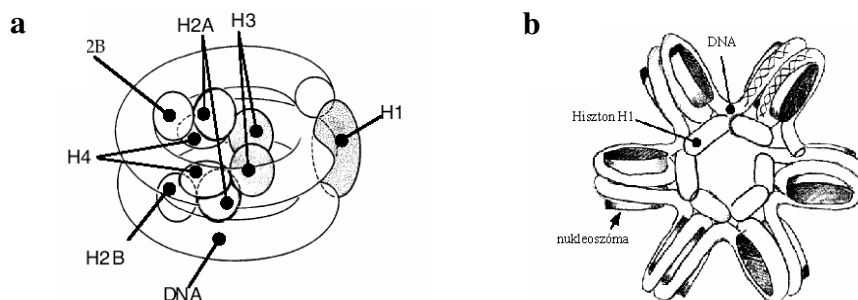
Az elképzelés alátámasztására különböző módszerekkel próbálták bizonyítani, hogy az inaktív *cisz*-regulátorok fizikailag kevésbé hozzáférhetőek. Az első kísérlet a promóterek hiperszenzitív régióinak megjelenését jól kimutatható restrikciós enzimhasítási mintázat különbségeit vizsgálta az aktív és inaktív *cisz*-regulátorok kromatinján (Schlosscher és mtsai, 1994). Ez a módszer nem mutatott ki különbséget az aktív, illetve inaktív állapot között. A második próbálkozás már egy sokkal finomabb megközelítést tett lehetővé. A szerzők (McCall és Bender, 1996) egy P-elembe épített, GAL-4 kötőhelyeket tartalmazó *lac-Z* riportergént ugrattak a BX-C *bx* régiójába ($bx^{UASlac-Z}$), amely önmagában csak igen alacsony

szinten, az adott *cisz*-regulátornak megfelelő anterior határvonallal jellemezhetően expresszáldott. Hiába hoztak létre az *UASlac-Z* elemeknek általában mindenhol erős expressziót biztosító GAL-4 szintet, a *bx^{UASlac-Z}* csak a PS5-től hátrafelé elhelyezkedő szelvényekben termelt *lac-Z* RNS-t. Polycomb mutáns háttérben azonban ez az anterior restrikció megszűnt, *Pc³* homozigóta embriókban a *bx^{UASlac-Z}* minden szelvényben megjelent a *lac-Z* génterméke. Amikor génkonverzióval kicserélték a beépült *UAS* szakaszt a kisméretű virális T7 POLIMERÁZ kötőhelyére, az ugyanazon helyen lévő *bx^{T7lac-Z}* beépülés T7 POLIMERÁZ jelenlétében mindenütt kifejezte a *lac-Z*-t. Tehát a kis méretű virális polimeráz az embrió minden részén képes volt átírni a *lac-Z*-t, a GAL-4 által a riportergén promoteréhez kötött, nagyméretű POLIMERÁZ-II holoenzim komplexszel ellentétben (amely természetes körülmények között a homeotikus gének átírását is végzi). Ez az eredmény arra utal, hogy a *cisz*-regulátorok hozzáférhetősége bizonyos szempontból különbözik azok aktív, illetve inaktív állapota esetében, de inaktív állapotban sem teljesen hozzáférhetetlenek (például a kisméretű virális polimeráz számára).

Hasonló eredményt hozott az a kísérlet, amikor egy élesztő metiláz *Drosophilába* juttatása után vizsgálták a PRE-k metilálhatóságát (Boivin és Dura, 1998). Körülbelül kétszeres különbséget találtak a PC-G által represszált, illetve a represszió alól felszabadult azonos PRE-k metiláltságban, ami szintén különböző mértékű fizikai hozzáférhetőségre utal. Fitzgeraldnak és Bendernek (2001) a BX-C több *cisz*-regulátor szakaszában sikerült aktivitásfüggő különbséget kimutatni a vizsgált régiók hozzáférhetőségében egy nyolcszorosára növelt méretű T7-polimeráz, illetve a FLIP-rekombinááz enzim felhasználásával. Ezek a különbségek *Pc-G* mutáns háttérben eltűntek.

2.2.8. Az inaktív állapot kromatinszerkezeti alapjai

Azt, hogy milyen módon csökkenti le a POLYCOMB-fehérjekomplexek DNS-hez kapcsolódása az adott szakasz hozzáférhetőségét, nem tudjuk pontosan, bár az erről alkotott képünk nagyon sokat finomodott az utóbbi fél évtizedben.



2.7. ábra Az egyes hiszton fehérjék elhelyezkedése a nukleoszóma szerkezetben egymáshoz és a körültekерedő DNS fonálhoz képest
a.) Egyetlen nukleoszóma sematikus rajza. *b.)* A linker hiszton H1 molekulák elhelyezkedése a 30nm-es szolenoid szerkezetben.

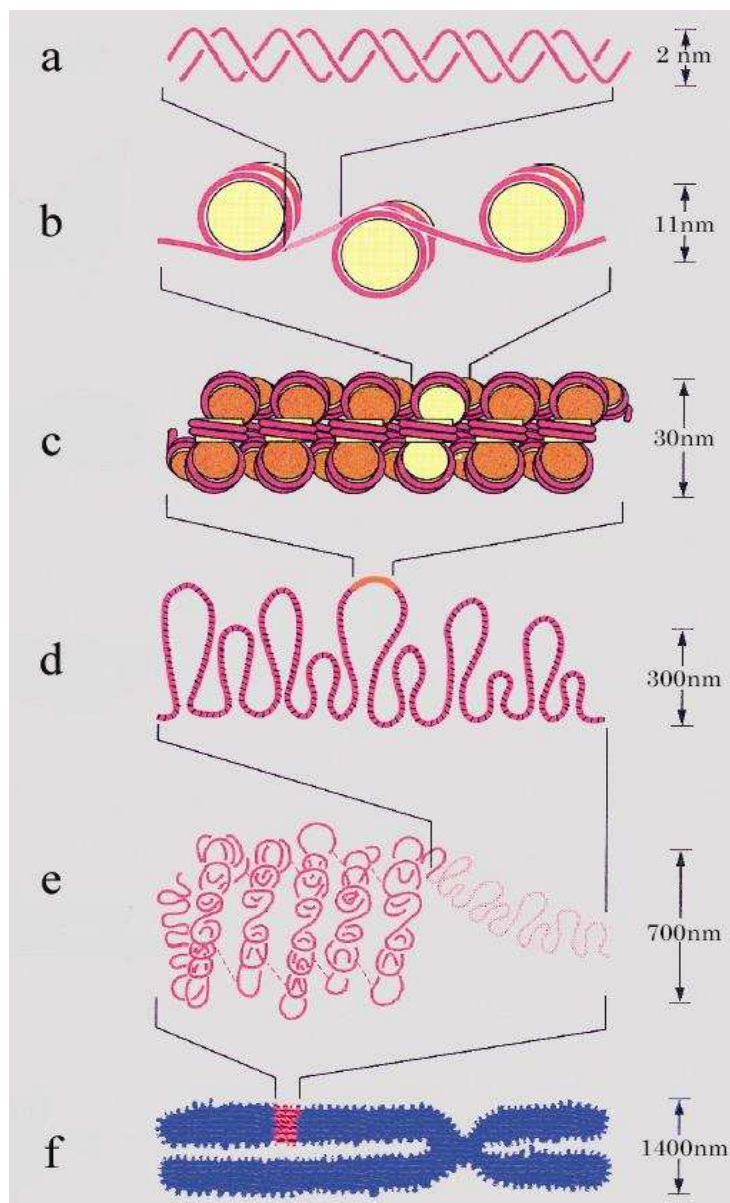
Régen tudjuk, hogy az eukarióta sejtben lévő méteres hosszúságú DNS fonál a mindössze mikrométer nagyságrendű sejtmagba csak nagyon szoros csomagolódás esetében férhet be. Ennek a csomagolódásnak elsődleges feltétele a DNS feltekерedése a nukleoszómák magját adó hiszton fehérjékre. A négy különböző (core) hiszton (H2A, H2B, H3, H4) által kialakított kompakt szerkezet köré általában 146 bp hosszúságú DNS tekeredik fel (2.7. ábra).



2.8. ábra A DNS kettős spirál rátekeredése a különböző hiszton molekulákból összeálló nukleoszómára
 Hiszton H2A rózsaszín zöld, hiszton H2B sárga kék, hiszton H3 kék, hiszton H4 zöld. A rendezetlen elhelyezkedésű nukleoszóma farkakat a hozzájuk tartozó hisztonnal azonos színű fonál jelzi (Varga-Weisz, 2002 nyomán).

A röntgenkristallográfiás szinten is ismert nukleoszóma szerkezetet (Luger és mtsai, 1997) a négy magi hiszton két-két példánya, és az egymáshoz rendkívül szorosan kötődő nyolc bázikus hiszton fehérje köré tekeredő 146 bp hosszú DNS fonál hozza létre (2.8. ábra). A szerkezetet a hiszton oktameren belül különböző fehérje-fehérje kölcsönhatások, míg a hiszton mag és a DNS fonál közt a fehérjék felszínén lévő pozitív töltésű arginin és lizin aminosavak és a DNS negatív töltésű cukor-foszfát gerince közti elektrosztatikus kölcsönhatások stabilizálják. A hiszton fehérjék az eukarióták legkonzerváltabb fehérjéi közé tartoznak, a 136 aminosav hosszúságú *Drosophila*-, és az emberi H3 közt mindössze négy aminosav különbség van. A hisztonok N-terminális farki részéből és a nukleoszóma alapstruktúráját adó C-terminális globuláris szakaszból állnak. A DNS az oktamer stabil, globuláris hiszton doménekből álló, rendkívül konzervált szerkezetű belső részére tekeredik fel, míg az erősen pozitív töltésű hiszton farkak kívülről léphetnek interakcióba a feltekeredett DNS fonállal (2.8. ábra).

2.9. ábra A kromatinszerveződés különböző szintjei
a.) A 2nm vastagságú DNS kettős spirál. *b.)* A 11nm vastagságú nukleoszóma köré tekeredő DNS fonál. *c.)* A linker hiszton segítségével stabilizálódott 30nm-es fonál. *d.)* A hurokstruktúra. *e.)* A metafázisos kromoszómák extrém kompakt szerkezete (Wolpert: Principles of development című könyve nyomán).



A nukleoszómák önmagukban megakadályozhatják bizonyos szekvencia-specifikus DNS-kötő fehérjék asszociációját, és önmagukban a kromatin ötszörös tömörödését okozzák (Kornberg és Lorch, 1999). A nukleoszómák és az összekötő DNS szakaszok hozzák létre az elektronmikroszkóppal is megfigyelhető 10nm vastagságú „gyöngyök a fonálon” (beads on string) szerkezetet (2.9. ábra *a.*). Már a DNS csomagolódásának ez az első szintje is erősen gátló hatású a génkifejeződésre nézve (Kingston és mtsai, 1996; Felsenfeld, 1986). A csomagolódás következő szintjét a H1 összekötő (linker) hisztonok hozzák létre, amelyek a nukleoszómákból kilépő DNS szakaszhoz kötődnek, és egymással, valamint a H2A-val kölcsönhatásban alakítják ki a 30 nm átmérőjű kromatin fonalat. A létrejövő szolenoid szerkezet (2.9. ábra *c.*) belsejében találhatóak a H1 hisztonok (Yabuki és mtsai, 1982; Graziano és mtsai, 1994). A kromatin szerveződés magasabb szintjei kevésbé ismertek. A jelenlegi modellek szerint az interfázisos sejtmagban a DNS egy fehérje mátrixhoz (scaffold) kötődő hurok struktúrában stabilizálódik, ahol a nyomon követhető hurkok ki- és belépési pontjai igen közeliek a DNS vázon (Paulson és Laemmli, 1977), és az átlagos hurokméret 40kb közeli (Benyajati és Worcel, 1976).

A hurokmodell szerint a DNS asszociációját a váz-struktúrához (scaffold) speciális szekvenciák, SAR-ok (Scaffold Attachment Regions), vagy más néven MAR-ok (Matrix Attachment Regions) biztosítják, amelyek egyben el is szigetelik a szomszédos hurkokat. Egy hurkon belül azonos szabályozás alatt álló, és azonos kromatin szerkezetű gének találhatók, míg a határoló szekvenciákkal elválasztott szomszédos hurkokban a génaktivitás különbözhet (2.9. ábra *e.*). A mitotikus kromoszómák kondenzációjában további tömörödést létrehozó, de még nem ismert kondenzációs folyamatok játszanak szerepet (2.9. ábra *f.*).

A sejtmag szerveződése, a kromatinszerkezet és a génszabályozás kapcsolatáról még keveset tudunk, de biztosnak látszik, hogy a sejtmagnak pontosan meghatározott belső rendje van. A kromoszómák egymáshoz viszonyított helyzete a sejtmagban mindig azonos (Nagele

és mtsai, 1999; Visser és mtsai, 2000; Lukasova és mtsai, 2002; Tanabe és mtsai, 2002). A homológ kromoszómák az interfázisban is egymás közelében maradnak. A riboszómális gének transzkripciója elkülönülő kompartmentben történik, a transzkripciósan aktív és az inaktív DNS szakaszok általában is elválasztódnak, a heterokromatin elkülönül az eukromatintól, a telomerek a magmembránhoz horgonyzódnak (Kurz és mtsai, 1996; Mahy és mtsai, 2002). Amikor a sejtciklus során a teljes DNS fonál replikálódik, a mitózis után a sejtmag egész belső rendje is átadódik az utódsejteknek. Az interfázisos sejtmagban a PC-G fehérjék általában jellegzetes elkülönült foltokban kötődnek a kromatinhoz („PC-G-body”: Messmer és mtsai, 1992; Franke és mtsai, 1992; Buchenau és mtsai, 1998). A sejtciklus során lokalizációjuk változik, a mitózis során nagy részük (pl.: a PH 98%-a) disszociál a kromoszómákról és a citoplazmában várja be az osztódás befejezését, és ezután reasszociálódik a kromatinnal. A sejtmagon belül a transzkripció aktivitása és a PC-kötés helye egyértelműen elkülönül, ami represszált kromatint tartalmazó domének létezését támasztja alá (Buchenau és mtsai, 1998).

A kromatinszerkezet és a génexpresszió szabályozásának kapcsolata is nyilvánvalóvá vált az utóbbi években, és ezt részleteiben is megismerhettük. Az inert gének, amelyek az adott szövetben nem expresszálódnak és nem is indukálhatók, a kromatin szintjén egy kiterjedt, periodikusan rendezett nukleoszóma rendszerrel jellemezhetők, és további faktorok számára nem hozzáférhetőek. Az aktív gének esetében a génszabályozásban fontos szerepet játszó promóter és enhanszer régiók általában nukleoszóma mentesek, amit az jelez, hogy sokkal (kb. 1000-szer) érzékenyebbek *in vivo* aspecifikus DN-áz enzimek hasítására (DN-áz hiperszenzitívek). Valószínűsíthető, hogy az aktív génszabályozási folyamatokat mediáló DNS-kötő fehérjék működését általában akadályozza a kötőhelyeiket borító nukleoszómák jelenléte. A sejtosztódás során azonban a szekvenciaspecifikus faktorok kötőhelyei felszabadulhatnak, és a nukleoszómák a már sikeresen kötődött transzkripció faktorok

közvetlen közelében gyengébben kötődnek, ezért általában hozzájuk képest pozicionálódnak (Belikov és mtsai, 2000; Teng és mtsai, 2001). Az interfázis során is lehetőség van - bizonyos szignálok hatására - a már kötődött nukleoszómák aktív eltávolítására, illetve elcsúsztatására.

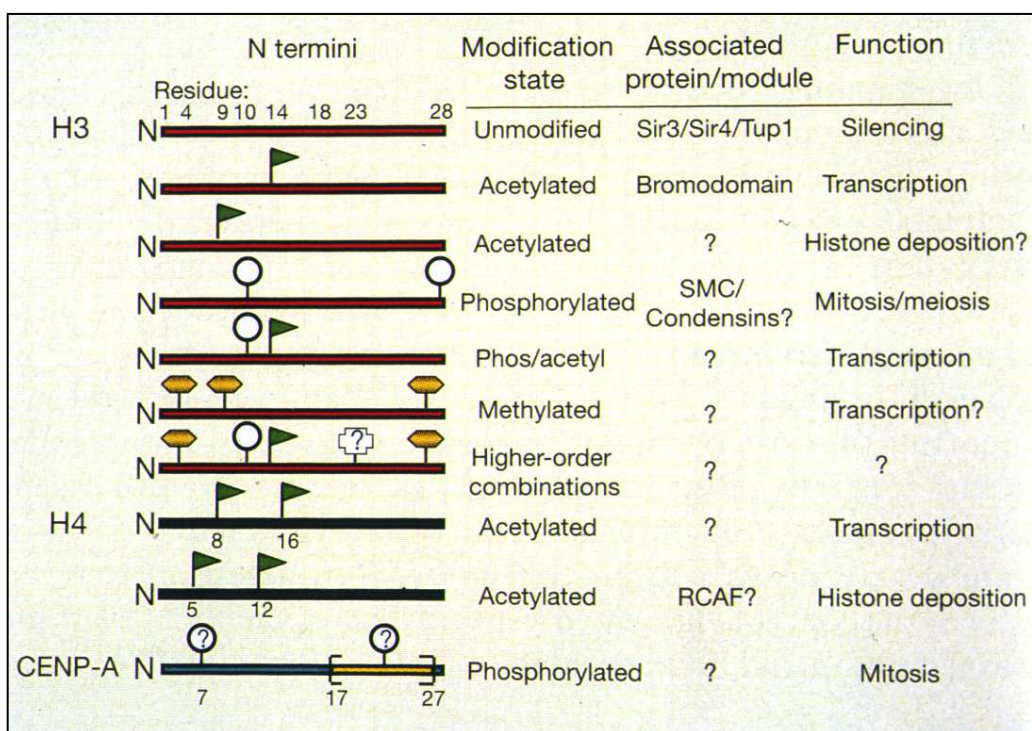
A nukleoszómákat alkotó hisztonok és a DNS egymáshoz való kötődésének erősségét, valamint a kialakuló nukleoszóma elmozdíthatóságát befolyásolja a DNS AT-gazdagsága, és az oktamer magjából kilógó hiszton farkak („tail domens”) poszttranszlációs változásai. A nagy százalékban adenint (A) és timint (T) tartalmazó DNS rövidebb szekvenciák könnyen hajlíthatóak, energia minimumot jelentenek a kialakuló nukleoszómák számára (Wasylyk és mtsai, 1979; Travers és Klug, 1987; Stein és Bina, 1999). Hosszabb egybefüggő AT szakaszok különösen erősen hajlíthatóak és hasonló okokból megkönnyítik a nukleoszómák elcsúsztatását is (Baldi és mtsai, 1996).

2.2.9. A hisztonok kovalens módosításainak szerepe a génregulációs folyamatokban: a hiszton-kód hipotézis

A nukleoszóma alapszerkezetében teljesen azonos magi hisztonok N-terminális farki doménjei acetilálódhatnak, foszforilálódhatnak, metilálódhatnak és ubiquitinálódhatnak. A különböző poszttranszlációs módosítások hatására az eltérően módosított nukleoszómák más fehérjékkel kapcsolódhatnak és esetleg különböző további kovalens módosításokon eshetnek át. A nyolc hiszton fehérjét tartalmazó nukleoszómán belül elméletileg több millió a farki domének lehetséges kovalens módosításainak kombinációja.

A „hiszton kód hipotézis” alapja az a felismerés, hogy a különböző módosított nukleoszóma variánsok másképp viselkedhetnek, más és más kromatinszerkezeti feladatot láthatnak el (Strahl és Allis, 2000; Turner, 2000; 2.10. ábra). A hiszton kód működését néhány esetben már sikerült megfejteni. A nukleoszómák DNS-hez való kapcsolódását katalizáló fehérjék (Chromatin Assembly Faktor, CAF1) például csak bizonyos pozíciókban acetilált hisztonokat képesek beépíteni (Verreault és mtsai, 1996; Parthun és mtsai, 1996; Kauffman, 1996). A génaktiváció több esetben hiszton hiperacetilálódással és foszforilációval jár együtt,

míg a gének inaktivációját több esetben specifikus hiszton-metiláció kíséri a H3-K4, H3-K9, és a H3-R17 pozíciókban (Jiwen és mtsai, 2002). A fő heterokromatikus fehérje, a HP1, a specifikusan metilált H3-K9 hisztonon keresztül kapcsolódik a kromatinhoz, és hoz létre inaktivációt (Bannister és mtsai, 2001; Jacobs és mtsai, 2001; Lachner és mtsai, 2001). A mitózis során a nukleoszómák H3 és H2A hisztonjainak foszforilációjára van szükség a maximális kondenzáltságú kromoszómák létrejöttéhez a metafázisban (Gurley és mtsai, 1974; Barre és mtsai, 2001). A DOT1 metil-transzferáz a H3 hiszton magi részén a 79. lizin oldalláncon metilálva járul hozzá az aktív kromatindomének kijelöléséhez (Ng és mtsai, 2002; Van Leeuwen és mtsai, 2002).



2.10. ábra A hiszton-kód hipotézis

Az egyes hiszton fehérjék néhány lehetséges kovalens módosítása és a módosítások feltételezett következményei (Allis 2000 nyomán).

Egy transzgenikus UAS-t és BX-C *cisz*-regulátor darabot tartalmazó transzgenikus konstrukció esetében sikerült azt is bizonyítani, hogy az aktiválása az óriáskromoszómákon kimutatható hiszton H4 acetilációval jár együtt a beépülés helyén. Ez a hiperacetiláció a

fenntartás fázisában is végig megmarad (Cavalli és Paro, 1999). A kísérlet alapján feltételezhető, hogy az aktív és inaktív *cisz*-regulátorokon lévő nukleoszómák különböző kovalensen módosított hisztonokat tartalmaznak.

2.2.10. Repressziós kromatinszerkezeti modellek

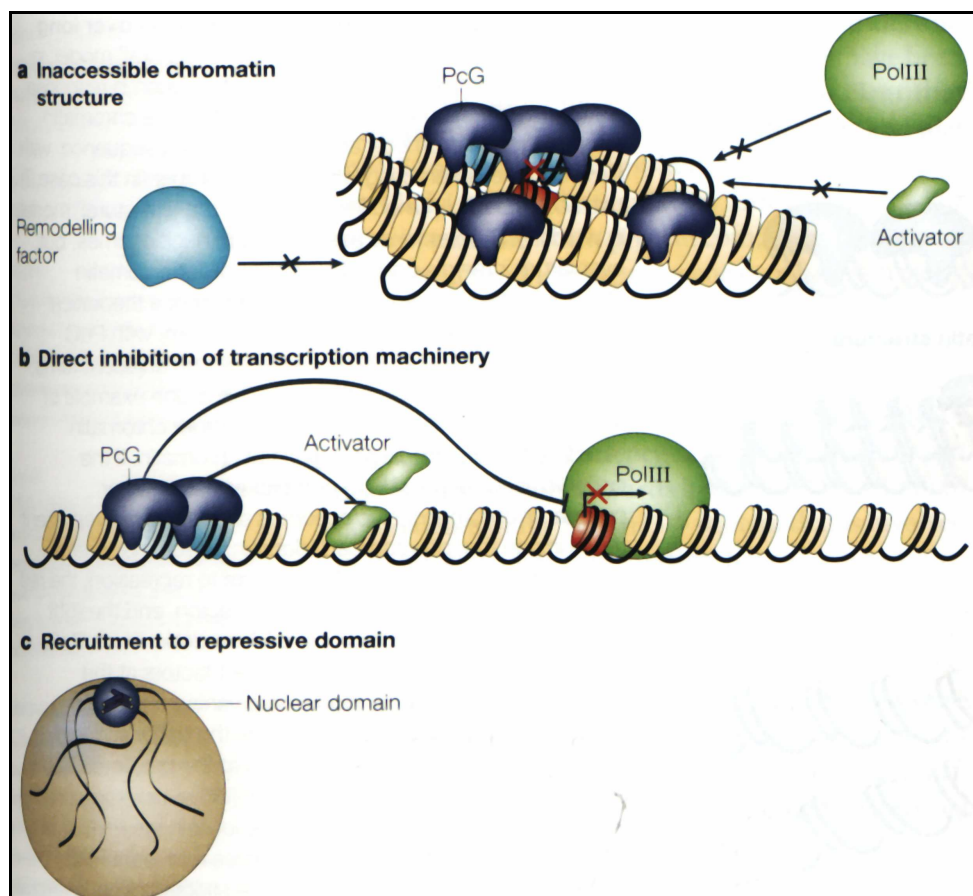
Több modellt is felállítottak annak magyarázatára, hogy miképpen inaktíválják a PRE-n kötődő kromatin fehérjék a *cisz*-regulátorokat (2.11. ábra). A legrégebbi modell szerint a különböző PRE-n kötődő PC-komplexek a kromatint szorosan becsomagolják, és ezáltal a transzkripció faktorok számára hozzáférhetetlenné teszik azt, egy heterokromatin-szerű kromatinszerkezet kialakításával (Paro, 1990; Messmer és mtsai, 1992; Reuter és Spierer, 1992; 2.11. ábra *a.*). A modellt alátámasztja, hogy több *Pc*-G gén egyben a PEV-et is módosítja. Így az *E(Pc)* (Sinclair és mtsai, 1998) az *E(z)* (Laible és mtsai, 1997) és az *Rpd3* (Chang és mtsai, 2001) PEV-szuppresszor (azaz a heterokromatikus blokk közelébe került *white* gén represszálásában, a heterokromatin továbbterjedésében játszik szerepet).

A modell ellen szól azonban, hogy a sejtmagon belül a PC-G fehérjék kötődése nem esik egybe a nagy DNS koncentrációjú, erősen heterokromatinizált kompartmentekkel (Buchenau és mtsai, 1998), illetve a represszált szakaszokban nem sikerült nagyobb mértékű különbséget kimutatni az érintett DNS szakasz feltekeredtségében, illetve a kromatin fonál hozzáférhetőségében (Schlossherr és mtsai, 1994; Fitzgerald és Bender, 2001).

Egy másik modell szerint, melyet kihurkolódás vagy enhanszer interferencia („looping or enhancer interference”) néven ismerünk, kiterjedt DNS szakaszok csomagolódásának megváltoztatása nélkül is elképzelhető az enhanszer-promóter interakciók gátlása akár csak néhány, megfelelően pozícionált represszor komplex segítségével (Pirrotta és Rastelli, 1994; Bienz és Müller, 1995; Simon, 1995; 2.11. ábra *b.*).

Egy hasonló, továbbfejlesztett elképzelés szerint (hop and skip) a fő és a mellék PRE-kon szerveződő együttműködő komplexek további asszociációja épít fel egy enhanszer-

promóter kapcsolatot gátló szerkezetet, az érintett DNS szakasz teljes lefedése nélkül (Sigrist és Pirrotta, 1997; Pirrotta, 1998).



2.11. ábra. A POLYCOMB-függő transzkripció represszió néhány egyszerű modellje

a.) A nukleosóma mozgató- és transzkripció faktorok számára hozzáférhetetlen, heterokromatin-szerű „becsomagolt” kromatinszerkezet létrehozása. b.) A PRE-kon kialakuló PC-komplexek és az aktivátor szerepű szabályozó régiók (enhanszerek, promóterek) közvetlen kölcsönhatása a semleges kromatinszakaszok kihurkolódása mellett. c.) A represszált kromatin régiók megfelelő inaktív kromatindoménokba történő asszociációja. A késsel jelzett nukleosómák a PRE szakaszokat, a pirossal jelzett nukleosóma a promótert szimbolizálja, a PC-komplexek sötétkék, az aktivátorok és a POLIMERÁZ II holoenzim komplex zöld színnel van jelezve. (Francis és Kingston 2001 alapján).

A eddigi elképzelésektől különbözik a kompartmentalizációs modell. Ez felveti azt a lehetőséget, hogy a PC-komplexek kötődése a célszekvenciákat az inaktív nukleáris kompartmenthez horgonyozza. Így az inaktiválandó célgének egy olyan szubnukleáris kompartmentbe gyűlnek össze, ami megakadályozza a transzkripció faktorok, illetve az RNS polimerázII holoenzim komplex hozzáférését (Paro, 1993; Felsenfeld, 1996; Schloßherr és mtsai, 1994; Strouboulis és Wolffe, 1996; 2.11. ábra c.).

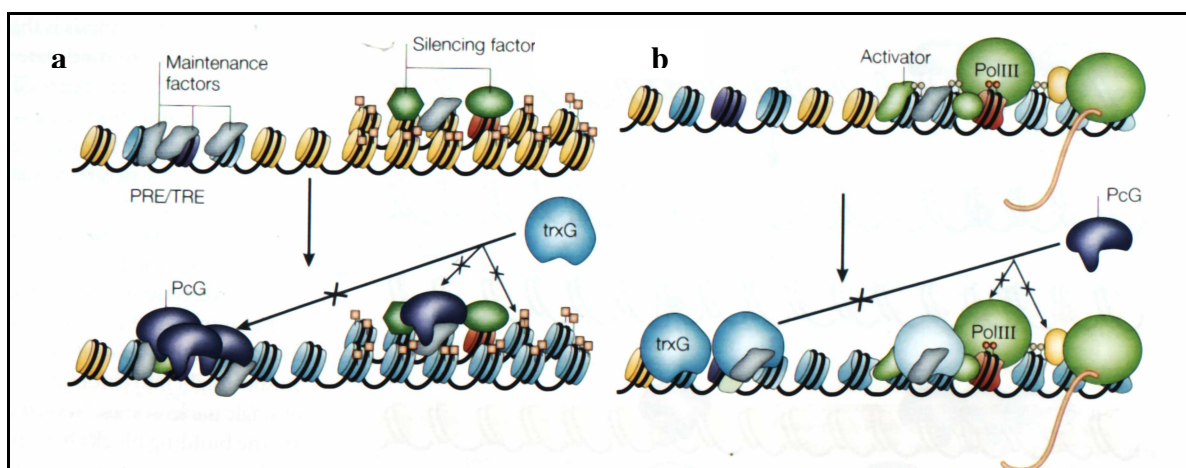
Az újonnan izolált POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX 1 (PRC1) biokémiai működésének vizsgálata (Shao és mtsai, 1999) az előzőekhez képest egyszerűbb modellhez vezetett. Pirrotta és Rastelli (1994) nukleoszóma átépítési modellje szerint a promóter szakaszt elfoglaló kritikus nukleoszóma jelenléte önmagában is blokkolhatja a transzkripció komplex működését. A PRC1-ben azonosított Pc fehérje független kísérletek szerint valóban képes a nukleoszómát kötni (Breiling és mtsai, 1999). A tisztított PRC1 komplex pedig *in vitro* képes kölcsönhatásba lépni a nukleoszómákkal borított mesterséges DNS szakasszal és ATP felhasználásával stabilizálni egy olyan kiterjedt nukleoszóma rendszert, amelyet a nukleoszómák átépítésére képes SWI/SNF-komplex nem képes megbontani (Shao és mtsai, 1999).

Egy új *Pc*-G tag, a *dMi-2* izolálása vetette fel a hiszton-deacetilációs modell hipotézisét (Kehle és mtsai, 1998). A *dMi-2* genetikai interakciót mutat a *hunchback* represszorral, emellett a *Pc* fenotipikus enhanszere is. Biokémiai kísérletek szerint az *dMi-2*, olyan ATP-kötő fehérjét kódol, ami több hiszton deacetiláz komplexben is azonosítottak (Wade és mtsai, 1998; Zang és mtsai, 1998). Az *dMi-2*-t tartalmazó komplex képes a H3 és H4 hisztonok amino-terminális farki doménjének deacetilációjára, illetve ATP-függő nukleoszóma átépítő aktivitása is van (Zang és mtsai, 1998). Mivel az érintett hiszton-farkak deacetilációja más rendszerekben is a represszív kromatin konformáció megjelenését jelzi (Mizzen és Allis, 1998; Struhl, 1998), lehetséges, hogy a *cisz*-regulátorok repressziója összefügg a nukleoszómák hipoacetilált állapotával, míg az aktív PRE szakaszokon elhelyezkedő nukleoszómák, az aktív promótereken lévő nukleoszómákhoz hasonlóan hiperacetiláltak. A *dMi-2* mellett újabban egy másik típusú deacetilázról, a *HDAC1*-ről (Chang és mtsai, 2001) is kiderült, hogy *Pc* enhanszer fenotípusa van, fizikailag képes a *Pc* kötésére, és az óriáskromoszómán specifikus, a *Pc*-vel átfedő helyekre kötődik.

Jelenlegi elképzeléseink szerint az együttműködő PC-G fehérjék különböző összetételű nagymólsúlyú komplexei, egyrészt DNS-kötő fehérjék segítségével, másrészt a kromatin-struktúra alapját alkotó nukleoszómák kötésén keresztül asszociálódnak a PRE szakaszokhoz. Oly módon represszálják, hogy a nukleoszómák speciális kovalens módosítását katalizálják, illetve az enhanszer-promóter kapcsolatot megakadályozó, vagy a POLIMERÁZ-II holoenzim komplex hozzáférését és működését lehetetlenné tévő, stabil, zárt kromatin konformációt hoznak létre.

2.3. A CISZ-REGULÁTOROK AKTÍV ÁLLAPOTÁNAK FENNTARTÁSA

Az *cisz*-regulátorok aktív állapotát a TRX-G fehérjék tartják fenn (2.12. ábra). A *trithorax*-típusú (*trx*-G) mutációk pontosan ellentétes hatásúak, mint a *Pc*-G mutációk.



2.12. ábra. A POLYCOMB-függő epigenetikus represszió és a TRX-függő epigenetikus aktiváció kialakulása és kölcsönhatásai

a.) Nukleoszóma mozgató- és transzkripció faktorok számára hozzáférhetetlen, heterokromatin-szerű „becsomagolt” kromatinszerkezet létrehozása. b.) Korai aktiváló faktorok működése biztosítja az epigenetikus aktiváló faktorok kötődését, amelyek képesek megakadályozni az adott kromatin-régió represszióját. A késsel jelzett nukleoszómák a PRE szakaszokhoz kötődnek, a narancs színű nukleoszóma a promóter szakaszon helyezkednek el. A PC-komplexek sötétkékek, a *trx*-komplexek világoskékek, az aktivátorok és a polimeráz II holoenzim komplex zöld színnel van jelezve. (Francis és Kingston, 2001 alapján).

A fejlődés előrehaladtával ugyanis *trx*-G mutánsokban a *cisz*-regulátorok végül minden szelvényben inaktiválódnak (15-17 stádiumú embriókban), ennek megfelelően a szabályozott homeotikus gének represszálódnak (2.12. ábra). Végeredményben a BX-C által

kódolt mindhárom homeotikus fehérjének, illetve az ANT-C által kódolt DFD, SCR és ANTP fehérjéknek a szintje egyaránt lecsökken (Mazo és mtsai, 1990; Breen és Harte, 1993). Heterozigóta *trx-G* mutánsokban a homeotikus gének funkcióvesztését több szelvényre kiterjedő, anterior irányú homeotikus transzformációk jelzik. Jellemző a szex fésű redukciója, a billér szárny irányba történő transzformációja, apikális szőrök megjelenése az első és harmadik lábón, illetve a normálisan sötét ötödik abdominális szelvény kivilágosodása, addicionális hetedik szelvény megjelenése, valamint a szőrtelen hatodik sterniten az ötödik sternitre jellemző szőrök felbukkanása (Lewis, 1968; Castelli-Gair 1998; 2.6. ábra).

2.3.1. A *trx*-csoportba tartozó gének azonosítása muslicában

A *trithorax*-csoportot klasszikus genetikai alapon definiálták. Azokat a géneket tekintik a *trx-G* tagjának (2.2. táblázat), amelyeknek:

(1.) mutánsaiban a homeotikus gének aktív állapotának fenntartása károsodik (megfelelő homeotikus fenotípusok jelennek meg, vagy legalábbis kimutatható homeotikus génexpresszió-csökkenés)

(2.) a *trx-G* mutánsok erősítik egymás homeotikus fenotípusát

(3.) a *trx-G* mutánsok szuppresszálják a *Pc-G* mutánsok által okozott funkcióvesztéses homeotikus fenotípusokat (pl. *esc* fenotípust) (Shearn, 1989).

A TRX-G fehérjék transzkripció aktiváló szerepe azonban a PC-G-vel szemben nem kizárólag fenntartó jellegű, hiányukban a BX-C aktivációjának iniciációja is károsodik (Breen és Harte, 1991, 1993; Brizuela és mtsai, 1994).

A *trithorax*-csoportba tartozó mutánsokat (2.2. Táblázat) a fenti kritériumok alapján tervezett mutánsizolálási kísérletekben azonosították (Kennison és Tamkun, 1988; Breen és Harte, 1993; Kennison, 1993, 1995; Pirrotta, 1995, Gildea és mtsai, 2000). A kódolt fehérjéket a transzkripció aktivitás epigenetikus fenntartóinak tartjuk (Tamkun, 1995; Simon,

1995). Az azonosított *trx-G* génekről kiderült, hogy homológjaik minden magasabbrendű szervezetben előfordulnak és funkciójuk evolúciósan konzervált (Hanson és mtsai, 1999).

A *trithorax*-csoportba tartozó gének

<i>trx-G</i> gén neve	rövidítése	helye	allélok száma
<i>absent, small, or homeotic discs1</i>	<i>ash1</i>	76B8-9	34
<i>absent, small, or homeotic discs2</i>	<i>ash2</i>	96A13	20
<i>brahma</i>	<i>brm</i>	72C1	36
<i>female sterile (1) homoeotic</i>	<i>fs(1)h</i>	7D2-3	23
<i>imitation SWI</i>	<i>Iswi</i>	49B10	13
<i>kismet</i>	<i>kis</i>	21B4-6	67
<i>kohtalo</i>	<i>kto</i>	76D1	6
<i>little imaginal discs</i>	<i>lid</i>	26B2	4
<i>modifier of mdg4</i>	<i>mod(mdg4)</i>	93D8-9	41
<i>moira</i>	<i>mor</i>	89A11	14
<i>nejire</i>	<i>nej</i>	87F7-9	20
<i>osa</i>	<i>osa</i>	90C1-2	37
<i>sallimus</i>	<i>sls</i>	62C2	49
<i>skuld</i>	<i>skd</i>		4
<i>Snf5-related1</i>	<i>Snr1</i>	83A4	8
<i>Suppressor of Polycomb at 37D</i>	<i>Su(Pc)37D</i>	37D2-5	2
<i>taranis</i>	<i>tara</i>	89B13-15	
<i>Trithorax-like</i>	<i>Trl</i>	70F4	27
<i>trithorax-related</i>	<i>trr</i>	2B14	4
<i>trithorax</i>	<i>trx</i>	88B1	98
<i>urdur</i>	<i>urd</i>	87F12-15	3
<i>verthandi</i>	<i>vtd</i>	80F	24

2.2. táblázat. A *trithorax*-csoportba tartozó ismert gének

A *trithorax*-mutációk neve, rövidítése, helye és az ismert mutáns allélok száma

2.3.2. A TRX-rendszer működésére felállított modellek

A TRX-rendszer működésének mechanizmusa sokkal kevésbé ismert, mint az inaktiváló POLYCOMB-rendszeré. A kromatin aktív állapotának kialakulását és fenntartását alapvetően két irányból próbálják felderíteni.

Az egyik a genetikai megközelítés, mely a folyamatban részt vevő regulátor-géneket mutáns fenotípusuk alapján azonosítja. A gén által meghatározott funkció kiesésének következményeit minél pontosabban jellemezve, genetikai interakciók vizsgálatával, majd a gén klónozása és a mutáció jellemzése után az ismert konzervált domének, illetve az ismert

funkciójú együttműködő partnerek alapján hipotézist állítanak fel a fehérje működésére, illetve a mutáns fenotípus okának meghatározására. A vad és mutáns fehérje kifejeződésének, működésének, lokalizációjának összehasonlításával, mennyiségének, ha lehetséges, térben és időben pontosan meghatározott növelésével, vagy csökkentésével, valamint további genetikai, sejtbioológiai, és biokémiai módszerekkel ellenőrzik a klasszikus genetikai kísérletek alapján felállított hipotéziseket.

A másik megközelítés meghatározott *in vitro* aktivitással rendelkező, vagy már ismert fehérjékkel együttműködő faktorok izolálásán alapul (Papoulas és mtsai, 1998). Az izolált faktorok vagy komplexek pontos biokémiai jellemzése, katalitikus aktivitásuk, egymáshoz vagy szubsztrátjukhoz való kötődésük vizsgálata, illetve a tisztított fehérjék szekvenálása után a biokémiai analízis is a génekhez jut vissza. Az *in vitro* biokémiai funkció alapján hipotézist állítottnak fel az *in vivo* szerepre vonatkozólag, melyet speciális *in vivo* módszerek, illetve célzottan létrehozott mutánsok segítségével igyekeznek bizonyítani.

Genetikai adatok, és a jelenlegi biokémiai ismereteink egyaránt azt sugallják, hogy a TRITHORAX-csoportba tartozó fehérjék működésüket nem egyetlen, hanem inkább egymás mellett létező, redundáns működésű, független fehérje-komplexekben látják el (Papoulas és mtsai, 1998).

2.3.3. SET-doménnel rendelkező TRX-G fehérjék

A *trx* gén maga bonyolult szövet-, paraszegment- és promóter-specifikus hatással van a homeotikus gének expressziójára (Breen és Harte, 1993). Hőmérséklet-érzékeny allélok alkalmazásával bebizonyosodott, hogy a TRX fehérjére már az embrionális fejlődés 0-4 óráig tartó szakaszában is szükség van, és a korai TRX hiány következményei később már nem kompenzálhatóak (Ingham és Whittle, 1980). A TRX specifikus helyekre kötődik az óriáskromoszómákon (Kuzin és mtsai, 1994; Chinwalla és mtsai, 1995), amelyek részben átfednek egy másik TRX-G tag, az *absent small and homeotic discs1 (ash1)* génről íródó

fehérje kötőhelyeivel (Tripoulas és mtsai, 1996). A 108 leírt ASH1-kötőhelyből csak 23 köt TRX-et is, de a TRX kötődése erősen redukálódik egy hőmérséklet-érzékeny allélt (*ash1¹⁴*) tartalmazó háttérben restriktív hőmérsékleten (Tripoulas és mtsai, 1996), ami arra utal, hogy a TRX és ASH1 között funkcionális kapcsolat lehet.

A *trx* és az *ash1* klónozása után bebizonyosodott, hogy szekvencia szinten is hasonlítanak egymáshoz (Mazo és mtsai, 1990; Breen és Harte, 1991; LaJeunesse és mtsai, 1995; Tripoulas és mtsai, 1996). Mindkét fehérjében megtalálható az AT-horog (AT-hook), PHD-ujj (PHD-finger), és a PEST-szekvenciák mellett egy SET-doménnek nevezett, megközelítőleg 130 bp hosszú konzervált szekvencia részlet is. A SET-domén nevét arról a három különböző, kromatinhoz kapcsolódó működéssel rendelkező génről kapta (*Suppressor of variegation 3-9*, *Enhancer of zeste*, *trithorax*), amelyben először írták le mint erősen konzervált szekvenciát (Mazo és mtsai, 1990; Breen és Harte, 1991; Jones és Gelbart, 1993; Tschiersch és mtsai, 1994). Az is kiderült, hogy a TRX és az ASH1 fehérje képes egymással (*in vitro*) kölcsönhatásba lépni a SET doménen keresztül (Rozovskaia és mtsai, 1999).

Sikerült azonosítani a *bxd* régióban egy rövid DNS szakaszt, amelyhez a TRX és az ASH1 fehérje specifikusan képes kötődni és az adott rövid *bxd* szekvenciát tartalmazó transzgenikus rendszerben a riporter gént aktiválni. Ezt a DNS szakaszt *Trithorax* *Reaktív Elemnek* (*Trithorax Response Element*), rövidítve TRE-nak nevezték el (Rozovskaia és mtsai, 1999).

A SET-domént az emlősökben, a növényekben, sőt a baktériumban is megtalálták; a jelenleg ismert SET domén tartalmú fehérjék száma 600 feletti. A SET domént tartalmazó fehérjéknek általában a génaktivitás szabályozásához van közük (Jenuwein és mtsai, 1998), de a domén pontos funkciójáról sokáig semmit sem tudtunk. Az első felismerés az volt, hogy számos növényi SET domént tartalmazó fehérje *Protein-Metil Transzferáznak* (PRMT) bizonyult (Klein és Houtz, 1995; Zeng és mtsai, 1998). Ezek után bizonyították, hogy a

humán SU-VAR39H, és ennek *S. pombe* homológja (CLR-4) egyaránt saját metil-transzferáz aktivitást mutat. Különösen fontos, hogy a SU-VAR-3-9H specifikusan metilálja a hiszton H3-at a 9. lizin aminosavon (H3K9), és ehhez a specifikus aktivitáshoz a SET domén jelenléte alapvetően fontos (Rea és mtsai, 2000). Bár a TRX és az E(Z) fehérjéknek sokáig nem sikerült hiszton-metil-transzferáz aktivitását kimutatni (Rea és mtsai, 2000; Jenuwewein, 2001), lehetséges, hogy a SET-régió szerepe a specifikus hiszton-kötés. Legújabban sikerült bizonyítani, hogy a TRX fehérje valóban asszociálódik a nukleoszómákkal, sőt, ez a kötés a SET doménon keresztül történik, szükség van hozzá a hiszton farkakra és specifikus a H3 és H4 hisztonokra (Katsani és mtsai, 2001). A TRX SET doménjében egy erősen konzervált glicin (G₃₆₀₁) szerinre cserélése homozigóta állapotban homeotikus fenotípust eredményez (Stassen és mtsai, 1995). A keletkezett pontmutáció (*trx*^{Z11}) amellet, hogy súlyos homeotikus transzformációkhoz vezet, hemizigóta állapotban bábletális (Breen, 1999). A mutáció beépítése a TRX SET doménbe *in vitro* erősen lecsökkenti a hiszton kötést (Katsani és mtsai, 2001). A TRX élesztő homológjában (*SET1P*), az analóg pontmutáció a telomerikus silencing zavarához vezet (Nislow és mtsai, 1997), további támogatást nyújtva annak a hipotézisnek, hogy a SET domén adott része valóban erősen konzervált szerepű, és ez összefügg annak hiszton kötő képességével.

2.3.4. Hiszton-metil-transzferáz aktivitású TRX-G fehérjék és komplexek

A TRITHORAX-csoportba tartozó másik SET-domént tartalmazó fehérjéről az ASH1-ről a legutóbbi időkben kiderült, hogy hiszton-metil-transzferáz aktivitással rendelkezik (Beisel és mtsai, 2002). Bebizonyosodott, hogy az ASH1 fehérje képes a hiszton H3 4-es és 9-es lizin aminosavának metilálása mellett a hiszton H4 20-as pozíciójú lizinjét is metilálni. Az említett trivalens metiláció összetett szerepet tölt be. A H3-K4 metiláció megakadályozza a PC és a p55 inaktíváló fehérjék interakcióját az ASH1 által aktivált szabályozó szakaszokkal, míg a H4-K20 metiláció a HP1 interakciót gátolja. Emellett a H3-K4, K9 metiláció együttes jelenléte

interakciós felszínt biztosít az aktiváló szerepű BRAHMA-komplex kötődéséhez. *In vivo* kromatin immuno-precipitációs kísérletek bizonyították, hogy a harmadik lábdiszkuszban bekövetkező ASH1-függő *Ubx* aktiváció a promóter régió környezetében a H3-K4, K9 metilációjával jár (Beisel és mtsai 2002).

Petruk és munkatársai (2001) izoláltak egy a **TRX** fehérjét tartalmazó komplex-et, melyet trithorax acetilációs komplexnek neveztek el (Trithorax Acetylation Complex: TAC1). A komplex tartalmazza a **TRX**, a **NEJ** (dCBP), és a **SBF** fehérjéket. A CBP-hez hasonló módon a TAC1 képes a nukleoszómák magi hisztonjainak acetilációjára, valószínűsítve azt a feltételezést, hogy ez az acetilációs működés szükséges a génaktivitás epigenetikus megőrzéshez. Azt találták, hogy a dCBP és az SBF1 fehérje sok, már ismert TRX kötőhelyen specifikusan kapcsolódik a nyálmirigy óriáskromoszómákhoz, így a BX-C-nek megfelelő helyen is. Ismert, hogy a *trx* génben bekövetkező mutációk csökkentik az *Ubx* aktivitást. A szerzők bebizonyították, hogy a dCBP fehérjét kódoló gén mutációja szintén csökkenti mind az endogén *Ubx* aktivitást, mind az *Ubx* regulátor régió szabályozása alatt álló transzgén aktivitását. A TRX, a dCBP, és a SBF1 egymással fizikai kapcsolatban állnak, és együttműködnek a homeotikus génaktivitás szabályozásában.

2.3.5. Nukleoszómák mozgatására képes komplexek

Bizonyos TRX-G fehérjéről bebizonyosodott, hogy nukleoszómák mozgatására képes, evolúciósan konzervált komplexek alkotói, és szerepük a génműködés szabályozásában általános. Így a *Drosophila* *brm*, *mor*, *osa* és *snf1* génekről kiderült, hogy az élesztő párosodási-csoport váltást (mating-type switch) befolyásoló (Switch: SWI), illetve speciális indukálható enzimek aktivitását befolyásoló (Sucrose Non Fermenting SNF) komplexek tagjaival rokon fehérjéket kódolnak (Carlson és mtsai, 1984; Neigeborn és Carlson, 1984; Elfring és mtsai, 1994; Collins és mtsai, 1999; Dingwall és mtsai, 1995). Működésükben is rokon komplexek élesztőben (Gavin és mtsai, 2001) és emberben is (Phelan és mtsai, 1999) a

nukleoszómáknak a körük tekert DNS-hez képesti elmozdulását katalizálják. A 2 MDa méretű SWI/SNF komplexek viszonylag kis számban vannak jelen a sejtben (élesztősejtenként kb. 100 komplex) és számos gén aktivitásának regulációjában vesznek részt (Sudarsanam és mtsai, 2000), de a nukleoszómák mozgatására más összetételű ATP-függő komplexek is képesek (Peterson, 2000). Míg fenti típusú komplexek ATP-áz alegységei a bromodomén tartalmú SWI2/SNF2 (*brm*) homológok, addig más komplexekben más típusú DNS-függő ATP-ázok vesznek részt. Az ISWI-típusú ATP-ázok SANT-domént, a CHD-típusú enzimek, mint például az MI-2 chromo-domént és cink-ujjakat (PHD-finger) tartalmaznak (Peterson, 2000). A különböző ATP-ázt használó komplexek biokémiai tulajdonságaikban és a nukleoszóma átépítés mechanizmusában is különböznek egymástól (Boyer és mtsai, 2000; Brehm és mtsai, 2000; Guschin és mtsai, 2000).

A *Drosophila Iswi* gén mutációja nagyon gyenge hatással van a homeotikus génműködésre (Deuring és mtsai, 2000). Biokémiaailag azonban sikerült három ISWI tartalmú nukleoszóma átépítő komplexet izolálni *Drosophila* embrió kivonatból. A Nucleosome Remodeling Factor, NURF (Tsukiyama és mtsai, 1995, Tsukiyama és Wu, 1995), az ATP-dependent Chromatin-Assembly and -remodeling Factor, ACF (Ito és mtsai, 1997) és a Chromatin Accessibility Complex, CHRAC (Varga-Weisz és mtsai, 1997). komplexek ATP-áz egysége egyaránt az önálló nukleoszóma mozgatásra is képes ISWI (Corona és mtsai, 1999).

Erős homeotikus fenotípusa van a biokémiaailag legkorábban azonosított transzkripció aktivátor, a szekvenciaspecifikus DNS kötésre képes GAGA-faktort kódoló *Trithorax-like* (*Trl*) gén mutánsainak (Farkas és mtsai, 1994). A GAGA-faktor kötőhelyei megtalálhatóak a BX-C homeotikus génjeinek promóterein, és *in vitro* a fehérje képes az *Ubx* gén aktivitásának fokozására (Biggin és Tijan 1988; Soeller és mtsai, 1993; Granok és mtsai, 1995;). A GAGA-faktornak biztosan szerepe van nukleoszóma mentes DNS szakaszok létrehozásában és

fenntartásában (Tsukiyama és mtsai, 1994). A BX-C-ben nemcsak promóter közeli aktivátor elemek, hanem több ismert PRE szakasz is többszörös GAGA kötőhelyeket tartalmaz. Ezért a GAGA faktornak szerepe lehet az aktiváló és az inaktiváló rendszer működésében egyaránt.

2.4. AZ *ENHANCER OF ZESTE* GÉN SZEREPE A KROMATINSZERKEZET KIALAKÍTÁSÁBAN

Az *E(z)* gén közel száz allélját különböző céllal tervezett mutánsizolálási rendszerekben azonosították. Bizonyos allélokat a sejtciklus-folyamatok megzavarodását tükröző kis imaginális diszkuszt hordozó késői lárvális-, kora-báb letális fenotípusuk alapján (Shearn és mtsai, 1971), másokat a párosodás-függő *zeste-white* interakciót domináns módon befolyásoló mutációkként azonosítottak (Kalisch és Rasmuson, 1974; Shearn, 1974), több allél alacsony mitotikus indexet és hibás kromoszóma szegregációt okoz (Phillips és Shearn, 1990). A funkcióvesztéses allélkombinációk Pc-fenotípusúak (Jones és Gelbart, 1990; Phillips és Shearn, 1990), viszont az általunk izolált funkciónyeréses allél, és emellett más hipomorf hőérzékeny allélok is *trx*-szerű fenotípust mutatnak (Bajusz és mtsai, 2001; közöletlen adatok). Az allélok teljesen új csoportját jelentik az antimorf nanos-szuppresszorok, amelyek a korai embriogenezis során a maternális *gap*-gén reguláció szintjén hatnak (Pelegri és Lehman, 1994). Hőmérséklet-érzékeny allélok segítségével sikerült kideríteni, hogy a normális *E(z)* fehérje hiánya a petefejlődés korai (5. stádium) leállásához vezet (Phillips és Shearn, 1990). Mindezek mellett több *E(z)* allélról bizonyították, hogy a heterokromatinizációs folyamatokban is szerepet játszik, hiszen PEV-módosító hatásuk van (Laible és mtsai, 1997).

A gén neve az elsőként izolált allél *zeste*-fenotípusra gyakorolt hatását jelzi. A vad *ZESTE* fehérje a *white* gén DNS-kötő transzkripció faktor, a *zeste*¹ mutáns allél (*z*¹) pedig olyan funkciónyeréses mutáció, amely homozigóta állapotban inaktiválja a *white* gént (Gans 1953; Jack és Judd 1979; Gelbart és Wu 1982; Zachar, Chapman és Bingham 1985; Pirrotta, 1995). Ezért *z*¹ háttérben a két párosodó, vad *white* kópiát tartalmazó nőstények szemszíne

világos narancssárga, a hímeké pedig piros (a *white* gén a hímekben nem párosodhat, mert a csak egyetlen kópiában jelen lévő X-kromoszómán található).

Az *Enhancer of zeste* gén elsőként izolált, később funkcionyerésesnek bizonyuló allélját, az $E(z)^1$ -et (Kalisch és Rasmuson, 1974) azon tulajdonsága alapján találták meg, hogy képes a $zeste^1$ homozigóta nőstények narancs szemszínét tovább világosítani, és hímekben is dominánssá teszi a $zeste^1$ allél szemszínre gyakorolt hatását. Az elsőként izolált allél tehát a z^1 mediált párosodás-függő inaktivációt, egyfajta kromatinszintű repressziót erősített. Az első funkcionyerésesnek bizonyuló allél revertánsaiként állították elő a funkcióvesztéses allélokat az $E(z)^1$ hímek barna szemszínének megszűnése, vad piros szemszínné alakulása alapján. Az így keletkezett revertánsok tüzetesebb vizsgálata azt mutatta, hogy a funkcionyeréses *zeste*-enhanszer fenotípus nem csupán revertált, hanem a keletkezett új mutációk *zeste*-szuppresszorok. Ebből az következik, hogy a *white* génen z^1 háttérben létrejövő inaktivációhoz szükséges a vad $E(z)$ fehérje. Valójában tehát a fehérje a többi *zeste*-szuppresszorhoz hasonló represszor funkciót lát el. A *zeste*-interaktor gének közül többről, köztük az $E(z)$ -ről is bebizonyosodott, hogy a *bithorax*-komplex inaktív állapotának fenntartásában hasonló epigenetikus represszor szerepet játszanak (Wu és mtsai, 1989; Jones és Gelbart, 1990; Adler és mtsai, 1989; Soto és mtsai, 1995; Wu és Howe, 1995).

Az $E(z)$ gén amorf alléljai gyenge domináns poszterior transzformációkat mutatnak, és homozigóta állapotban általában korai bábletálisak. Az $E(z)$ egyik antimorf allélja, az $E(z)^{S1}$, egyértelmű domináns poszterior irányú homeotikus transzformációkat mutat. A kikelő állatok közel egyharmada a második pár lábon is szex fésűt hordoz. Az $E(z)^{S2}$ allélra homozigóta anyákat restriktív hőmérsékleten petéztetve olyan erősen transzformált embriókat nyerhetünk, amelyeknek minden szelvénye a leghátsó potrohszelvényre (A8) hasonlít, és embrionális korban elpusztulnak (Wu és mtsai, 1989; Phillips és Shearn 1990), ami tipikus „Polycomb” fenotípus.

Kiderült, hogy az $E(Z)$ fehérjének a poszterior *gap*-génnek HUNCHBACK által kialakított repressziójának további fenntartásában is van szerepe. Pegri és Lehmann izolálta a nos-szuppresszor $E(z)^{\text{son}}$ allélokat. Kísérletük alapja az volt, hogy olyan mutációkat kerestek, amelyek a $hb^{7M}nos^{L7}/nos^{L7}$ embriók fenotípusát szuppresszálják, azokat életképessé és fertilissé teszik. Az izolált antimorf $E(z)^{\text{son}}$ allélok mellett más rendszerekben izolált ismert funkcióvesztéses $E(z)$ alléloknak is szignifikáns nos-szuppresszor hatását sikerült kimutatniuk (Pegri és Lehman, 1994). Mindezek alapján bizvást állíthatjuk, hogy az $E(Z)$ fehérje által mediált kromatin folyamatok sokrétűek és központi jelentőségűek.

A dolgozat tárgyához szorosan nem kapcsolódó, de annak megértését megkönnyítő további általános információkat, terjedelmi okokból a Függelékben helyeztem el, a kékkel jelzett hivatkozások internetes linkeket tartalmaznak az említett génekhez, doménekhez, egyéb addicionális információforrásokhoz.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. DROSOPHILA TENYÉSZET ÉS TÖRZSEK

A *Drosophila* törzsek fenntartásához szokásos élesztős-kukoricadarás muslica táptalajt használtunk. A táptalaj penészedését 0,53 % propionsav és 0,053 % foszforsav hozzáadása gátolja. Azokban a kísérletekben, ahol a n-butirát hatását vizsgáltuk, a propionsavat és foszforsavat 0, 15% Tegosept M-mel helyettesítettük. A megadott koncentrációjú n-butirátot (Merck) 2M koncentrációjú pH6.8 vizes oldatból mértük bele a médiumba, miután annak hőmérséklete 57°C alá csökkent. (Reuter és mtsai, 1982). A petéztetéseket almaszörpöt tartalmazó táptalajon végeztük. Kísérleteinket általában 25°C-on *en masse* végeztük, az ettől való eltérést az adott kísérlet leírásánál külön jelezzük. A keresztezésekhez használt törzsek leírását Lindsley és Zimm 1992-es munkája tartalmazza, első említésükkor és a rövidítések jegyzékében internetes linkeket hordoznak, számítógépen közvetlenül elérhetők, vagy kikeresethetők a www.flybase@indiana.edu weboldalon.

3.2. ÁLTALÁNOS MÓDSZEREK

3.2.1. EMS mutagenézis

Fab-7¹/Fab-7¹ homozigóta hímeket 6 óra éheztesítés után 0,025M etil-metán-szulfonátot (EMS) tartalmazó 1%-os cukoroldattal etettünk öt órán át. A kezelés után a kezelt hímeket 50-es csoportokban 50 szűz Oregon-R nőtényhez kereszteztük. Megközelítőleg 80000 utódot vizsgáltunk át.

3.2.2. Komplementáció ismert, *trithorax*-csoportba tartozó mutánsokkal

A *Trithorax-mimic* mutáció komplementációs analíziséhez felhasználtuk az ismert harmadik kromoszómás *trithorax* génnek hozzáférhető amorf mutánsait (*Df(3R)red-P93*, *brm²*, *osa²*, *mor¹*, *vd⁴*, *urd²*, *kto¹*, *ash1²²* *ash2¹*, *snr1^{P1}*, *sls¹*, *Tr^{R85}*). A *Trm* egyetlen ismert *trx*-csoportba tartozó mutációval sem volt letális, de a *Df(3R)red-P93*, *brm²*, *osa²*, és *ash1²²*,

ash2¹ mutációk *transz*-helyzetben a trithorax fenotípus erősödéséhez és az életképesség csökkenéséhez vezettek.

3.2.3. Röntgen-reverzió

A röntgensugárral végrehajtott mutagenézis az erős domináns fenotípust mutató *Trithorax-mimic* mutáció revertálására szolgált. A besugárzást *Trithorax-mimic/TM6 Tb* hímeken végeztük (4000 rad, 1000 rad/ perc, 0,5 mm alumínium szűrő). A mutagenizált hímeket *TM3 Sb Ser/TM6 Tb* nőtényekkel kereszteztük. A domináns fenotípust nem mutató egyedeket szelektáltuk. A fenotípusos reverziót okozó új mutációkat kromoszómára lokalizáltuk majd törzsbe állítottuk. A mutáns törzseket citológiaiilag, ismert *E(z)* allélokkal történő komplementációval és genom *Southern*-analízissel vizsgáltuk.

3.2.4. A letálfázis meghatározása

Az eredeti *Trm* mutáció, és az izolált revertánsok letálfázisát *TM6 Tb* balanszer felett állapítottuk meg. A homozigóta állatok normális méretű hosszú lárvák és bábok, míg a heterozigóták a balanszeren lévő domináns *Tb* marker-mutáció jelenléte miatt rövidek. Az eredeti izolátum embrionális letalitást mutatott, hosszú lárvák és bábok egyáltalán nem jelentek meg, és a lerakott peték között sosem találtunk homeotikusan transzformáltakat. A későbbiekben *ru h th st sr e ca* homozigóta életképes térképező törzs segítségével sikerült meiotikus rekombinációval eltávolítani a *Trm*-közeli, embrionális letalitásért felelős háttér-mutációt (2.2.10.1). Az így megtisztított *Trm* izolátum homozigóta állapotban késői, pharat adult letalitást mutatott. Az izolált revertánsok az eredeti izolátummal embrionális letálisak, míg a rekombinánssal pharat adult letálisak, a *Trm revertáns/Trm* rekombináns kombinációkat a *Trm* homozigótánál enyhébb mértékű homeotikus transzformációk jellemzik.

3.2.5. Nyálmirigy kromoszómapreparátum készítés

A harmadik kromoszómán mutációt hordozó balanszeres hímeket *ebony/ebony* szüzekhez kereszteztük. A használt balanszer kromoszómák mindegyike hordozta az *ebony* markergént, amely homozigóta formában a lárvák elülső trachea nyílásának megsötétedését

okozza. A világosabb trachea nyílású lárvákból készítettünk kromoszóma preparátumot, mert ezek a vizsgálandó mutáns kromoszómát egy átrendeződést nem mutató kromoszómával szemben hordozzák (*mutáció/ebony*).

A vizsgálathoz jóltáplált, naponta átrázott fiolákon rendszeresen élesztővel etetett, 18°C-on növesztett, harmadik stádiumos vándorló lárvákra van szükség. A lárvákból egy csepp 45%-os, frissen készített ecetsavban, szilikonizált tárgylemezen, óvatosan kiboncoltuk a nyálmirigyeket, amelyek ez alatt az idő alatt fixálódtak is. Majd a nyálmirigyeket nedveskamrában, tejsav és 60% ecetsav 1:1 arányú keverékében 2% orceint tartalmazó csepp aljára helyezve 15-20 percig festettük. Ezután orceint nem tartalmazó többszörös mennyiségű tejsavas-ecetsavas oldattal való hígítással mossuk a nyálmirigyeket, majd egy gondosan letisztított szilikonizált tárgylemezre, egy csepp tiszta tejsavas-ecetsavba helyezzük őket. Fedőlemezzel buborékmentesen lefedjük a preparátumot. Szűrőpapírral eltávolítjuk a felesleges folyadékot, majd hüvelykujjal, egyetlen erőteljes mozdulattal szétnyomjuk a nyálmirigyeket. A lefedett preparátumot a fedőlemezt körömlakkal vastagon körbefestve légmentesen lezárjuk és fáziskontraszt mikroszkóppal vizsgáljuk. A preparátumot szobahőmérsékleten tárolva, 1-2 hónapig használhatjuk.

3.2.6. Az $E(z)^{Trm}$ nos-szuppressziójának vizsgálatához alkalmazott petéztetés

Az $E(z)^{Trm}$ allél nos fenotípust szuppresszálo hatásának megállapításához Lehmann és Pelegri (1994) $E(z)^{son}$ allélokra kidolgozott módszerét adaptáltuk, hogy a már vizsgált $E(z)$ allélokkal összevethető adatokat kapjunk. 30-100 megfelelő genotípusú 1-3 napos szűz nőtényt 50 *Oregon-R* hímhez kereszteztünk, majd almaszörpös táptalajon 5 cm átmérőjű Petri-csészéken, 25°C-on petéztettünk. A petéztető táptalaj felületére sűrű élesztőoldat-csíkot kentünk, és a legyek bejuttatása után a petéztető eternit csöveket a Petri-csészékhez ragasztottuk, majd sötét, csendes helyen 6 óráig petéztettünk. A petéztető Petri-csészét 6

óránként cseréltük, a régieket 25°C-on további 20-24 órát inkubáltuk, majd a teljesen kifejlett embriók kutikuláját vizsgáltuk.

Lehmann és Pelegri (1994) megállapították, hogy a nos-szuppresszor fenotípus penetranciája a nőstények öregedésével csökken, ezért a petéztetéshez csak 6 napnál fiatalabb nőstényeket használtunk.

3.2.7. Embrionális kutikula preparátum készítése

A petéztetés kezdete után 22 órával az embriókat nedves ecsettel eltávolítottuk a táptalaj felszínéről, egy kisméretű szitában gyűjtöttük össze és csapvízzel tisztára mostuk. Majd 0,5%-os Chlorox oldattal (10-szeres hígítás) fél percig inkubáltuk, hogy eltávolítsuk a chorionburkot és csapvízzel öblítettük. A felesleges vizet leitattuk az embriókról, majd alig nedves ecsettel kb 50-es csoportokban, tárgylemezre csöppentett tejsavas Hoyers-médiumba (1: 1 tejsav Hoyers) helyeztük át (Wieschaus és Nüsslein-Volhard, 1986). A preparátumot lefedtük és 65°C-os termosztált lapon feltisztulásig inkubáltuk, majd 200-szoros nagyításnál, fáziskontraszt mikroszkóppal, felhúzott kondenzor mellett határoztuk meg az abdominális szelvények számát az egyes embriókban.

3.2.8. Adult kutikula preparátumok készítése

A kutikula preparátumok elkészítéséhez Duncan (1982) módszerének módosított formáját használtuk. A preparálásra szánt állatokat glicerín és 96%-os etil-alkohol 3:1 térfogat arányú keverékében tároltuk. A preparálás megkezdése előtt a potrohot legalább 5 percre 96%-os alkoholba helyeztük. A kutikula megkeményedése után az abdoment egy éles hagyományos borotvapengével a hát közepén óvatosan kettévágtuk anélkül, hogy a sterniteket átvágtuk volna, majd a kettévágott abdomeneket legalább 10 percre glicerínbe helyeztük. Az ily módon megpuhított, kettévágott kitines kültakaróról eltávolítottuk a beleket és tracheákat, majd óvatosan szétterítettük a félbevágott tergiteket. A preparátumot tárgylemezre cseppentett egy csepp 10%-os KOH-ba helyeztük át. Gondos kiigazítás után az abdominális kültakarót lefedtük, és fél órára 51°C-os termosztált lapra helyeztük. Ezután a feltisztult preparátumot

desztillált vízzel óvatosan leúszattuk egy kisméretű Petri csészébe. A leúsztatott, kisimult kültakarót külső oldallal felfelé egy csepp Hoyers-médiumba helyeztük át, lenyomtuk a csepp aljára, buborékmentesen lefedtük, majd néhány órára visszahelyeztük 51°C-os termosztált lapra, előbb súly nélkül, majd 15 perc eltelte után egy kisebb súly segítségével tovább simítva. A preparátum pormentes helyen, szobahőmérsékleten hosszú ideig tárolható.

3.2.9. A *Trithorax-mimic* mutáns genetikai interakcióinak vizsgálata

3.2.9.1. Adult fenotípusos interakciók vizsgálata

Az $E(z)^{Trm}$ törzsek életképessége és fertilitása rossz. Úgy találtuk, hogy idővel hajlamosak spontán megjelenő szuppresszorok felhalmozására genetikai háttérükben, melyek életképességüket és fertilitásukat növelik. Az $E(z)$ régiót a *TM6 Tb* nem balanszírozza tökéletesen, ezért a mutáció kis frekvenciával kirekombinál, és gyenge életképessége miatt kiszelektálódik. Ezért több független vonalat tartottunk fenn, a kísérletekhez lehetőleg a *TM3 Sb Ser* balanszeres vonalakat használtuk, melyek fenotípusát folyamatosan ellenőriztük, és csak az eredeti fenotípust megőrző vonalakat használtuk további kísérleteinkben. Az interakciós keresztezésekben a tesztelendő gének ismert, lehetőleg funkcióvesztéses alléljait mindkét irányból kereszteztük $E(z)^{Trm}$ -mel.

A kikelő legyeket a kelés teljes időtartama alatt többször gyűjtöttük. Ügyeltünk a túlnépesedés elkerülésére, és arra, hogy a frissen kikelő legyek ne ragadjanak a táptalajba. Ez különösen akkor fontos, amikor a vizsgált interakciós partner az $E(z)^{Trm}$ eredetileg is erős trithorax fenotípusát és redukált életképességét tovább súlyosbítja. Az $E(z)^{Trm}$ -et és a vizsgált potenciális interaktor mutációt, illetve balanszerét tartalmazó állatokat válogattuk, majd az állatokon a következő trithorax-szerű transzformációkat vizsgáltuk: az első és harmadik lábon megjelenő ektopikus apikális szőröket, a billér szárny irányú transzformációját, a prothoraxon és a metathoraxon megjelenő, normálisan szintén csak a mesothoraxra jellemző, ektopikus sternopleurális szőröket illetve a normálisan teljesen sötét 5. abdominális tergiten világosabb klónok megjelenését. Lehetőleg mindkét nemből legalább 50-50 transzheterozigóta állatot

analizáltunk. Gyengébb, kétséges hatású mutációk szükségessé tették a vizsgált egyedek számának emelését a tapasztalt különbség szignifikanciájának megállapítása érdekében. A *Trm*-et hordozó állatok azonosítását minden esetben kétségtelenné tette, hogy dominánsan markerelt $E(z)^{Trm}Fab-7^l$ kromoszómát hordozó törzset használtuk az interakciós keresztezésekhez.

Homeotikus transzformációk kvantitatív jellemzése érdekében a könnyen számszerűsíthető lábtranszformációkat használtuk. Hogy a kvantitatív analízist lehetővé tegyük, minden vizsgált genotípus esetében megszámloltuk az első és harmadik lábon nulla, egy, illetve két apikális szőrrel rendelkező állatok számát, mely az adott szelvényeknek a második potrohszelvény irányába történő transzformációját jelentette. Az apikális szőrök megjelenésének penetranciáját egy adott transzheterozigóta kombináció esetében a transzformációt mutató lábak/összes vizsgált láb százalékában adtuk meg. Súlyosabb transzformációt jelzett a billér szárny irányú transzformációja, illetve ektopikus sternopleurális szőrök megjelenése. Ezen transzformációk penetranciáját hasonlóképpen a transzformációt mutató oldal /összes vizsgált testoldal %-ában adtuk meg.

A tergitranszformációk jellemzésére egy háromlépcsős empirikus skálát állítottunk fel. A nulla szint egy közel vad típusú, alapvetően fekete (nem, vagy alig transzformált) 5. tegitet jelentett, melyen csak kisméretű szétszórt világos foltok lehettek a tergít elülső szegélyén. Egyes szintre az olyan 5. tergítű legyeket soroltuk, melyeknél a tergitnek körülbelül egyharmadát borították a világos klónok (az $E(z)^{Trm}/+$ hímek túlnyomó többsége ilyen fenotípust mutat). Kettes szintre azokat a hímeket soroltuk, akiknél a tergít több mint felét összefüggő nagy kiterjedésű világos klónok borították. A besorolás után a lábakhoz hasonló penetrancia kiértékelést alkalmaztunk. Még súlyosabb a megjelenő fenotípus, ha az $E(z)^{Trm}$ homozigóta illetve hemizigóta állapotban van jelen. Ebben az esetben a rendkívül erősen transzformált állatok kifejlődnek ugyan, de képtelenek kimászni a bábbórból. Ezeket a

pharat-adult állatokat *Tb* marker mutációt hordozó balanszerek mellett ki tudtuk választani, majd teljesen pigmentált állapotban óvatosan, órás csipesszel kiemeltük a bábbőrből és a maguktól kikelő állatokhoz hasonló paraméterek alapján jellemeztük.

Több esetben tapasztaltunk a balanszer kromoszóma fenotípust befolyásoló hatását, ezért kísérleteinkben a szuppresszor, illetve enhanszer hatás erősségét az $E(z)^{Trm}/Oregon-R$ kombinációhoz viszonyítva adtuk meg.

3.2.9.2. Az embrionális nos-szuppresszor fenotípus vizsgálata

Az $E(z)^{Trm}hb^{7M}nos^{L7}$ rekombinánsnak a nos fenotípust módosító hatását vizsgáltuk $E(z)^{Trm}hb^{7M}nos^{L7}/nos^{L7}e$, $E(z)^{Trm}hb^{7M}nos^{L7}/E(z)^{son1}nos^{L7}e$, $E(z)^{Trm}hb^{7M}nos^{L7}/E(z)^{son2}nos^{L7}e$, $E(z)^{Trm}hb^{7M}nos^{L7}/E(z)^{son3}nos^{L7}e$ transzheterozigóta nőstényektől és *Oregon-R* hímeiktől származó embriók abdominális fenotípusának jellemzésével. Az $E(z)^{son1}nos^{L7}e/TM3$, $E(z)^{son2}nos^{L7}e/TM3$, $E(z)^{son3}nos^{L7}e/TM3$ törzseket Ruth Lehman bocsátotta rendelkezésünkre. Az $E(z)^{Trm}hb^{7M}nos^{L7}HN1$ és $HN2$ jelű rekombinánsát pedig a 3.2.10.3 pontban leírtak szerint hoztuk létre.

A megfelelő transzheterozigóta nőstény kombinációkat a fent leírt törzsek keresztezésével hoztuk létre. A megfelelő genotípusú nőstényeket négyóránként gyűjtöttük, és azonnal *Oregon-R* hímekkel kereszteztük. A keresztezéseket egy éjszakán keresztül üvegen etettük, majd további maximum 5 napig petéztettük a 3.2.6. pontban leírtak szerint. A 22-28 órás embriókból a 3.2.7. pontban leírtak szerint kutikula preparátumot készítettünk. A mikroszkóposan vizsgált embriókat három fenotípusos kategóriába soroltuk. A háromnál kevesebb abdominális szelvénnel rendelkező embriókat „nem szuppresszáltaknak”, a 3-7 abdominális szelvénnel rendelkezőket „szuppresszáltaknak” a 8 látható abdominális szelvényűeket pedig „vad”-aknak neveztük. A nos-szuppresszió penetranciáját a „szuppresszált” és „vad” fenotípusú embriók együttes számának és az összes vizsgált embrió számának hányadosával jellemeztük. Annak érdekében, hogy az $E(z)^{Trm}hb^{7M}nos^{L7}$

rekombinánsra kapott eredményeink összevethetőek legyenek az ismert $E(z)^{son}$ allélok saját *nos*-szuppresszor hatására vonatkozó eredményekkel, kontrollként megvizsgáltuk az $E(z)^{son1} nos^{L7} e/hb^{7M} nos^{L7}$, $E(z)^{son2} nos^{L7} e/hb^{7M} nos^{L7}$, $E(z)^{son3} nos^{L7} e/hb^{7M} nos^{L7}$, illetve $E(z)^{son1} nos^{L7} e/nos^{L7} e$, $E(z)^{son2} nos^{L7} e/nos^{L7} e$, $E(z)^{son3} nos^{L7} e/nos^{L7} e$ kombinációk *nos*-szuppresszor hatását is az előzőekkel párhuzamosan, ugyanolyan körülmények melletti petéztetésekben. Ellenőriztük a $nos^{L7} e/nos^{L7} e$ illetve $nos^{L7} e/hb^{7M} nos^{L7}$ nőstényektől származó utódok fenotípusát is.

3.2.10. Rekombinációval előállított kromoszómák

3.2.10.1. A *Trm* kromoszóma megtisztítása a másodlagos mutációktól

A *Trithorax-mimic* (*Trm*) mutáns eredeti izolátuma késői embrióletalitást mutatott homozigóta formában. A mutáció az $E(z)$ lokuszt átfedő *Df(3L)lxd* delécióval, és funkcióvesztéses $E(z)$ allélokkal pharat adult letálisnak bizonyult. A revertánsok az átfedő delécióval és $E(z)$ pontmutánsokkal bábletálisok voltak. A *Trithorax-mimic* mutáns és revertánsai mindig embrióletálisak, ezért valószínűnek tűnt, hogy az eredetileg izolált mutáns kromoszómán másodlagos, korai letalitást eredményező független mutáció, vagy mutációk találhatók.

Mivel fontos volt a mutáns saját homozigóta fenotípusának ismerete, ezért meiotikus rekombinációval tisztítottuk meg a mutáns kromoszómát a másodlagos mutációktól. $E(z)^{Trm}$ *Fab-7^l/TM3* hímeket először *ru h th st cu sr e ca/ru h th st cu sr e ca* szüzekhez (Törzsszám: BL-576), majd a kikelő $E(z)^{Trm}$ *Fab-7^l/ru h th st cu sr e ca* szüz nőstényeket *ru h th st cu sr Pri e ca/TM6 Ubx* hímekekkel kereszteztük. A második keresztezés (F2) utódai között a domináns markert és a mutáció által érintett régiót (68B) jobbról és balról határoló markerek legalább egyikét (*th*, *st*) mutató utódokat választottunk ki. A jelölt rekombináns hímekek egyesével *TM3SbSer/TM6 Tb* nőstényekhez kereszteztük, majd a kikelő *rekombináns/TM6Tb* hímekek $E(z)^{Trm}$ *revertáns/ TM6 Tb* szüzekhez kereszteztük. A *Tb* mutációt nem hordozó (tehát *revertáns/rekombináns*), hosszú bábok megjelenése jelezte a korai letalitást okozó mutáció

eltűnését az $E(z)^{Trm}$ kromoszómáról. Az ilyen, az $E(z)^{Trm}$ revertánsokkal késői letalitást mutató rekombinánsokat a megfelelő kettős balanszeres keresztezésből kikelő *rekombináns/TM3SbSer* balanszert hordozó szüzek és hímek egymás közti keresztezésével állítottuk törzsbe, és ezek saját homozigóta fenotípusát illetve a különböző rekombináns vonalak egymással adott fenotípusát vizsgáltuk.

3.2.10.2. $E(z)^{Trm}$ *e211* rekombinánsok létrehozása

Ahhoz, hogy a *Pp1-87B* foszfatáznak a homozigóta $E(z)^{Trm}$ mutáns fenotípusára gyakorolt hatását vizsgálni tudjuk, szükséges volt $E(z)^{Trm}Pp1$ rekombinánsok előállítás. Legkíváncsiabbnak egy molekulárisan ismert null allél, a $Pp1^{87D}$ génen belüli molekuláris deléciót hordozó *e211 (87Bg-3)* rekombinálása tűnt egy másodlagos letális mutációktól megszabadított, recesszíven markerelt $E(z)^{Trm}$ homozigóta pharat adult kromoszómára. Ennek megfelelően az $E(z)^{Trm} st sr e (rec4) / TM3 Sb Ser$ hímeket *e211/TM3 Sb Ser* szüzekhez, majd a kikelő $E(z)^{Trm} st sr e / e211$ nőstényeket *ru h th st cu sr Pri e ca/TM6 Ubx* hímekhez kereszteztük. Az F2 generációban $Pp1^{87D}$ citológiai régiót határoló markerek (*sr e*) legalább egyikének eltűnésére, de az $E(z)^{Trm}$ -hez igen közel eső *st* marker jelenlétére kerestünk, és a jelölt hímeket *TM3 Sb Ser/TM6 Tb* szüzekhez keresztezve törzset alapítottunk.

A rekombináns vonalakat $Pp1^{87D}$ -t átfedő *Df(3R)E079*, illetve az $E(z)$ gént átfedő *Df(3L)E(z)^{IR3}* deficienciával ellenőriztük. Az egyik deficienciával sem komplementáló vonalakat használtuk a további kísérletekhez.

3.2.10.3. $E(z)^{Trm} hb^{7M} nos^{L7}$ rekombinánsok létrehozása

Lehmann és Pelegri (1994) *nos*-szuppresszor izolálási kísérletében nos^{L7} kromoszómán indukáltak mutációkat és ezek *nos*-szuppresszor hatását $hb^{7M} nos^{L7}$ kromoszómával szemben vizsgálták. Mivel mi nemcsak arra voltunk kíváncsiak, hogyan hat az általunk izolált $E(z)^{Trm}$ a $nos^{L7}/hb^{7M} nos^{L7}$ anyáktól származó embriók abdominális fenotípusára, hanem arra is, hogyan módosítja a fenti szerzők által izolált $E(z)^{son} nos^{L7}$ kromoszómát tartalmazó antimorf $E(z)$ allélok *nos*-szuppresszor hatását, ezért szükség volt

$E(z)^{Trm} hb^{7M} nos^{L7}$ rekombinánsok létrehozására. A rekombinációhoz $E(z)^{Trm} Fab-7^1/TM3 Sb Ser$ nőtényeket $hb^{7M} nos^{L7}/TM3 Sb Ser$ hímekekkel, majd a kikelő $E(z)^{Trm} Fab-7^1/hb^{7M} nos^{L7}$ nőtényeket $TM3 Sb Ser/TM6 D^3$ hímekekkel kereszteztünk. A kikelő F2 hímek közül a nem $Fab-7^1$ fenotípusú, de domináns $E(z)^{Trm}$ fenotípust mutató egyedeket egyenként törzsbe állítottuk, majd közülük a hb^{7M} -t nem komplementáló rekombinánsokat teszteltük tovább nos^{L7} -lel. Itt a kikelő rekombináns/ nos^{L7} szüzeket *Oregon-R* hímekekkel kereszteztük, és az ilyen körülmények között sterilnek mutakozó rekombinánsokat tartottuk meg.

3.2.11. PRE szakaszt tartalmazó P-elemek ugratása

Homozigóta párosodás-érzékeny *iab-7* PRE-t tartalmazó inszertet hordozó $w/w; +/+; F12/F12$. szüzeket kereszteztünk transzpozáz-forrásként szolgáló $w/Y; Df(3r)C7ry^{85}/\Delta 2-3ry^+TM3$ hímekhez. Az utódok közül az inszertek ugrását lehetővé tevő $F12/Y; \Delta 2-3ry^+TM3$ hímeket külön-külön $w/w; SM6/Sp; TM3/CxD$ szüzekhez kereszteztünk, majd a szemszínt mutató utódokból független törzseket alapítottunk. Az izolált 76 független vonal közül 46% volt letális, 14% nem mutatott párosodás-függő inaktivációt, míg 38% párosodás-függőnek bizonyult. A homozigóta állapotban kikelő inszerteknek tehát közel háromnegyede mutatott párosodás-függő inaktivációt.

Hasonló módon végeztük a rövidebb *iab-7* PRE szakaszt hordozó inszert ugratását is. $w/w; +/+; H21/H21$. szüzeket kereszteztünk $w/Y; \Delta 2-3Cy/Sp; TM3/CxD$ hímekhez. Az utódok közül a $w/Y; \Delta 2-3 Cy/+; H21/TM3$ és a $w/Y; \Delta 2-3Cy/+; H21/CxD$ hímeket külön-külön $w/w; SM6/Sp; TM3/CxD$ szüzekhez kereszteztünk majd a szemszínt mutató $TM3/CxD$ genotípusú utódokból törzset alapítottunk.

Mindkét esetben a *miniwhite* riportergént hordozó állatok szemszíne alapján a P-elemet kromoszómára térképeztük. A független vonalakból törzseket alapítottunk és a heterozigóta és homozigóta állatok szemszínének összehasonlítása után a párosodás-érzékeny vonalakat tartottuk fenn és használtuk fel az interakciós vizsgálatokhoz.

3.3. IMMUNOLÓGIAI, MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI, BIOKÉMIAI MÓDSZEREK

3.3.1. Lárvális óriáskromoszómák immunohisztokémiai festése

A lárvális óriáskromoszómákat 18°C-on naponta átrázott és etetett keresztezésekből származó vad típusú és $z^l w^{IS}/+; E(z)^{Tm}/Df(3R)E(z)^{IR3}$ vándorló lárvákból állítottuk elő. A megfelelő genotípusú lárvák kiválasztása után a nyálmirigyeket egyenként 3,7%-os formaldehidet és 50% ecetsavat tartalmazó vizes oldatban boncoltuk ki. Gondosan megtisztított Super Frost tárgylemezre helyeztük őket, 10 µl boncoló oldatban 10x10 mm-es tiszta szilikonizált fedőlemezzel lefedtük. Itatóspapírral letakartuk, majd előbb gumikalapáccsal ütögetve, majd egyetlen nagy erejű nyomással szétterítettük. A preparátumot fáziskontraszt mikroszkóp alatt ellenőriztük, majd amennyiben a kromoszómák kellően kiterültek, a preparátumot folyékony nitrogénbe mártottuk, és a fedőlemezt szikével, egyetlen erőteljes mozdulattal lepattintottuk. A lepattintás után a preparátumot 1XPBS oldatban tároltuk, és még ugyanazon a napon felhasználtuk.

A preparátumokat affinitás-tisztított nyúl poliklonális anti-E(z) elsődleges ellenanyaggal (Carrington és Jones 1996) inkubáltuk. A primer ellenanyag aspecifikus komponenseit öt $Df(3R)E(z)^{IR3}$ homozigóta lárvával való preinkubációval, 200 µl-nyi 1:100-szoros hígítású PBS-oldatban (150 mM NaCl, 16 mM Na₂HPO₄, 4 mM NaH₂PO₄, PH 7,3) egy egész éjszakán át 4°C-on távolítottuk el. Másnap a lárvamaradványokat lecentrifugáltuk és a felülúszót hígítottuk tovább. A primer ellenanyagot lemezenként 10 µl mennyiségben 1: 1000 arányban 1 óráig alkalmaztuk szobahőmérsékleten. 30 perces festőkádban történő mosás után (PBS + 0,2 % np-40 és 0,2% Tween-20) a lemezeket kecskében termelt anti-nyúl IgG ellenanyag 1:5000-szeres hígításával inkubáltuk 2 órán át szobahőmérsékleten. Újra mostuk 30 percig, majd streptavidinnel konjugált torna-peroxidáz 1: 1000-szeres PBS oldatával inkubáltuk egy órát továbbra is szobahőmérsékleten. Ezután 5 percig inkubáltuk a festőpufferrel (0,1 M citromsav, 0,05M ammonium acetát PH 5,7 NH₄OH-val beállítva). Majd

rámértük a lemezekre a 10 µl frissen készített festőelegyet. A festőelegyet 980 µl festőpuffer, 20 µl DAB-oldat (25mg /ml törzsoldat, végső koncentráció 0,5 mg/ml 0,1 M TRIS PH 7,5-ben oldva) 2ml H₂O₂ (30%-os törzsoldatból 0,06% végső koncentrációra állítottunk be). Az előhívást mikroszkóp alatt ellenőriztük, a szignál megjelenése után a lemezeket 1xPBT-vel háromszor öblítettük.

3.3.2. Kompetens sejtek készítése

A kompetens sejtek készítéséhez XLI-Blue *Escherichia coli* törzset használtunk fel. A kompetens sejt előállításához az Inoue módszert használtuk (Inoue, 1990), a sejteket -80°C-on tároltuk.

3.3.3. A mutáns allélok szekvenálása

Az eredeti $E(z)^{Trm}$ allél szekvenálását Rick Jones laboratóriumában a más $E(z)$ allélok szekvenálásához kifejlesztett primer készlet alkalmazásával (Jones és Gelbart 1993) végeztük el hemizigóta $E(z)^{Trm}/Df(3L)E(z)^{IR3}$ lárvákból amplifikált DNS felhasználásával. A teljes kódoló régiót mindkét szálon megszekvenáltuk.

A Princetoni Egyetemen Tony Greenberg által izolált független allélt homozigóta lárvából a SET-domén régiót amplifikáló 5' GCTGTCGCTGCAAGGCTCAG (SET5) és 3' GGAGCACAAGAGTCGCCAAAGAAC (SET3) primerek segítségével végeztük el (denaturáció: 96°C 2 perc 1x; denaturáció 95°C 40 mp, annealing: 61.5 °C 40 mp, amplifikáció: 72°C 1 perc 10x; 94°C 40 mp, 60°C 40 mp 72°C 1 perc, 30x; 72°C 2 perc 1x). A genomikus DNS-ről keletkezett 813 bp termék kódoló részét automata szekvenátorral, az amplifikáló primerek segítségével, mindkét szálon szekvenáltattuk.

3.3.4. *In vitro* mutagenézis

A teljes, vad $E(z)$ fehérjét kódoló cDNS konstrukció pTβStop vektorba klónozása után PstI EcoRI kettős emésztés után izoláltuk a fehérje C-terminálisát kódoló 590 bp hosszúságú fragmentet, amelyet Bluescript KS EcoRI PstI helyre klónoztunk. Az *in vitro* mutagenézist ezen a klónozott 590 bp hosszú fragmenten végeztük el, a részben (28 bp hosszúságban)

átfedő Ezmut1 5' GCTATTCTTTGACTACAAATACGGACCCACGGAGCAGC és Ezmut2 5' GGGGTCCGTATTTGTAGTCAAAGAATAGCTCTTCGCCGGGC mutagenizáló primerek segítségével, melyek a 741. arginint kódoló AGA kodon lizint kódoló AAA kodonra alakításához vezettek, ezáltal *in vitro* létrehozva az $E(z)^{Trm}$ -ben bekövetkezett pontmutációt.

A PCR reakciókban 5, 10, 25, 35 és 50ng templátot és 125ng primert használtunk fel (95°C 30mp 1X; 95°C 30 mp, 55°C 1 perc, 68°C 8perc 15X; 72°C 30mp) Takara^{Ex} enzimet használtunk. A mutagenizáló PCR reakció után az eredeti (metilált) templát DNS-t 2 órás DpnI emésztéssel távolítottuk el, majd a reakcióelegy 5µl-ével XL1-blue sejteket transzformáltunk. A pozitív transzformáns klónok közül 10-et szekvenálással ellenőriztünk (Medigenomix). Majd a kiválasztott, csak a kívánt mutációt tartalmazó, egyébként a vad alléllal azonos szekvenciájú klónból a PstI EcoRI fragmentet visszaklónoztuk a kiindulási pTβStop vektorba a mutáns fehérje termeléséhez használt konstruktok előállításához.

3.3.5. Az E(z) fehérjék *in vitro* transzlációja

Az E(z) fehérjét kódoló DNS szakaszt a Bluescript-be EcoRI helyre klónozott E(z) B menekítő cDNS konstruktból (Jones és Gelbart 1993) kiindulva klónoztuk át az *in vitro* transzlációhoz és a sejtvonalban történő fehérjetermeléshez alkalmas vektorokba. Az 5' primer segítségével NdeI helyet építettünk a kódoló régió elé, míg a 3' primer megőrizte az EcoRI helyet. A teljes E(z) fehérje (760 aminosav) transzlációjához 5' primerként a CCCCCCATATGAAATAGCACTAAAGTGCCGC-t, 3' primerként az E(z) cDNS végéhez tervezett EcoRI hasítóhelyet tartalmazó CCCCCGAATTCAAACAATTTCATTTC primert alkalmaztuk. A PCR amplifikált (95°C 1perc 1X; 95°C 30 másodperc, 46°C 1 perc, 72°C 40 másodperc 40X; 72°C 5 perc Takara^{Ex} enzim segítségével) fragmenteket NdeI, EcoRI hasítás után Quiaquick kit segítségével tisztítottuk. A keletkezett 2280bp méretű terméket NdeI, EcoRI emésztett pTβStop vektorba klónoztuk. Az *in vitro* mutagenézissel

előállított, a kívánt mutációt tartalmazó, egyébként a vad alléllal azonos szekvenciájú Bluescript klónból származó PstI-EcoRI fragmentet átklónoztuk a kiindulási pTβStop vektorba a teljes hosszúságú mutáns fehérje termeléséhez használt konstrukt előállításához. A rövidebb *SAC-SET* fragmenteket a teljes hosszúságú inszertet tartalmazó vad és mutáns pTβStop klónokból, a C-terminális (273 aminosav hosszúságú, 819bp) E(z) SAC-SET domént kódoló fragment amplifikációjával állítottuk elő. 5' primerként a CCCCCCATATGGAGTTTAGCTTCGAGGATTTGCG oligót használtuk, 3' primerként pedig ugyanazt a primert, amivel a teljes hosszúságú inszertet is amplifikáltuk. A létrehozott konstrukciókban a kódoló inszerteket teljes hosszúságukban átfedő szakaszokon megfelelő szekvenáló primerek felhasználásával szekvenálással ellenőriztük (Medigenomix).

Az *in vitro* transzlációhoz TNTTM kapcsolt transzkripció-transzlációs nyúl reticulocita lizátum alapú kitet használtunk ([T7/T3 Coupled Reticulocyte Lysate System](#)). A jelöléshez T7 polimerázt 50 µl nyúl reticulocita lizátumot és 4 µl ³⁵S jelölt methionint alkalmaztunk ([\[³⁵S\] Methionine \(in vitro translation grade\)](#) Amersham 1000Ci/mmol, 10 mCi/ ml). A használt DNS templátot JET-quick maxiprep kittel ([GENOMED DNA purif](#)) tisztítottuk, és 1 µg-ot alkalmaztunk a jelölő reakciókban. A jelölő reakciót 30°C-on 90 percig inkubáltuk. A teljes reakcióelegy 5%-át SDS próba-pufferben 100°C-on 10 percig denaturáltuk, és a továbbiakban 10%-os SDS polyakril-amid gélen szeparáltuk a keletkezett termékeket. A gél-t fixáltuk (25tf% 2-propanol 10tf% ecetsav 30 perc), a radioaktív szignál erősítésére 30 perces Amplify (Promega) kezelést alkalmaztunk. A gél-t 85°C-on 1 óráig vákumszáritón szűrőpapírra (Whatman 3M) száritottuk. A kiszáritott gél-t -80°C-on [Hyperfilm MP](#) használatával ([Amersham Biosciences](#)) autoradiográfiásan vizsgáltuk. A filmet 2-6 órás inkubálás után hívtuk elő. A jel erősségétől függően a kötőreakció 10-50X-es hígítását használtuk a további kísérletekben. A jelölt fehérjéket -80°C-on tároltuk.

3.3.6. Kötési kísérletek radioaktívan jelölt *in vitro* transzlált fehérjékkel

3.3.6.1. Peptidek kapcsolása Sulfolink rendszerrel

A kötési kísérletek során a különböző kovalens módosításokat hordozó 19 aminosav hosszúságú N-terminális hiszton peptideket ([Sigma Genosys](#)), a C-terminális végükre épített addicionális (a természetes hiszton H3 szekvenciában nem szereplő) cisztein aminosav beépítésének segítségével Sephadex alapú aktivált Sulfolink gyöngyökhöz kötöttük, az aktív SH-csoport felhasználásával. A kísérletekhez módosítatlan, L4-dimetil, L9 dimetil, L4-L9-dimetil, és S10-en foszforilált peptideket használtunk fel. A kapcsoláshoz felhasználni kívánt peptidekből 1mg/ml oldatot készítettünk 50mM Tris 5mM EDTA pH8.5 pufferben, amelyet gondosan lezárva hónapokig tárolhatunk +4 °C-on.

A szintén +4 °C-on tárolt Sulfolink gyöngyöt 10X mennyiségű 50mM Tris 5mM EDTA pH 8.5 pufferrel equilibráltuk szobahőmérsékleten. Majd 1mg fehérje/1ml gyöngy arányban ráértük a peptidet tartalmazó puffert, és 15 percet forgókeréken inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd 30 percig állni hagytuk. A gyöngyök kötési aktivitását ezután 50mM ciszteint tartalmazó 50mM Tris 5mM EDTA pH8.5 pufferrel blokkoltuk, majd újból 10X mennyiségű 50mM Tris 5mM EDTA pH8.5 pufferrel, majd 1M-os NaCl oldattal mostuk. A peptidekkel kovalensen kapcsolt gyöngyöket 1M-os NaCl oldatban +4 °C -on hónapokig tárolhatjuk. A kötés hatékonyságát az eredeti peptid oldat, illetve a kötés utáni peptid oldat 10-10µl-ének SDS próba pufferben történő forralás után, 20%-os akrilamid gélen való futtatásával, majd coomassie festéssel ellenőriztük.

A kontrollként használt, semmilyen kötött peptidet nem tartalmazó gyöngyöt a kötési lépés elhagyásával, de ugyanolyan equilibrálási és blokkolási körülmények között állítottuk elő. Ebben a kötési szempontból semlegesnek tekintett gyöngyben az aktív helyeket cisztein foglalja el.

3.3.6.1. Kötési kísérletek Sulfolink-kötött peptidekkel

A teljes kötési kísérleteket +4°C-on, illetve jégen végeztük. A kísérletekhez az *in vitro* transzlációval termelt (3.3.5.) radioaktívan jelölt E(Z) fehérjéket használtunk. A transzlációval termelt fehérje radioaktivitásától függően 10-50x-es arányban hígítottuk a kötő pufferrel (HEMG, NP40) úgy, hogy lehetőleg az egyes kötő reakciókban megközelítőleg azonos mennyiségű fehérjét alkalmazzunk. 5µl Sulfolink kötött gyöngyökhöz (SulfoLink Coupling Gel Pierce) 5µl megfelelően hígított, a vizsgálni kívánt, radioaktívan jelzett fehérjét tartalmazó *in vitro* transzlációs elegyet, illetve 450µl kötő puffert adtunk szilikonizált Eppendorf csövekben. Az *in vitro* transzlációhoz használt teljes reakcióelegyet hígítás után, a kötési reakció előtt, centrifugáltuk (+4°C 30 percig 18000 rpm), és a felülúszót használtuk fel a kötési kísérletekhez. A gyöngyöket előzőleg 5 percig equilibráltuk 1ml kötő-pufferrel forgókeréken +4°C-on. Majd centrifugálással (200rpm) 5percig üleptítettük, és kis átmérőjű (0.4 mm) injekciós tűvel 1ml-es fecskendővel óvatosan eltávolítottuk a mosó puffert.

A kötést 1-4 óráig végeztük hidegszobában forgókeréken. Ezután a gyöngyöket 5X mostuk 1ml mosó pufferrel. Az utolsó mosás után a puffert gondosan eltávolítottuk, a gyöngyökhöz 5µl desztillált vizet és 10µl SDS próba puffert adtunk, majd 10 perc forralás után a minták 10µl-ét akrilamid géltre vittük. Futtatás, denaturálás és szárítás után a géleket autografiásként értékeltük (ld.3.3.5).

3.3.7. A FLAG jelölt C-terminális E(Z) fehérje fragmentek kifejeztetése Sf9 sejtekben

3.3.7.1. Transzfekció

A pTβStop vektorba klónozott, a vad és az E(Z)^{TRM} fehérje C-terminális 273 aminosavát tartalmazó (SAC-SET domén) NdeI-EcoRI fragmentet baculovirus alapú pPB22 vektorba klónoztuk. Steril körülmények között megszekvenált inszertet (Medigenomix) tartalmazó vektor 1.5 µg-nyi mennyiségét 1.75 µl-nyi (0.1 µg/µl) baculovirus linearizált DNS (Sapphire™ Baculovirus) mennyiséggel 33µl szérummentes Sf9 médiumba (SF-900 II SFM (1X) liquid) mértük (MixA). Összemértünk 10µl Lipofectin reagenst (Lipofectin® Reagent) és

23µl szérumentes Sf9 médiumot is (MixB). A két elegyet gondosan összekevertük és 45 percre állni hagytuk szobahőmérsékleten.

1x10⁶ folyadékkultúrában növesztett Sf9 sejtet (Sf9) szélesztettünk titrálólemezekre. A leülepedett sejteket három alkalommal mostuk szérumentes Sf9 médiummal. A mosás végén eltávolítottuk a felesleges médiumot és ellenőriztük a sejtmennyiséget (50-60%-os lefedettség). A 45 perces inkubálás végén MixA-t és MixB-t összekevertük, majd 440µl szérum-mentes médium hozzáadása után a teljes lipofectin/DNS keveréket ráértük a sejtekre. A sejteket 12 óráig inkubáltuk szobahőmérsékleten, lassú mozgatás mellett (himba). Ezután eltávolítottuk a lipofectin/DNS elegyet, a sejteket szérum-mentes Sf9 médiummal mostuk, majd 2ml szérumot is tartalmazó médiummal 26°C-on inkubáltuk CO₂-termosztátban további 5 napig.

3.3.7.2. Amplifikáció

Az előzőekben transzfektált Sf9 (B82501) sejtekről eltávolítottuk a baculovírust tartalmazó felülúszót. Új sejteket szélesztettünk folyadék-kultúrából (6x10⁶/10cm-es) szövettenyésztő Petri-csészékbe. Szérumentes Sf9 médiummal történő háromszoros mosás után a leülepedett sejteket ellenőriztük (50-60%-os lefedettség), és a felülúszóval fertőztük. A sejtekhez további 1.5ml médiumot adtunk és 12 órán át szobahőmérsékleten lassú mozgatás mellett inkubáltuk. Ezután a felülúszót eltávolítottuk, a sejteket szérumentes médiummal mostuk, és további 5 napig 10ml szérumtartalmú médiummal 26°C-on inkubáltuk CO₂ termosztátban. A fertőzés sikerét mikroszkóposan ellenőriztük. (Baculovirus Infected Sf9 Cells).

A fehérje termelésre alkalmas felülúszót általában két-három amplifikációs lépés után sikerült létrehoznunk. A fehérjetermelést a második amplifikációs lépés után minden egyes lépésben ellenőriztük, a fertőző felülúszó mennyiségét, illetve a fehérjetermelési időt optimalizáltuk.

3.3.7.3. Fehérjetermelés

A fehérjetermelés első ellenőrzéséhez az amplifikációhoz hasonló módszert alkalmaztunk, csak az inkubációs időt rövidítettük le 2-3 napra. A már ellenőrzött vírustartalmú felülúszót folyadékkultúrában alkalmaztuk nagy mennyiségű fehérjetermelésre. Ehhez 1×10^6 /ml koncentrációban szérumtartalmú Sf9 médiumban 300 ml-es folyadékkultúrában növesztettük az Sf9 sejteket. A fertőzéshez 2-15ml felülúszót használtunk. A termelést lassú (60rpm) rázatás mellett 3000ml-es Erlenmeyer lombikban végeztük 3 napig 26°C-os termosztátban.

3.3.7.4. A termelt fehérje ellenőrzése

A termelt fehérje kitisztításához a sejteket lecentrifugáltuk (2000 rpm 10 perc), és +4°C-on 0,1% NP-40-et és 1mM PMSF-et tartalmazó 0.5M NaCl-t tartalmazó HEMG pufferben felszuszpendáltuk. A sejteket kétszer lefagyasztottuk folyékony N₂-ben, majd a második felolvasztás után jégen szonikáltuk (3x20 mp). A sejtmaradványokat 15 perces, minimum centrifugálással (15000 rpm) választottuk el a felülúszótól. A felülúszót utoljára 0,40 µm-es steril-szűrőn (Millipore) is átszűrtük.

A C-terminális FLAG peptiddel egybeépített E(Z) fehérje fragmentek tisztításához monoklonális FLAGM2 antitesttel összekapcsolt gyöngyöket használtunk (ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel F2426). A felülúszó térfogatának 1%-ának megfelelő mennyiségű gyöngyöt kimértünk és kétszer 10 percig mostunk +4°C-on 100x mennyiségű szuszpendáló pufferben. A mosópuffer eltávolítása után a gyöngyöket minimum hat órán át inkubáltuk a teljes mennyiségű felülúszóval +4°C-on forgókerékben.

A megkötött FLAG-jelölt fehérjéket tartalmazó gyöngyöket, a kötődés után 5x10 percig mostuk a szuszpendáló pufferrel, majd a kötődött fehérjemennyiséget 10%-os akrilamid gélen coomassie festéssel ellenőriztük. A termelt fehérjéket tartalmazó gél nitrocellulóz membránra blottoltuk.

Az blottolt fehérjéket tartalmazó nitrocelulóz membránt 5% sovány tejport tartalmazó TBST- pufferben (100mM Tris bázis, 150mM NaCl, 0,1% Tween-20, pH8) telítettük, 2x öblítettük, majd 3x15 percig mostuk TBST-vel. Minden mosást és inkubációt himbán végeztünk. Ezután 2ml anti-FLAGM2 monoklonális egér-ellenanyaggal (Sigma) 1:2000 hígításban TBST-ben, illetve poliklonális anti-E(Z) nyúl-ellenanyaggal (Carrington és Jones, 1996) 1:1000 inkubáltuk 60 percig szobahőmérsékleten. Megfelelő másodlagos ellenanyag alkalmazása után a kimutatáshoz alkalikus foszfatáz aktivitást és NBT, BCIP-et használtunk ([Phosphatase chromogen kit BCIP/NBT](#)).

3.3.8. Kötési kísérletek termelt fehérjékkel

Az E(Z) SET-domének közti lehetséges interakció kimutatása érdekében a baculovírus rendszerrel termelt E(Z) fehérjék anti-FLAG gyöngyökkel való kihalászása után, a megtermelt fehérjéket csaliként használva a 3.3.6.2. pontban leírtakhoz hasonló körülmények között kötési kísérleteket végeztünk *in vitro* transzlált radioaktívan jelölt E(Z) fehérjével. Hasonló típusú kísérleteket végeztünk baktériumban termelt GST-fúziós TRX fehérje és Sf9 sejtben termelt FLAG jelölt teljes hosszúságú, valamint preSET-SET-posztSET régiót tartalmazó (Beisel és mtsai, 2002) ASH1 fehérjék felhasználásával is.

3.3.9. Hiszton-metil-transzferáz aktivitás mérése

A hiszton-metil-transzferáz aktivitásmérésekhez anti-FLAG gyöngyökhöz kötött baculovírus rendszerrel Sf9 sejtekben termelt vad és mutáns, FLAG-kapcsolt SAC-SET domént tartalmazó E(Z) fehérjét használtunk fel. A kísérletekhez felhasznált gyöngyökhöz kötődő FLAG-jelölt fehérjemennyiséget gélen ellenőriztük. Egy kísérlethez 10µl-nyi FLAG fehérjével telített gyöngyöt használtunk. Az aktivitás-mérés előtt a gyöngyöket 0.5 M NaCl-t tartalmazó HEMG 0.1% NP40 0.2mM PMSF tartalmú puffer 1ml-nyi mennyiségével mostuk forgókerékben +4°C-on (5 perc). Majd centrifugálással (2000 rpm) üleptítettük a gyöngyöket, és 0.4 mm Átmérőjű injekciós fecskendővel távolítottuk el a felülúszót. Az összesen 20µl reakcióelegyhez 5µl, 1mg/ml koncentrációjú peptidoldatot, 2µl radioaktívan jelölt S-adenozil-

metionint (*S*-Adenosyl-L-[*methyl*-³H] methionine), 4μl 5X HMT puffert (200mM tris 2mM EDTA 1mM DDT pH:8.0), majd desztillált vízzel egészítettük ki. A reakciót 30°C-os vízfürdőben 1 óráig végeztük. Ezután jégre tettük, próba pufferrel leállítottuk, majd felforraltuk. Akrilamid gélen azonos mennyiségű fehérjét tartalmazó mintákat futtattunk. Az E(z) fehérje mennyiségét coomassie festéssel hasonlítottuk össze, a keletkezett radioaktívan jelölt metilált peptidek mennyiségét pedig autoradiográfiásan, illetve a gyorsabb és pontosabb mérés érdekében folyadékszintillációs módszerrel ellenőriztük (Beckman).

3.3.9. Szekvencia összehasonlítás adatbázis keresések

FlyBase @ flybase.bio.indiana.edu <http://flybase.bio.indiana.edu/>

BDGP: Home <http://www.fruitfly.org/>

GadFly <http://www.fruitfly.org/annot/>

NCBI HomePage <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1. A *TRITHORAX-MIMIC* MUTÁCIÓ IZOLÁLÁSA ÉS GENETIKAI JELLEMZÉSE

4.1.1. A mutáció izolálása

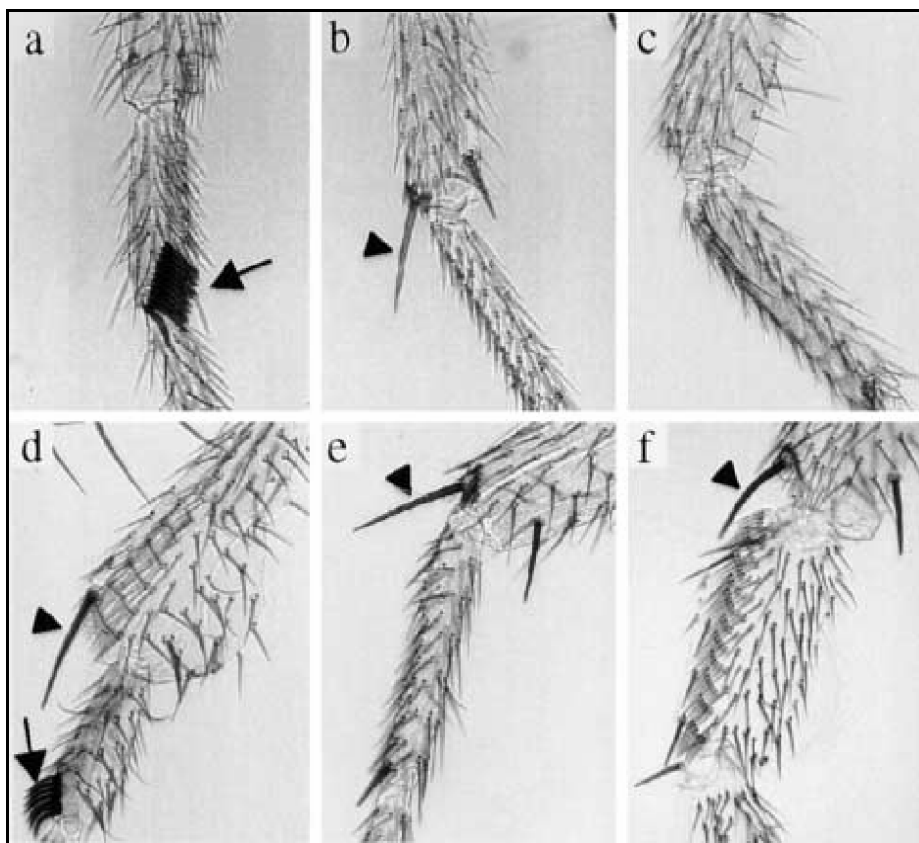
Laboratóriumunkban több érzékeny mutánsizolálási tervet dolgoztunk ki a homeotikus gének kifejeződési mintázatának epigenetikus fenntartásáért felelős gének keresésére. Mutagenézis kísérleteinkben olyan *Drosophila melanogaster* mutánsokat kerestünk, amelyeknek speciális homeotikus fenotípusa a *bithorax*-komplex aktivitási mintázatának hibás fenntartására utalt. A mutánsok azonosítását mindig megkönnyíti, ha minél könnyebben észrevehető fenotipikus változást keresünk. Az egyik első ilyen EMS mutagenézis kísérlet ezért a domináns funkciónyeréses *Fab-7* mutációk szuppresszorainak és enhanszereinek keresésére irányult.

A *Fab-7* heterozigóta (Gyurkovics és mtsai, 1990) háttérben az ektopikusan aktiválódott *cisz*-regulátor (*iab-7*) állapota érzékenynek bizonyult néhány már ismert *Polycomb*-, és *trithorax*-típusú mutáció jelenlétére, vagyis a hatodik tergít mérete ezekben a mutáns hátterekben megváltozott. Ebben a mutánsizolálási rendszerben azonosította Sipos László a 183-as számú jelöltet. A 183-as mutáció nem módosította jelentősen a *Fab-7*¹ fenotípust, de erős domináns anterior irányú transzformációkat okozott más, a *bithorax*-komplex által szabályozott szelvényekben. A 183-as mutáns fenotípus emlékeztetett az erős *trx* allélok homeotikus transzformációira, de maga nem bizonyult *trx* allélnek, ezért a jelöltet *Trithorax-mimic*-nek (*Trm*) neveztük el.

4.1.2. A mutáció fenotípusa és lokalizációja

A heterozigóta *Trm* mutánsok szelvényei erős anterior irányú transzformációkat mutatnak. Az *Antennapedia*-komplex (ANT-C) működése a fejszelvényekben nem károsodik, de a hibás működést jelzi, hogy a mutáns hímek első pár lábán a szex fésű fogainak száma

néhány állatban kevesebb (sex-comb redukció). Ez a T1 lábdiszkuszban normálisan erősen kifejeződő *Scr* (*Sex comb reduced*) homeotikus gén funkcióvesztéses, haplo-insufficiens fenotípusa (Mahaffey és Kaufman, 1987). Emellett hímekben és nőtényekben egyaránt megjelentek a normálisan csak a második pár lábra jellemző apikális és preapikális szőrök az első pár lábon is (4.1. ábra).

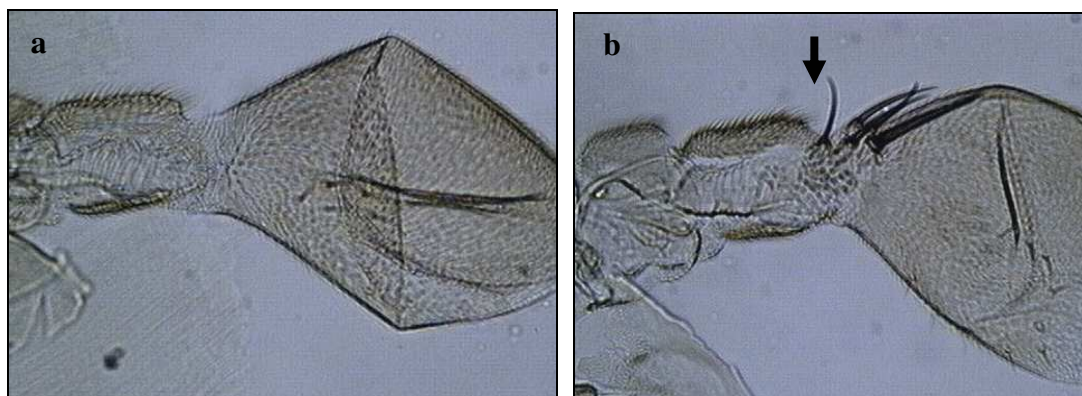


4.1. ábra Vad és *Trm* mutáns heterozigóta légy lábai

Vad hímek (a,b,c) az első lábon szex fésűk helyezkednek el (a.nyíl), a második lábon apikális szőröket találunk (b. háromszög), a harmadik lábon sem szex fésűt, sem apikális szőrt nem találunk (c.). A *Trm* mutáns heterozigóta állatokban (d, e,f) az első lábon lévő szex fésű fogak száma kevesebb (d. nyíl), a második lábra jellemző apikális szőrök mind az első lábon (d. háromszög), mind a harmadik lábon (f. háromszög) megjelentek.

Esetenként a billér alatt (T3) extra, a szárny tövére (T2) jellemző, sternopleurális szőrök jelennek meg (4.2. ábra), a billér méretének növekedése, illetve a billér tövén megjelenő szőrök (szintén szárnyyszerű jelleg) is a harmadik torszelvevénynek (T3) a második (T2) irányába történő transzformációját jelzik. Ugyanerre utal a második lábra jellemző apikális, illetve preapikális szőrök megjelenése is a harmadik lábon (4.1. ábra). Ezek a

fenotípusok az *Ultrabithorax* (*Ubx*) homeotikus génnek, illetve *cisz*-regulátorainak (pl: *bx*) funkcióvesztéses mutánsaira emlékeztettek, és végeredményben az *Ubx* gén kifejeződésének csökkenésére utaltak.

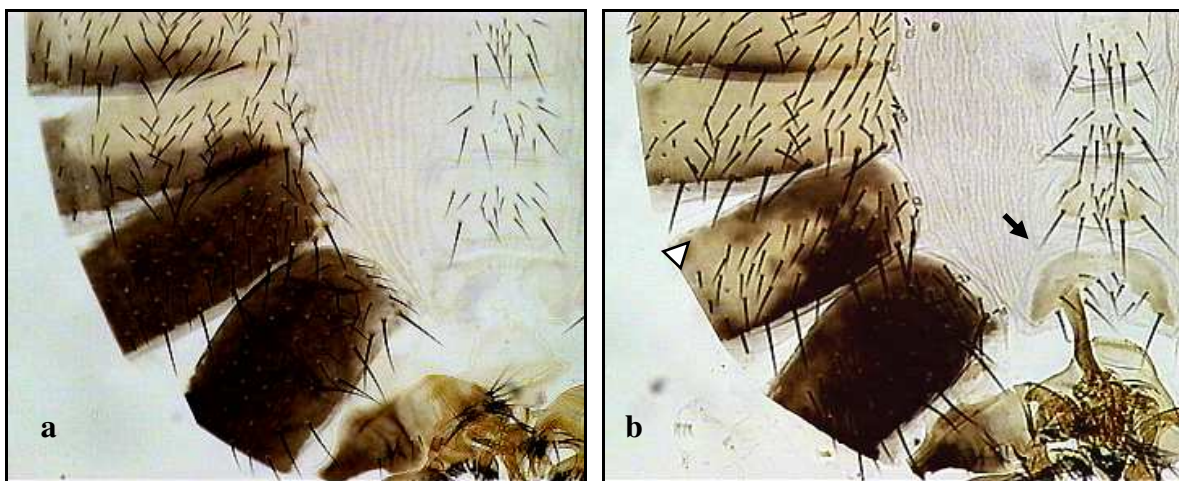


4.2. ábra Vad és *Trm* mutáns billér

a.) Vad billér. b.) $E(z)^{Trm}/+$ billér. A *Trm* heterozigóta formában a billér tövén szárny transzformációjára utaló szőrök megjelenését okozhatja (b nyíl).

A potrohon különösen szembetűnő volt, hogy a hímeken vad állapotban teljesen sötét ötödik abdominális szelvényen (A5) kiterjedt világos foltok jelentek meg. Ez az ötödik abdominális szelvénynek (A5, PS10) a normálisan világos negyedik szelvény (A4. PS9) irányába történő transzformációjára, és az *Abd-B* gén kifejeződésének csökkenésére utalt (4.3. ábra).

A mutáció változatlan expresszivitással öröklődik, és a harmadik kromoszómára lokalizálható. Az újonnan indukált mutációt a *Fab-7^l* kromoszómán és *TM6 Tb* balanszer felett tartalmazó állatokból törzset alapítottunk. A mutáns lárvák nyálmirigy óriáskromoszómáinak citológiai vizsgálata megmutatta, hogy a *Trm* nem tartalmaz látható kromoszómális átrendeződést. A hasonló, anterior irányú transzformációkat okozó, *trithorax*-csoportba (*trx-G*) tartozó, ismert, harmadik kromoszómás gének alléljaival keresztezve kiderült, hogy a mutáció egyetlen ismert *trithorax*-csoport génnel sem allélikus, de számos mutáció fenotipikus enhanszere, tehát formailag maga is a *trx-G*-ba lenne sorolható.



4.3. ábra Vad és *Trm* mutáns hím abdominális szelvények

a.) Vad abdomen. b.) *E(z)^{Trm}/+* genotípusú hím abdomenje Heterozigóta állapotban a *Trm* mutáció az ötödik tergitlemezen, a normális negyedik tergitlemezre jellemző világos klónok megjelenéséhez (üres háromszög), a hatodik sternitlemezen pedig, a normális ötödik sternitre jellemző szőrök kialakulásához (fekete háromszög) vezet.

Az eredetileg törzsbe állított mutáns vonal embrionális letális volt, a kifejlődött homoizigóta mutáns embriók kutikulája szelvény-transzformációkat nem mutatott.

A *Trithorax-mimic* meiotikus térképezéssel megállapított pozíciója a harmadik kromoszóma bal karján a $34,25 \pm 0,5$. Ebben a régióban nem található ismert, *trithorax*-csoportba tartozó gén, viszont ide térképeződik egy, funkcióvesztéses fenotípusa alapján az antagonista hatású *Polycomb*-csoportba (*Pc-G*) tartozó az *Enhancer of zeste E(z)* gén (Jones és Gelbart, 1990).

A *Trithorax-mimic* mutánst az *E(z)* régiót átfedő deléciót (67E1-2;67E5-7) tartalmazó *Df(3L)E(z)^{IR3}*-mal keresztezve nem kelt ki transzheterozigóta utód. Tehát a *Trm* mutáció a deficiencia letalitását nem komplementálja. Egy másik amorf *E(z)* allél (*E(z)^{S6}*) szintén letális volt a *Trm* mutációval, ami arra utalt, hogy az általunk izolált mutáció az *E(z)* gén új allélja.

4.1.3. A mutáció reverziója

Amennyiben az általunk izolált allél valóban az *E(z)* gént érinti, a funkcióvesztéses alléokkal ellentétes irányú fenotípusa funkciónyeréses-típusú allélre utalhat. Ebben az esetben

az érintett génben bek vetkezo  funkcióvesztést okozo  újabb mutáció eltünteti (revert lja) a domináns *Trm* fenotípust és funkcióvesztéses *E(z)* allélt eredményez.

Hipotézisünket alátámasztandó megpróbálkoztunk a *Trithorax-mimic* mutáció revert l s val. A létrehozott nyolc Röntgen revertáns (a reverzió részletes leírását az Anyagok és módszerek fejezet tartalmazza) mindegyike tökéletesen megszüntette a *Trm* domináns fenotípusát, emellett egyike sem komplementálta a k l nb zo  funkcióvesztéses *E(z)* allélokat. A *Trm*^{Revert ns}/*Df(3L)E(z)*^{IR3} kombinációk let lf zisa (közép-k s  b b)  s fenotípusa (*zeste*¹ szuppresszor) teljesen megegyezett a korábban leírt amorf *E(z)* allélok fenotípusával (Shearn, 1977; Jones  s Gelbart, 1990). Három revertáns hordozott citol giailag látható töréspontot a 67E3-4 régióban (4.1. táblázat), amely megegyezik az *E(z)* gén óriáskromoszómán elfoglalt helyével. További három revert nsr l sikerült *E(z)* specifikus cDNS próba felhasználásával végzett Southern-blot analízissel bizonyítani, hogy molekuláris átrendeződést tartalmaznak az *E(z)* gén kódoló régiójában.

Mindezen adatok alapján elmondható, hogy a *Trm* mutáció az *Enhancer of zeste* gén funkciónyeréses allélját hozta létre, helyes elnevezése ezek alapján: *E(z)*^{*Trithorax-mimic*}, rövidítése *E(z)*^{*Trm*}.

<i>E(z)</i> ^{<i>Trm</i>} revertáns	Citológia
11A/1	T(2;3)48E;65C
11A/2	T(4;3)67E 4. krom. heterokromatin
13B	vad
21A	Df(3L)67E-68F;In(3L)68F;89D
28B	T(2;3)41D;87C
48A	vad
48B	T(2;3)44A-B;67E
54B	vad

4.1.táblázat: Az izolált *E(z)*^{*Trm*} revertánsok citol gi i leírása és töréspontjainak listája

A reverziós kísérlet leírását és a kromoszómapreparátumok elk s z t s nek módját az Anyagok és módszerek fejezet tartalmazza. Vastag szedés jelzi az *E(z)* gén citol gi i helyét, a 67E3-4-et érintő átrendeződéseket.

4.1.4. Az $E(z)^{Trm}$ mutáció fenotípusának változása az $E(z)$ gén dózisének függvényében

Az általunk izolált új $E(z)$ mutáció természetének megértése érdekében megvizsgáltuk, hogyan változik a fenotípusa az $E(z)$ gén dózisének változtatásával.

Genotípus (Az elvégzett keresztezést zárójelben közöljük)	T1 → T2		T3 → T2		A5 → A4
	ap1	stp1	ap3	stp3	
$E(z)^{IR3}/E(z)^{Trm} \ddagger$	100%**	9%**	100%**	36%**	100%**
$(E(z)^{Trm} Fab-7^1/TM6Tb \text{ ♀})$	n=32 [◊]	n=32 [◊]	n=32 [◊]	n=32 [◊]	n=11 [◊]
$E(z)^{IR3}/TM6Tb \text{ ♂})$					
$P(ry^+B)2/+; E(z)^{IR3} \ddagger / E(z)^{Trm} Fab-7^1$	80%**	5%	90%**	10%	100%**
$(E(z)^{IR3}/TM6Tb \text{ ♀})$	n=10	n=10	n=10	n=10	n=5
$P(ry^+B)2/P(ry^+B)2;$ $E(z)^{Trm} Fab-7^1/TM2 \text{ Ubx ♂})$					
$+ / E(z)^{Trm} Fab-7^1$	31.5%	0%	77.3%	2.8%	41.8%
$(E(z)^{Trm} Fab-7^1/TM6Tb \text{ ♀})$	n=818	n=212	n=616	n=212	n=160
$Oregon-R \text{ ♂})$					
$P(ry^+B)2/+; E(z)^{Trm} \ddagger / +$	20%*	0%	18%**	0%	3%**
$(E(z)^{IR3}/TM6Tb \text{ ♀})$	n=22	n=22	n=22	n=22	n=10
$P(ry^+B)2/P(ry^+B)2;$ $E(z)^{Trm} Fab-7^1/TM2 \text{ Ubx ♂})$					
$P(ry^+B)2/+; E(z)^{Trm} / +$	2.9%**	0%	1.5%**	0%	1.4%**
$(E(z)^{Trm} Fab-7^1/TM6Tb \text{ ♀})$	n=854	n=854	n=854	n=854	n=214
$P(ry^+B)2/P(ry^+B)2 \text{ ♂})$					
$P(ry^+B)2/+; Dp(3;3)S2a3/E(z)^{Trm}$	1%**	0%	2%**	0%	2%**
$(P(ry^+B)2/P(ry^+B)2; E(z)^{Trm} Fab-7^1/TM3 \text{ ♀})$	n=98	n=98	n=98	n=98	n=47
$Dp(3;3)S2a3/TM3 \text{ ♂})$					

4.2. táblázat: Az $E(z)$ gén dózisének hatása az $E(z)^{Trm}$ fenotípusra

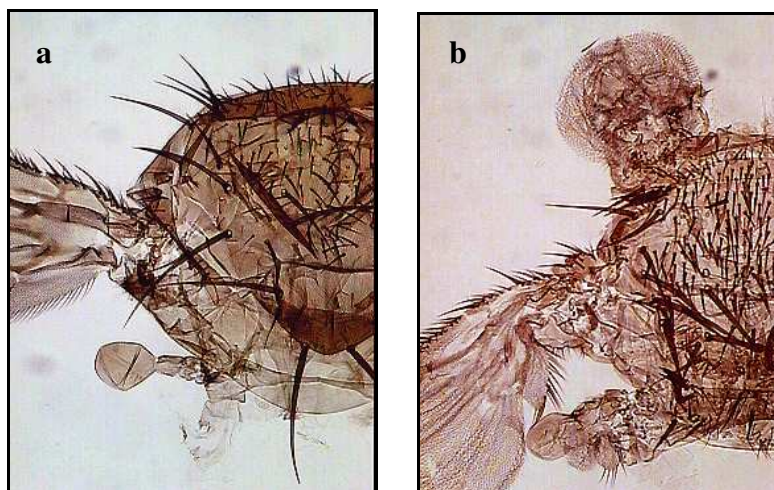
$\ddagger$: bábból kiboncolt pharat adultak. *ap1*: az első (prothoracalis) lábon ektopikus apikális szőr megjelenésével járó gyenge T1→T2 transzformáció penetranciája. *stp1*: az első (prothoracalis) szelvényen ektopikus sternopleurális szőrök megjelenésével járó erős T1→T2 transzformáció penetranciája. *ap3*: a harmadik (metathoracalis) lábon ektopikus apikális szőr megjelenésével járó gyenge T3→T2 transzformáció penetranciája. *stp3*: a harmadik (metathoracalis) potroh szelvényen ektopikus sternopleurális szőr megjelenésével járó erős T3→T2 transzformáció penetranciája. Az A5→A4 transzformációk jellemzésére egy háromlépcsős skálát használtunk, ahol 0 egy alig transzformált a vadtól nehezen megkülönböztethető sötét ötödik tergitek (A5) felel meg; 1 a körülbelül az A5 tergitek felére kiterjedő világos színű, klónális transzformációval jellemezhető tergitek jelzőszáma, míg 2-es számot a majdnem teljesen világos, a vad negyedik szelvényre emlékeztető 5. tergitek kaptak. Ezek után a megfelelő genotípusú $E(z)^{Trm} Fab-7^1$ transzheterozigóta hímek között megszámlálva az egyes transzformáltsági kategóriákba eső állatok számát az apikális szőrökhöz hasonló módon számolható volt a tergitranszformációk penetranciája. *a* : Penetranciának a transzformált lábak, illetve állatok számának az összes vizsgált állathoz, illetve lábhoz (n) viszonyított hányadosát tekintettük, melyet százalékosan adtunk meg.* az adott transzformáció penetranciája λ^2 próbával ellenőrizve ($P < 0.05$) szinten szignifikánsan különbözik a kontrollsoportra jellemző penetrancia értéktől. (Kontrollként a megfelelő irányból keresztezett *Oregon-R/E(z)^{Trm} Fab-7^1*-re jellemző penetrancia értékeket használtuk.). ** a penetrancia ($P < 0.001$) szinten szignifikánsan különbözik az *Oregon-R/E(z)^{Trm} Fab-7^1* transzheterozigóta kontrolltól.

Az $E(z)^{Trm}/Df(3L)E(z)^{IR3}$ -transzheterozigóták letalitása kompenzálható egy kópia menekítő $E(z)$ konstrukció $\{P(ry^+B)2\}$ (Jones és Gelbart, 1993) bevezetésével. A menekített mutáns-hemizigóta utódok kis számban kelnek, melynek oka valószínűleg a transzgénnek a vad kópiához képest tökéletlen szabályozásából adódó, a heterozigótánál alacsonyabb $E(z)$ mRNS szint. A menekített *Trm* mutáns hemizigóták a heterozigóta *Trm*-nél is súlyosabb anterior irányú transzformációkat mutatnak (4.2. táblázat) és életképességük is redukált, funkcióvesztéses (Polycomb-jellegű) fenotípusuk azonban továbbra sincs.

A menekítő transzgénnel $\{P(ry^+B)2\}$ bevezetett plusz $E(z)$ kópia *Trm* heterozigótákban erős, bár a régiót érintő genetikai duplikációnál (*Dp(3;3)S2a3*) gyengébb fenotipikus szuppresszornak bizonyult (4.2. táblázat), de még a duplikáció és plusz egy transzgén kópia jelenléte sem állította vissza tökéletesen a vad fenotípust a vizsgált egyedek mindegyikében.

4.1.5. Az $E(z)^{Trm}$ mutáció letálfázisának, és hemizigóta fenotípusának meghatározása

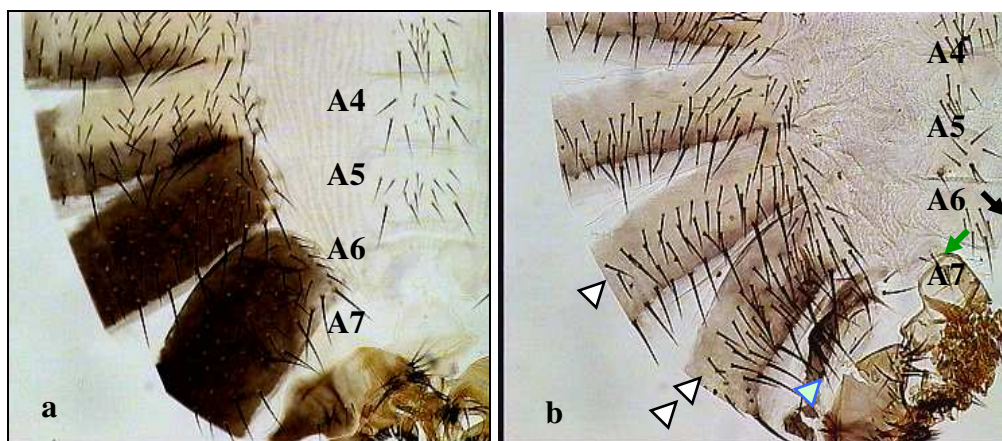
Az erős funkciónyeréses fenotípus változása a vad $E(z)$ gén dózisának függvényében szükségessé tette annak megvizsgálását, hogy mi történik az olyan állatokkal, amelyekben csak a mutáns fehérje van jelen. A hemizigóta utódok tüzetesebb vizsgálatából kiderült, hogy az $E(z)^{Trm}/Df(3R)E(z)^{IR3}$ kombináció pharat adult letális, és a 4.2. táblázatban látható, hogy a bábból kiboncolt $Trm/E(z)^-$ állatok a heterozigóta *Trm*-nél jóval erősebb trithorax-fenotípust mutattak, miközben továbbra sem tapasztaltuk ellentétes irányú (Polycomb-szerű) transzformációk megjelenését. A hemizigótákban a *prothorax* és a *metathorax* extrém mértékű transzformációja az első és a harmadik torsiálszelvényen egyaránt szárnyyszerű képletek megjelenéséhez vezetett (4.4. ábra).



4.4. ábra Vad és hemizigóta *Trm* torpreparátum

Erős homeotikus transzformációk hemizigóta $E(z)^{Trm}/E(z)^{IR3}$ kiboncolt pharat adult állat torszelvein. a.) Vad tor-preparátum. b.) $E(z)^{Trm}/E(z)^{IR3}$ kiboncolt pharat adult transzformált torszelvei. A hemizigótában a normális szárny mellett az első és a harmadik torszelveken egyaránt szárnyyszerű képletek jelennek meg.

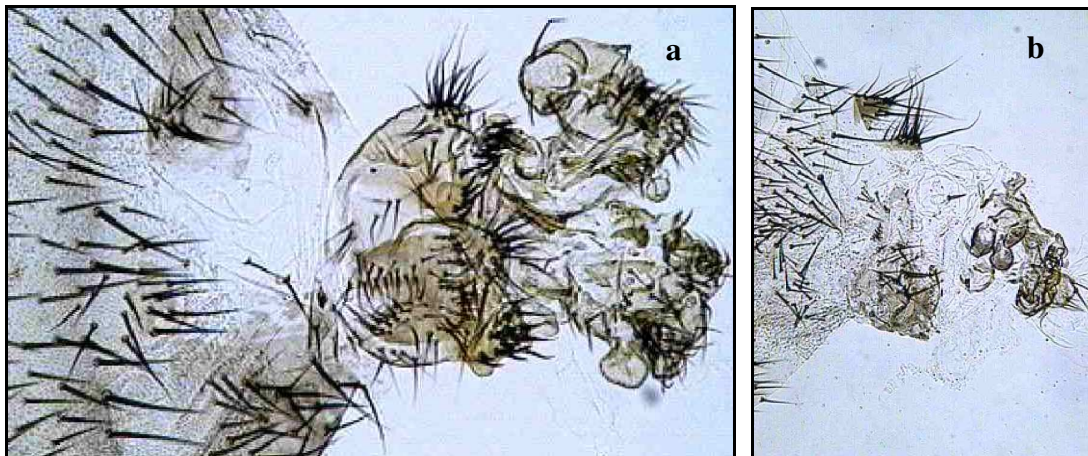
A tergiteken látható anterior irányú transzformációk is súlyosabbá váltak hemizigóta állapotban. Az 5. tergitlemez teljesen A4-szerű lett, emellett a 6. tergitlemez is részlegesen A4-szerűvé transzformálódott, illetve néhány állatban megjelent egy hetedik tergitlemez klón is, ami A7-A6 irányú transzformációnak felel meg (4.5. ábra).



4.5. ábra Vad és *Trm* mutáns hemizigóta hím abdominális szelvényei

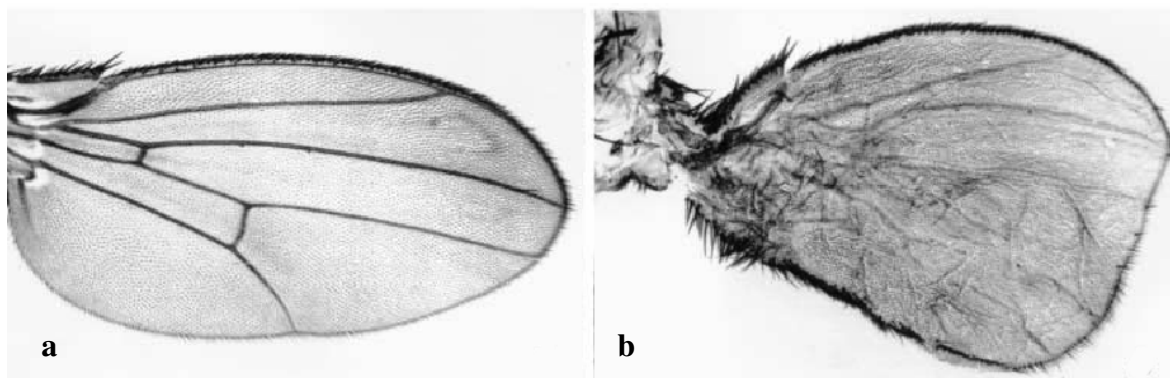
Erős homeotikus transzformációk hemizigóta $E(z)^{Trm}/E(z)^{IR3}$ kiboncolt pharat adult állat potrohán a.) Vad potrohpreparátum b.) $E(z)^{Trm}/E(z)^{IR3}$ kiboncolt pharat adult potroh. Hemizigóta állapotban az ötödik tergite teljesen A4-szerűvé transzformált (fehér háromszög), a 6. tergite is erős A4-szerű transzformációkat mutat (kettős fehér háromszög), és megjelenik egy kicsi hetedik tergitlemez klón is (kék háromszög). A 6. sternitlemezen szőrök jelennek meg az A5 irányú transzformáció megnyilvánulásaként (fekete nyílhegy), akárcsak a heterozigótákban, de itt megjelent egy hetedik sternitlemez klón is, amely ráadásul szintén A5 irányban transzformálódott (zöld nyílhegy).

A sterniteken is súlyosbodtak a homeotikus transzformációk, nemcsak a 6. sterniten jelentek meg szőrök, mint a heterozigótában (4.3. ábra), hanem megjelent egy 7. sternit is, amely ráadásul szintén szőröket hordozott (5. sternitre emlékeztő transzformáció).



4.6. ábra Transzformált ivarszervek hemizigóta $E(z)^{Tm}/E(z)^{IR3}$ kiboncolt pharat adult hím és nőstény állatokon a.) Hemizigóta hím anális transzformációi b.) Transzformált nőstény anália. Mindkét esetben a genitális diszkuszból származó szövetekben láb-irányban transzformált szöveteket találunk.

A nőstények anális lemezén (anal plate), illetve a hímek genitális ívén (genital arch) belül az oldallemez területén, tehát mindkét nemből a genitális diszkuszból származó területeken lábszerű képletek differenciálódtak (4.6. ábra). Ez az extrém homeotikus transzformáció az *Abd-B* gén expressziójának erős redukciójára utalt (Estrada B. és mtsai, 2001).



4.7. ábra Erős homeotikus transzformációk hemizigóta $E(z)^{Tm}/E(z)^{IR3}$ kiboncolt pharat adult állat szárnyán a.) Vad állapotban a szárnylemez elülső peremén lévő szőrök (triple row), és a hátulsó szárnyperem szőrei jól elkülönülnek. A szárnyvénák elhelyezkedése is jellegzetes aszimmetrikus mintázatot mutat. b.) $E(z)^{Tm}/Df(3R)E(z)^{IR3}$ kiboncolt pharat adult letális állatok szárnya a hátsó peremen is az elülső részre jellemző szőröket hordoz, miközben a szárnyvénák mintázata is torzul, az egész szárnylemez csaknem tükrörszimmetrikussá válik. A transzformáció az *eng* által létrehozott transzformációkra emlékeztet (Guillen és mtsai, 1995).

A szárny hátsó részén az $E(z)^{Trm}/E(z)^{IR3}$ hemizigótákban a szárny hátulsó részén a szárny elülső részére jellemző, homozigóta *engrailed* mutáns-klónokra emlékeztető transzformációk jelentek meg (4.7. ábra). Ez arra utalt, hogy a mutáns fehérje nemcsak a homeotikus gének aktivitásának fenntartásában okoz hibát, hanem több célként érintő általános epigenetikus szabályozási hibához vezet.

4.1.6. Az $E(z)^{Trm}$ mutáció alléltípusának meghatározása

A vad $E(z)$ gén dózisának lecsökkentése erősen megnövelte az anterior transzformációk penetranciáját és expresszivitását, sőt a hemizigótában olyan extrém erősségű új *trx*-jellegű fenotípusok jelentek meg, amelyeket a heterozigótákban sohasem tapasztaltunk. A hemizigótákban azonban továbbra sem tapasztaltunk funkcióvesztéses *Pc*-jellegű fenotípusokat. A funkciónyeréses fenotípus még két kópia menekítő transzgén bevezetésével sem tüntethető el, ami neomorf jellegre utal, de a vad géntermék mennyiségének növelésével arányosan fenotípusa erősen visszaszorítható, ami a neomorf allélokra általában nem jellemző.

Mivel a mutáns fehérje funkciónyeréses jellege a vad géntermék mennyiségével arányosan csökken, valószínűsíthető, hogy a funkciónyeréses $E(z)^{TRM}$ ektopikus működése során a normális $E(z)$ fehérjével azonos támadásponton hat. Az általunk izolált allél tehát nem helyezhető el egyértelműen az általánosan alkalmazott alléltípusok egyikében sem.

Az izolált *Trm* mutáció nem egyszerűen neomorf jellegű, a furcsa működés nem egy teljesen új, a normális funkciótól teljesen eltérő módon jelenik meg, hanem a mutáns fehérje teljes mértékben képes a vad funkció ellátására, és a vad géntermékkel továbbra is együttműködve, illetve annak helyét elfoglalva alakítja ki az előzőekben leírt funkciónyeréses fenotípust.

Az $E(z)^{Trm}$ funkcióvesztéses „Polycomb” fenotípusának hiánya, és az erős, „trithorax”-irányú transzformációi azonban arra utalnak, hogy az $E(z)^{TRM}$ az inaktiváló funkció ellátására tökéletesen képes, de az aktívan tartandó *cis*-regulátorokat is ektopikusan inaktiválja. Az

általunk izolált allél fenotípusa úgy értelmezhető, hogy a *cis*-regulátorok erős ektopikus inaktivációjához vezet, miközben a normális funkciót (a megfelelő helyen történő, $E(z)$ -függő epigenetikus inaktivációt) látható mértékben nem rongálja, az inaktivációs működés maga nem károsodott, tehát a *Trm* nem lehet konvencionális értelemben vett antimorf $E(z)$ allél. Az $E(z)^{Trm}$ funkciónyeréses fenotípusa a vad géntermék mennyiségének csökkentésével erősödik, de még alacsony vad $E(z)$ szint mellett sem mutat a normál funkció elvesztésére utaló jeleket, a mutáns $E(z)^{TRM}$ fehérje önmagában is kiválóan képes az inaktiválásra, nincs funkcióvesztéses jellege.

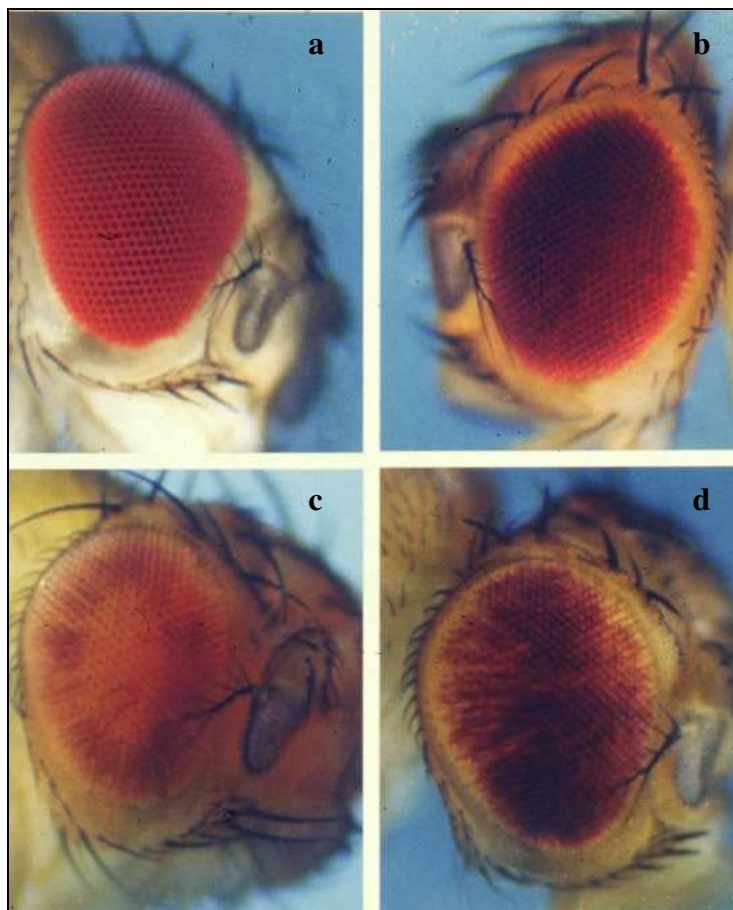
4.2. AZ $E(z)^{TRM}$ HATÁSA A z^I ÉS $z^I w^S$ ALLÉLOK ÁLTAL LÉTREHOZOTT WHITE INAKTIVÁCIÓRA

Az *Enhancer of zeste* gén nevét első, funkciónyeréses alléljének a párosodás-érzékeny $zeste^1$ -függő inaktivációra gyakorolt hatásáról kapta. A z^1 háttérben a két párosodó X kromoszómát hordozó nőstényekben a *white* gén részlegesen inaktiválódik ezért a nőstények szeme sárga, míg a hímek vad, piros szemszínt mutatnak (ld. Bevezetés). $E(z)^I$ mutáns háttérben a párosodó *w* kópiát hordozó z^I homozigóta nőstények szeme kissé tovább világosodik, és meglepő módon az $E(z)^I$ a csak egy, nem párosodó *white* gént tartalmazó hímek szemszínét is képes világosítani (Kalisch és Rasmuson, 1974). A z^I világosító hatását csak a funkciónyeréses neomorf jellegű (LaJeunesse és mtsai, 1996) $E(z)^I$ allél fokozza, az $E(z)$ amorf alléljai, így a *Trm*-revertánsok is gyenge z^1 -szuppresszorok, a nőstények szemét sötétítik (Jones és Gelbart, 1990; Bajusz és mtsai, 2001). Az ismert antimorf $E(z)$ allélok ($E(z)^{60}$, $E(z)^{son1}$, $E(z)^{son2}$, $E(z)^{son3}$) pedig az amorf alléloknál is erősebb z^1 -szuppresszor hatásúak (Wu és mtsai, 1989; Pelegri és Lehmann, 1994, saját megfigyelések).

Az $E(z)^{Trm}$ mutáció funkciónyeréses természetét az a tény is jelzi, hogy az $E(z)^I$ -hez hasonlóan az általunk izolált allél is z^1 -enhanszer, bár az $E(z)^I$ -nél gyengébb: heterozigóta $E(z)^{Trm}$ háttérben a z^I hímek szemszíne nem vad, hanem apró, elszórt sötétbarna klónokat tartalmaz, de sohasem teljesen piros. Az $E(z)^I$ allél z^1 -enhanszer hatásának kialakulásához

szükséges a vad E(Z) fehérje jelenléte (Jones és Gelbart 1990). A hőmérséklet-érzékeny $E(z)^{61}$ alléllal az $E(z)^I$ a restriktív hőmérsékleten (29°C) z^1 -szuppresszor (a $z^I w^{is}$ hímek és nőtények egyaránt vad szemszínűek). Ez azt jelzi, hogy a homológ kromoszómán lévő ép génről származó vad E(Z) fehérje jelenléte nélkül az $E(z)^I$ allél funkciónyeréses hatása nem érvényesül, önmagában szuppresszorként, funkcióvesztéses allélként viselkedik.

Az $E(z)^{Trm}$ mutáció funkciónyeréses z^1 -enhanszer fenotípusa azonban nem igényli a vad E(Z) fehérje jelenlétét. Éppen ellenkezőleg, az $E(z)^{Trm}$ allél önmagában még erősebb z^1 -enhanszerként viselkedik, a $z^I/Y; E(z)^{Trm}/Df(3L)E(z)^{IR3}$ genotípusú, kiboncolt pharat adult hímek, a $z^I/+$ nőtényekhez hasonlóan, egységes barnás-narancs szemszínt mutattak.



4.8. ábra Különbözö funkciónyeréses $E(z)$ allélok és allélkombinációk jelenlétében megjelenő szemszínek
a.) $z^I/+$ heterozigóta nőtény szemszíne vad háttérben. b.) $z^I/+$ heterozigóta nőtény szemszíne $E(z)^{Trm}/+$ háttérben. c.) $z^I/+$ heterozigóta nőtény szemszíne $E(z)^{Trm}/E(z)^I$ háttérben. d.) $z^I/+$ heterozigóta nőtény szemszíne $E(z)^I/+$ háttérben.

Az $E(z)^{TRM}$ fehérje zeste-enhanszer hatása különbözik az $E(z)^I$ fehérjétől, hiszen a TRM önmagában, a vad kópiánál jobban képes a $zeste^I$ inaktiváló funkció ellátására. Az $E(z)^I/E(z)^{TRM}$ transzheterozigóta (bábból kiboncolt) pharat adult nőstények szemszíne z^I háttéren az $E(z)^I/+$ genotípusúakénál is világosabb (4.8. ábra c.).

Összefoglalva: eredményeink azt mutatják, hogy a vad $E(z)$ protein mennyisége meghatározó az $E(z)^{TRM}$ homeotikus és zeste-enhanszer fenotípusának megjelenése szempontjából egyaránt. A vad $E(z)$ fehérje mennyiségének növelése mindkét fenotípust gyengíti, míg csökkentése mindkét fenotípus erősödéséhez vezet. Formálisan értelmezve a mutáns $E(z)^{TRM}$ mindkét esetben kompetál a vad $E(z)$ fehérjével. Kísérleteink mindkét rendszerben azt mutatják, hogy a mutáns $E(z)^{TRM}$ allél nemcsak képes a vad funkció ellátására, hanem a vad allélnál erősebb inaktiváló képességű, túlműködéses jellegű.

4.3. A *Trithorax-mimic* MUTÁCIÓ MOLEKULÁRIS JELLEMZÉSE

Az $E(z)^{TRM}$ mutáns molekuláris analíziséhez mindkét szálon megszekvenáltuk az $E(z)$ gént tartalmazó genomiális DNS szakaszt, mind $E(z)^{IR3}/E(z)^{TRM} Fab-7^I$ hemizigóta mutáns lárvákból, mind az izogenizált kiindulási (szülői, vad) $E(z)$ gént homozigóta formában tartalmazó $E(z)^+/Fab-7^I/E(z)^+/Fab-7^I$ állatokból (Anyagok és módszerek). A Flybase-ben szereplő $E(z)$ szekvenciához képest a szülői allélben több, a nem transzlálódó részben lévő eltérést, illetve csendes, aminosav-különbséget nem okozó mutációt is találtunk. Az $E(z)^{TRM}$ mutánsban a parentális allélhez képest azonban csak egyetlen aminosav-cserét okozó különbséget találtunk: a 741. kodonban a 2325 guanin adeninre cserélődött (Függelék), ami a fehérje C-terminális végén, a SET-doménnek nevezett régióban, a 741-es arginint lizinre változtatta. Az érintett aminosav a kromatin inaktív állapotát kialakító $E(z)$ homológokban konzervált arginin (4.3. táblázat a.), míg az aktív állapot fenntartásában szerepet játszó TRITHORAX-típusú fehérjék SET-doménjában konzervált lizin (4.3. táblázat b.).

Az eredeti $E(z)^{Trm}$ allél szekvenálása után évekkel később Paul Schedl kooperáló partnerünk princetoni laboratóriumában Tony Greenberg egy független mutagenézis kísérletben izolált egy $E(z)^{Trm}$ -hez hasonló fenotípusú $E(z)$ mutánst, melyet rendelkezésünkre bocsátott. Az általa izolált mutáns ($E(z)^{TrmTG}$) pharat adult letális volt, a kiboncolt állatok fenotípusa $E(z)^{Trm}$ homozigótákhoz hasonlított, és az új allél interakciós viselkedése is alapvetően megegyezett az általunk izolált allélal. Ezért érdekesnek látszott az újonnan izolált allél SET doménjének szekvenálása is. Azt találtuk, hogy a megszekvenált új allél ugyanazt a guanin-adenin tranzíciót tartalmazta, mint az eredeti $E(z)^{Trm}$ mutáns. Az újonnan izolált mutáció független voltát az is bizonyította, hogy nem tartalmazta az $E(z)^{Trm}$ -ben csendes mutációt okozó 1999-es G→C tranzíciót.

Gén	organizmus	GenBank	a SET domén C-terminális vége szekvenciák
A.			
<i>Clf</i>	At	Y10580	GEELFyDYRYepd
<i>Ezh¹</i>	Mm	U60453	GEELFfDYRYsqa
<i>EZH¹</i>	Hs	U50315	GEELFfDYRYsqa
<i>EZH²</i>	Hs	U61145	GEELFfDYRYsqa
<i>E(z)</i>	Dm	U00180	GEELFfDYRYgpt
B.			
<i>E(z)^{Trm}</i>	Dm		GEELFfDYKYgpt
C.			
<i>trx</i>	Dm	M31617	gEELTYDYKFpfe
<i>HRX</i>	Hm	L04284	gEELTYDYKFpiE
<i>All¹</i>	Mm	L17069	gEELTYDYKFpiE
<i>SET¹</i>	Sc	ysch8263	sEELTYDYKFeE

4.3. táblázat: A SET-domén *Trm* mutáció által érintett C-terminális szakaszának összehasonlítása különböző magasabbrendű eukariótákból származó SET-domént tartalmazó fehérjék megfelelő régióival. A SET-domén régiókban az adott fehérjecsoporton belül konzervált aminosavakat nagybetűk, A *Trithorax-mimic* mutánsban szubsztituált pozíciót vastag betűs kiemelés jelzi. **A.)** $E(z)$ -típusú SET-domének. A *Trm* mutáció által érintett pozícióban minden $E(z)$ -típusú-SET-domén arginin tartalmaz. **B.)** az $E(z)^{Trm}$ SET-domén N-terminális szakasza, a konzervált arginin lizinre cserélődik. **C.)** TRX-típusú SET-domén régiók, a TRM által érintett pozícióban konzervált lizin.

A szekvenálási eredmények arra utaltak, hogy a 741-es arginin-lizin csere alapvető fontosságú a Trm fenotípus létrejötte szempontjából. További kísérleteink során megpróbáltuk feltárni, hogyan, milyen molekuláris mechanizmussal okozhatja az $E(z)^{Trm}$ fehérjében bekövetkezett egyetlen, speciális pontmutáció a túlműködésre utaló fenotípusokat.

4.3.1. A TRX-típusú SET-domént tartalmazó mutáns $E(z)$ fehérje lehetséges szerepének vizsgálata

Az, hogy az $E(z)^{Trm}$ -ben létrejött mutáció az $E(z)$ SET-doménekre jellemző argininnak pontosan a TRX-homológokra jellemző lizinre való cserélődését okozta, felvetette azt az egyszerű hipotézist, hogy a mutáns protein megváltozott kötési specifitása hasonlóná vált a TRX homológokéhoz, és TRITHORAX fehérjét kötő fehérjékhez vagy a TRX által használt szabályozó elemekhez képes kötődni, és így okoz ektopikus helyeken inaktivációt.

Keresztezett allél (A keresztezés irányát jeleztük)	T1 → T2		T3 → T2		A5 → A4
	ap1	stp1	ap3	stp3	
<i>Oregon-R</i> ♂	31.5% n=818	0% n=212	77.3% n=616	2.8% n=212	41.8% n=160
<i>Oregon-R</i> ♀	16.7% n=2570	0% n=448	73.6% n=2706	1.7% n=448	41% n=546
<i>Df(3R)red-P93</i> ♀ (<i>trx def.</i>)	97%** n=165	3%** n=165	92%** n=165	29%** n=165	100%** n=74
<i>Df(3R)red-P93</i> ♂ (<i>trx def.</i>)	75%** n=138	2%** n=138	91%** n=138	25%** n=138	100%** n=42
<i>Tp(3;Y)ry⁵⁰⁶85C</i> ♂ (<i>trx dupl.</i>)	11.4%** n=228	0% n=228	4.8%** n=228	0% n=228	11%** n=77
<i>Dp(3;3)C11</i> ♂ (<i>trx dupl.</i>)	9,2%** n=344	0% n=344	2.9%** n=356	0% n=356	12%** n=75

4.4. táblázat A *trx* gént érintő duplikációk és deléciók hatása az $E(z)^{Trm}$ fenotípusra

Az allélokat a megadott irányból kereszteztük ellentés nemű $E(z)^{Trm} Fab-7^l/Bal$ heterozigótákkal. A használt rövidítések, szimbólumok magyarázatát ld. a 4.2. táblázatban.

Ismert tény, hogy a PC-, és a TRX-rendszer egyensúlyban áll egymással, az inaktíváló rendszer meggyöngyülését kompenzálhatja az aktív állapotot fenntartó rendszer működésében beállt hiba. Ez olyannyira igaz, hogy több *trx-G* gént *Pc*-szuppresszor fenotípusa alapján izoláltak (Kennison és Tamkun, 1988). Emellett már korábban bebizonyították, hogy a *trx*

mutánsok képesek az *esc* (Ingham, 1983) és a *Pc* (Kennison és Tamkun, 1988) mutánsokban bekövetkezett homeotikus transzformációk szuppresszáására. Kimutatták azt is, hogy a *trx* teljes zigotikus hiánya (*trx^{B11}*) teljesen szuppresszája a hőmérséklet-érzékeny *E(z)⁶¹* allélra homozigóta anyáktól származó homozigóta embriókra jellemző igen erős poszterior irányú transzformációkat (Wu és mtsai, 1989), bár a letalitást nem menekíti (Jones és Gelbart, 1993).

Az *E(z)^{Trm}* hemizigótákban tapasztalt transzformációk erősségükben és megjelenési módjukban erősen emlékeztetnek a mitotikus rekombinációval lárvában indukált *trx*-homozigóta klónokban tapasztalt transzformációkra (eng-szerű szárnyfenotípus, vaginális lemez transzformáció; Ingham, 1995). Ez a megfigyelés felveti azt az elképzelést, hogy a TRM fehérje leszoríthatja a normálisan működő vad TRX fehérjét bizonyos, a homeotikus transzformációk megjelenése szempontjából kulcsfontosságú helyekről. Ennek igazolására kipróbáltuk, hogy milyen hatása van a *trx* gén dózisának a Trm mutáns fenotípus erősségére (4.4. táblázat). Az *E(z)^{Trm}* allél *trx*-fenotípusát a *trx*-duplikációk erősen csökkentették és a kikelő állatok életképessége is javult (a *trx*-duplikációt és az *E(z)^{Trm}* mutációt egyaránt hordozó állatok száma kétszerese volt a duplikációt nem hordozó *E(z)^{Trm}* állatok számának). A *trx* gént érintő deléciók ellentétesen hatottak, az *E(z)^{Trm}* fenotípusát erősítették, miközben az életképesség erősen csökkent. Úgy tűnik, hogy a TRX és az *E(z)^{TRM}* bizonyos targeteken valóban kompetál egymással, aminek jelentősége van annak eldöntésében, hogy egy adott kromatindomén végül is inaktiválódik, vagy aktív marad.

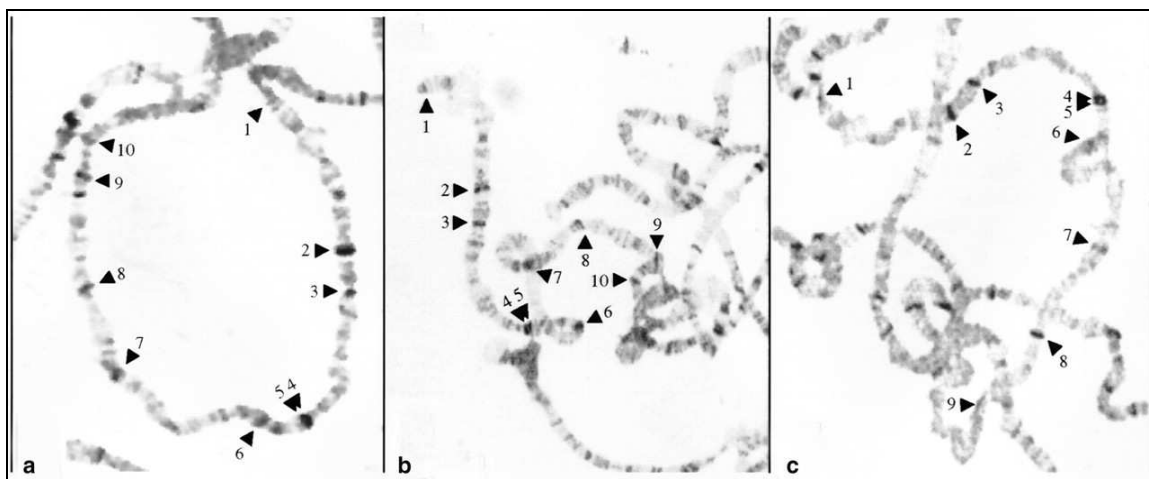
A következő kérdés az, hogy ilyen típusú kompetícióra csak a mutáns *E(z)^{TRM}* fehérje képes, vagy a vad *E(z)* is kompetitora a TRX-nek. A kérdés eldöntése érdekében a *trx* gént tartalmazó független genetikai duplikációk hatását megvizsgáltuk funkcióvesztéses *E(z)* allélokra is. Azt tapasztaltuk, hogy az általunk vizsgált *E(z)* allélokkal kombinálva (*E(z)^{IR3}*, *E(z)¹²*, *E(z)⁶⁰*) a *trx* duplikációk nagy penetranciával domináns poszterior transzformációk megjelenéséhez vezettek (Mcp). Ez azt jelenti, hogy az aktiváló szerepű *trx* dózisának

növelése képes tovább fokozni a csökkent $E(Z)$ dózis miatt meggyengült epigenetikus repressziós hibát. A kísérletek azt támasztják alá, hogy valamilyen szinten a normális $E(Z)$ és TRX fehérjék kompetálnak egymással a homeotikus gének szabályozásában.

Összefoglalva: a mutáns $E(z)^{Trm}$ allél funkciónyeréssel fenotípusa érzékenyen reagált és visszaszorult a PC-TRX egyensúly TRX irányba történő eltolására. Ez a mutáns $E(Z)^{TRM}$ fehérje kiszorulását mutathatja a funkciónyeréssel fenotípus megjelenése szempontjából kulcsfontosságú pozícióból, ahol kétszeres mennyiségű TRX fehérje jelenlétében már nem jöhet létre $E(Z)^{TRM}$ függő ektopikus inaktiváció. Ez ugyanakkor az egyensúlynak a megzavarására utal, amelynek során az $E(z)$ funkcióvesztéssel mutáció miatt instabillá vált represszor rendszer további visszaszorulásához és a funkcióvesztéssel fenotípusok erősödéséhez vezet a kompetáló aktiváló faktor (TRX) mennyiségének megnövelése.

4.4. AZ $E(Z)^{TRM}$ FEHÉRJE KÖTŐDÉSÉNEK VIZSGÁLATA ÓRIÁSKROMOSZÓMÁKON

Mivel mind az $E(Z)$, mind a TRX fehérje bizonyítottan diszkrét, és részben egymástól különböző helyekre kötődik a *Drosophila m.* óriáskromoszómákon, ezért ésszerűnek tűnt megvizsgálni, hogy az $E(Z)^{TRM}$ fehérje kötődése különbözik-e a vad $E(Z)$ -fehérjétől.



4.9. ábra Vad típusú és mutáns $E(Z)^{TRM}$ fehérje kötődési mintázatának összehasonlítása nyálmirigy óriáskromoszómákon

a. és c.). $E(z)^{TRM}/DF(3L)E(z)^{IR3}$ hemizigóta mutáns lárvák X kromoszómáján látható kötődési mintázat. b.) Vad típusú lárvából származó X-kromoszóma festése $E(Z)$ fehérje ellen termelt (Carrington és Jones, 1996) poliklonális antitesttel (ld.: Anyagok és módszerek). A festődések közti kismértékű variabilitás meglétét érzékelteti a két mutáns lárvából származó preparátum bemutatása. A prominens kötőhelyeket háromszögek jelzik, melyek proximo-disztális irányban számozottak a könnyebb összehasonlítás elősegítése érdekében. A képeken jól látható a meglévő kötőhelyek eloszlásának és relatív intenzitásának hasonlósága.

Vad, illetve $E(z)^{Trm}/DF(3L)E(z)^{IR3}$ (hemizigóta) lárvák óriáskromoszómáin vizsgáltuk az E(Z) fehérje kötődését. Az általunk használt fixálás jobb kromoszóma-morfológiához, és néhány, az eredeti szerzők által nem közölt kötési hely azonosításához (4.5. táblázat) vezetett, de nem találtunk alapvető különbséget a vad és a hemizigóta mutáns lárvák között sem az E(Z) helyek mintázatában, sem intenzitásában (4.9. ábra).

Az E(Z) kötőhelyek listája kromoszómánként.

X-kromoszóma	2. kromoszóma	3.kromoszóma	
1A	21A	61A	86C
2D	21C	61C	87B
3C*	22A	61F	87F-88A
4C	24A	63F*	89B
5A	25EF	66A*	89C
8A	29E	66F*	89E
8B	33F	68A	90E
8F-9A	34A	68C	93E
12D	35AB	69B*	96BC
14AB*	49EF	69C	97C*
	51A	70DE	99AB
	56C	77C*	100A
	60E	82DE(D*)	100B
	60F	84AB	100F

4.5. táblázat A listában csillaggal jelöltük az általunk azonosított, illetve pontosított kötőhelyeket.

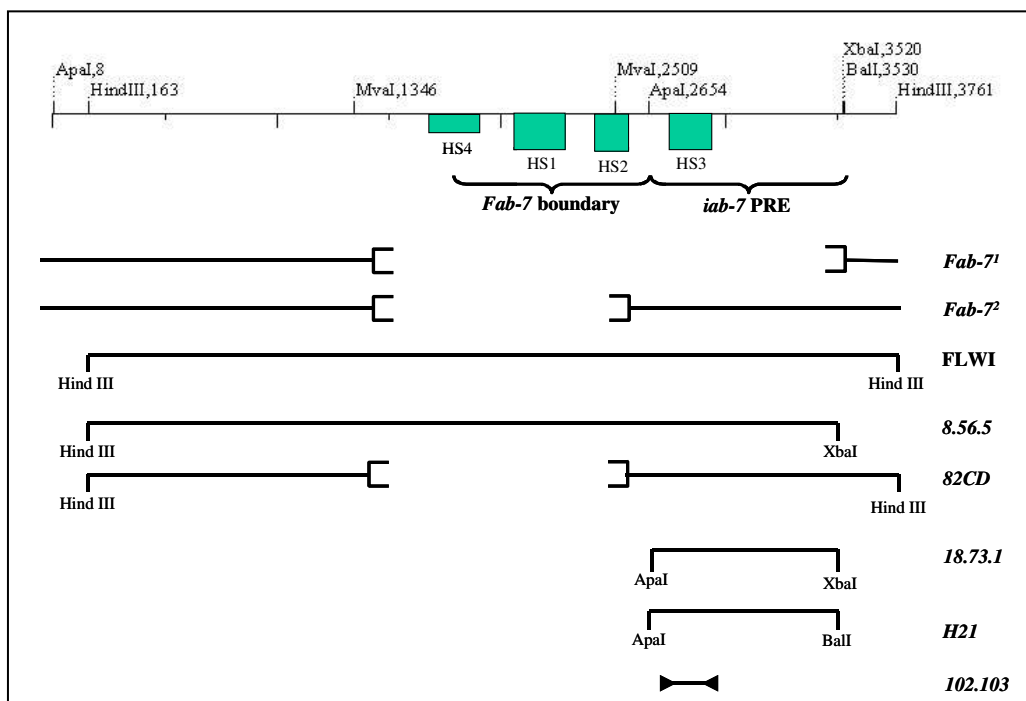
Az óriáskromoszómák immunhisztokémiai vizsgálata mindig meglehetősen durva képet ad egy adott kromatinfehérje kötődéséről. A számos PC-G kötőhelyet (PRE-t) tartalmazó BX-C (89E) például a nyálmirigyben represszált állapotban van, ezért a vad E(Z) fehérjének is erős kötőhelye, és ott nem is várunk semmilyen különbséget a kötődés intenzitásában $E(z)^{Trm}/Df(3L)E(z)^{IR3}$ háttérben. Az E(Z) festés a korábbi megfigyeléseknek megfelelően (Carrington és Jones, 1996), esetünkben is eredményezett egy kiküszöbölhetetlen, nagyjából egyenletes, és a teljes óriáskromoszómára kiterjedő enyhe háttérfestést az erősen festődő „E(Z)-kötő” sávok megjelölése mellett.

Nem találtunk azonban erős, a vad E(Z) fehérjére nem jellemző kötőhelyeket (például a nem E(Z) fehérje kötő, de TRX asszociált kötőhelyeken a kizárólag mutáns ($E(Z)^{TRM}$) fehérjét tartalmazó hemizigóta lárvák óriáskromoszómáin sem. Ebből azt a következtetést vontuk le, hogy a mutáns fehérje alapvetően nem kötődési mintázatában, hanem működésében

különbözik a vadtól, és olyan kromatin régiókban okoz a normálisnál erősebb inaktivációt, mely régiók hasonló mértékben egyben a vad E(Z) fehérjének is kötőhelyei.

4.5. AZ $E(Z)^{TRM}$ TÁMADÁSPONJÁNAK TÉRKÉPEZÉSE PRE-T TARTALMAZÓ PÁROSODÁS-ÉRZÉKENY TRANZGENIKUS RIPORTERGÉN KONSTRUKCIÓK SEGÍTSÉGÉVEL

Mivel az óriáskromoszómákon megjelenő E(Z) pozitív sávok csak meglehetősen durva képet nyújtanak egy adott kromatinfehérje kötődési helyéről, úgy gondoltuk, hogy a mutáns fehérje inaktivációs működését érdemes finomabb felbontású rendszerben is térképeznünk. Erre kézenfekvő lehetőségként kínálkozott a PRE-t tartalmazó, párosodás-érzékeny inaktivációt mutató transzgenikus vonalak alkalmazása.



4.10. ábra A *Fab-7* régió vázlatos térképe a hiperszenzitív helyek feltüntetésével, és a régióból származó párosodás-függő inaktivációt okozó PRE-darabok elhelyezkedési viszonyai

HS1, HS2, HS3 HS4: 1.,2.,3.,4. számú nukleáz-hiperszenzitív hely a régióban (Hagström és mtsai 1997 alapján). HindIII, MvaI, BclI, ApaI, XbaI restriktációs enzimek hasítóhelyei. *Fab-7'*: a *Fab-7'* deléción által kiejtett szakasz; *Fab-7''*: a *Fab-7''* deléción által kiejtett szakasz. A felhasznált *iab-7* PRE-tartalmazó DNS darabok elhelyezkedése: *FLWI* (Cavalli és Paro, 1998), *8.56.5*. (Hagström és mtsai, 1997), *82CD* (Hogga és mtsai, 2001) *18.73.1*. (Hagström és mtsai, 1997), *H21* (Pintér Lajos közöletlen), *102.103*. (Mishra és mtsai, 2001).

Kísérleteinkhez a *bithorax*-komplex egyik jól feltérképezett, és laboratóriumunkban is intenzíven kutatott régióját, az *iab-7* PRE-t választottuk ki. Több olyan párosodás-érzékeny vonallal is rendelkezünk ugyanis, amelyek az *iab-7* PRE régió különböző méretű darabjait hordozták *miniwhite* ripotergén elé építve (Hagström és mtsai, 1997; Cavalli és Paro, 1998; Mihály és mtsai, 1999; Hogga és mtsai, 2001; Mishra és mtsai, 2001), ezért ezeket használtuk fel további finomtérképezésre. Elsőként olyan transzgén beépüléseket használtunk, amelyek a közel teljes hosszúságú 3598bp *HindIII-HindIII* és a 3337 bp *HindIII-XbaI Fab-7* fragmentet tartalmazták (4.10. ábra) különböző elrendezésű transzgenikus konstrukciókban. Az FLW1-ben a beépülés az X-kromoszómára történt (13F), ezért a konstrukciót homozigóta (párosodásra képes) formában tartalmazó nőstények szeme a hímekénél sokkal világosabb (4.11. ábra *a.*). Az $E(z)^{T_{rm}}$ az inszertet heterozigóta formában tartalmazó hímekben is erősen világosította a szemszínt (4.11. ábra *b.*), az inszertet homozigóta állapotban tartalmazó nőstények szemét pedig majdnem teljesen kifehérítette (4.11. ábra *c.*). További érdekességet jelentett, hogy az általunk használt inszert a *scalloped* (*sd*) gén szabályozó régiójába inszertálódott és az eredeti közlemény szerint is 28°C -on a kifejlődő állatok egy része jellegzetes *sd* fenotípust mutatott (Cavalli G, Paro R., 1998). Az $E(z)^{T_{rm}}$ nemcsak az inszert szemszínét világosította (azaz a *white* ripotergént inaktiválta), hanem a szomszédos *sd* génre is erős inaktiváló hatást gyakorolt. Kísérleteink szerint $E(z)^{T_{rm}}$ háttérben már 25°C-on és hímekben is erős *sd* fenotípus jelent meg (4.11. ábra *b.*), homozigóta párosodó transzgén kópiák jelenlétében pedig több nőstény állatnak teljesen hiányzott a szárnya (4.11. ábra *c.*).

Fenti kísérleteink egyértelműen azt bizonyították, hogy az $E(z)^{T_{rm}}$ mutánsnak hatása van a BX-C-ből származó PRE és boundary szakaszt is tartalmazó transzgenikus inszert inaktivációjára, és ennek az inaktivációnak a mértéke függ attól, hogy az inszert párosodott állapotban van-e jelen. Ezen kívül kísérleteink azt jelezték, hogy a kialakult inaktív állapot

képes a BX-C-ből származó DNS szakasz jelenlétében a két riportergénen át terjedve még a további 3 kb távolságra lévő *sd* gén promóter régiójának inaktiválására is.

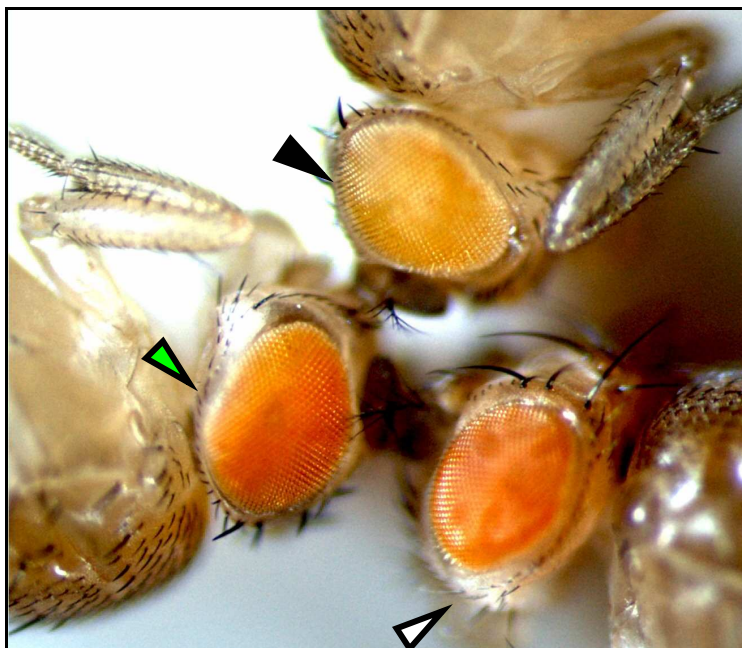


4.11. ábra Párosodás-érzékeny *FLWI* inszertet tartalmazó állatok szemszíne

a.) *FLWI* X-kromoszómás inszertet hemizigóta állapotban tartalmazó hím és a párosodó inszertet hordozó nőstény szemszíne. b.) *FLWI* inszertet hemizigóta állapotban tartalmazó $E(z)^{Trm}/+$ hím. Megfigyelhető a szemszín kivilágosodása és *sd* fenotípust mutató szárny. c.) *FLWI* inszertet homozigóta állapotban tartalmazó $E(z)^{Trm}/+$ nőstény. Látható a szemszín erős kivilágosodása és az extrém *sd* fenotípus.

További kísérleteink arra irányultak, hogy megpróbáljuk az $E(z)^{Trm}$ -függő inaktivációhoz szükséges *iab-7* régiót minél inkább leszűkíteni. Ehhez először is megpróbálkoztunk egy 200 bp-ral rövidebb, de a *Fab-7*² határoló szekvenciát („boundary”) és az *iab-7* PRE-t is tartalmazó olyan konstrukt használatával (Hagstrom és mtsai, 1997), amely a BX-C szakaszt a *white enhancer* és a *miniwhite* közé építve tartalmazta és a riportergén után határoló régióval is rendelkezett (4.10. ábra).

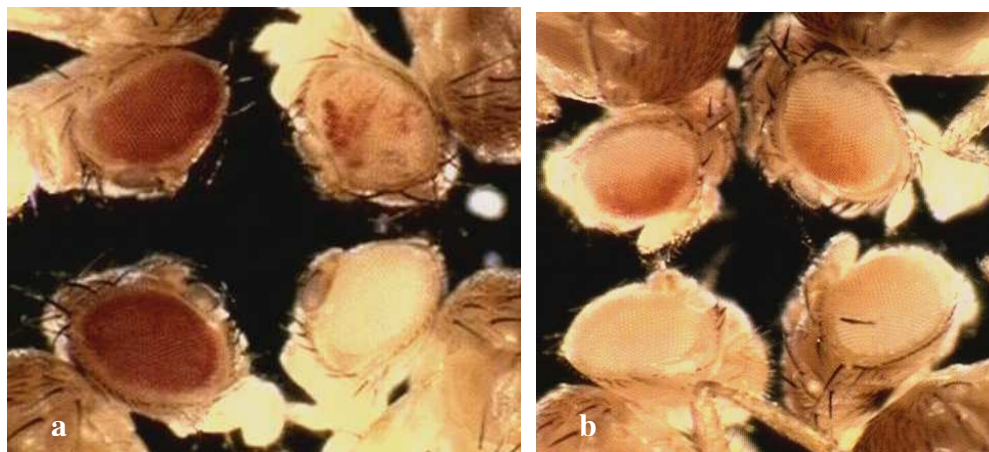
A 8.56.5. jelű X-kromoszómás inszertre az $E(z)^{Trm}$ csak a nőstényekben (párosodás-függő módon) mutatott világosító hatást, míg a funkcióvesztéses és antimorf $E(z)$ allélok a konstrukciót hordozó állatok szemszínét sötétítették (4.12. ábra). Tehát ez a DNS-darab tartalmazta az $E(z)$ -függő normális inaktiváláshoz szükséges elemek mellett az $E(z)^{Trm}$ -függő erősebb inaktiváció feltételeit is. Megpróbáltuk elválasztani a fent említett szekvencia részeket olyan párosodás-függő inaktivációt mutató inszertek segítségével, amelyek elválasztották egymástól az eddigi inszertekben együttesen jelenlévő *iab-6* és *iab-7* közötti határoló szakaszt („boundary”) és az *iab-7* PRE-t.



4.12. ábra Különböző $E(z)$ allélok hatása a homozigóta 8.56.5. inszert szemszínére
A homozigóta állapotban narancssárga 8.56.5. szemszín (üres háromszög) az $E(z)^{Tm}$ erősen világosítja (kitöltött fekete háromszög), míg az $E(z)^{60}$ antimorf allél erős sötétítő hatással bírt (bal alsó zöld háromszög).

A 82CD-típusú inszertek a $Fab-7^2$ állatokból származó *HindIII-HindIII* fragmentet tartalmazzák, azaz a boundary hiányzik belőlük, de egyébként azonosak az előzőleg vizsgált 8.56.5.-típusú inszertekkel (4.10. ábra). A két rendelkezésre álló inszert (82CD, *F12*) ellentmondásosan viselkedett, a 82CD-t az $E(z)^{Tm}$ sötétítette, az *F12*-t világosította. Valószínűleg a beépülés környezetében lévő szekvenciák is befolyásolták az interakciót ezért, szükségesnek látszott további párosodás-függő inaktivációt mutató beépülések izolálása az X kromoszómás *F12* inszert mobilizálásával (ld.: Anyagok és módszerek).

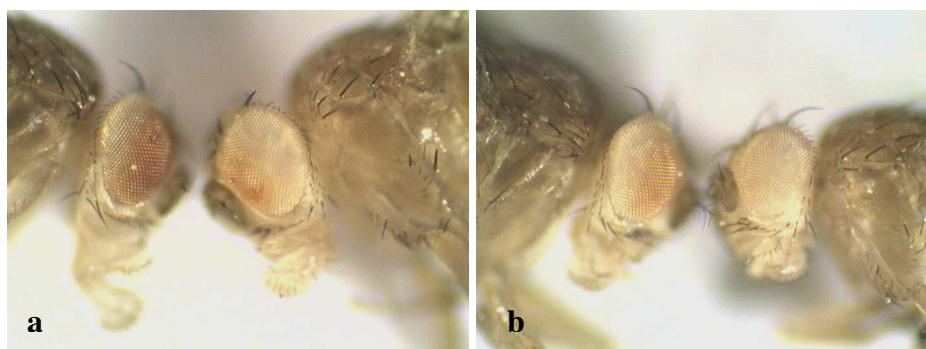
A párosodás-függő inszertek közül 6 olyan második kromoszómás beépülést találtunk, amelyeknek homozigóta állapotban a szemszíne nem volt teljesen fehér (csak ezek lehetnek alkalmasak arra, hogy világosító hatást keressünk a segítségükkel). A vonalak mindegyikének a szemszínét világosította homozigóta állapotban az $E(z)^{Tm}$, miközben az inszert heterozigóta állapota esetén nem mutatott észlelhető hatást (4.13. ábra a.).



4.13. ábra A párosodás-érzékeny *F12.37.* és a nem párosodás-érzékeny *F12.20* inszertet hordozó állatok szemszíne heterozigóta és homozigóta állapotban, vad és $E(z)^{Trm}$ háttérben.

a. A párosodás-érzékeny *F12. 37.* számú inszert szemszínét heterozigóta állapotban nem befolyásolja az $E(z)^{Trm}$ jelenléte, homozigóta állapotban azonban a mutáció erős világosító hatással bír. *b.* A nem párosodás-érzékeny *F12. 20.* inszerció heterozigóta állapotban is világosodik az $E(z)^{Trm}$ mutáns háttéren, a kissé sötétebb szemű homozigótákban a világosító hatás szintén erős, de a kikelő állatok szeme nem teljesen fehér. Az ábrán bal oldalon a heterozigóták, jobb oldalon a homozigóták láthatók, felül vad háttéren, alul $E(z)^{Trm}$ mutáns háttéren.

A felhasznált párosodás-függő *F12*-ből ugratott inszertek mindegyikének szemszíne világosodott két funkcióvesztéses *trx-G* allél (*Df(3R)red-P93*, *ash1²²*) hatására is (4.14. ábra). A funkcióvesztéses $E(z)$ allélok pedig a szemszín erősen sötétítették. Ez a sötétítő hatás olyan kifejezett volt, hogy a laboratóriumunkban folytatott röntgen mutagenézis kísérletben több új $E(z)$ allélt is sikerült izolálni a *82CD* inszertet sötétítő hatás alapján (Ardó László, közöletlen), ami azt bizonyítja, hogy a vad $E(z)$ fehérje döntő szerepet játszik az adott szakasz párosodás-függő inaktivációjának kialakításában.



4.14. ábra A párosodás-érzékeny *F12.18.* (*a.*) és a nem párosodás-érzékeny *F12.20* (*b.*) inszertet hordozó állatok szemszíne heterozigóta és homozigóta állapotban, vad és *Df(3R)red P93* háttérben

A képeken bal oldalon a kontroll homozigóták, jobb oldalon a *trx* homozigóták láthatók. Homozigóta inszertekre a mutáció erős világosító hatással bír.

Találtunk olyan nem párosodás-érzékeny inszertet is (*F12.20.*), amely heterozigóta állapotban is kivilágosodott $E(z)^{Trm}$ háttérben (4.13. ábra *b.*) Ebben az esetben valószínűleg a beépülés környezetében lévő *cisz*-szekvenciák segítették elő az $E(z)^{Trm}$ inaktiváló működését. A *Trm* mutáció emellett az említett inszertet (*F12.20.*) természetesen homozigóta formában is kivilágosította.

Ezen az adatoknak az alapján megállapítható, hogy a határoló szekvenciát nem tartalmazó (82*CD*-típusú) konstruktok továbbra is tartalmazzák azt a szakaszt, amelyen keresztül az $E(z)^{Trm}$ -függő hiperinaktiváció érvényesül. Vagyis az ektopikus inaktivációhoz nem szükséges a határoló szekvencia jelenléte.

Mivel a 82*CD*-típusú inszertek a szigorú értelemben vett PRE-szakasz mellett még körülbelül 2.5 kb egyéb BX-C szekvenciát is tartalmaznak, a következő lépésben azt vizsgáltuk meg, hogy a leszűkített PRE szakasz („core-PRE”) önmagában elegendő-e az $E(z)^{Trm}$ -függő inaktiváció kialakulásához. Kísérleteinkben a PRE darabot *white enhanszer* és *miniwhite* riportergén közé épített *Apal-XbaI* fragmentet hordozó (4.10. ábra) vonalakat használtunk fel. Az ilyen típusú (18.8.6., 18.73.1., 18.34.6.) inszerteket homozigóta állapotban hordozó vonalak közül egyiknek a szeme sem világosodott az $E(z)^{Trm}$ hatására. Az $E(z)^{Trm}$ jelenléte nem világosította a még rövidebb PRE szakaszt hordozó vonalak szemszínét sem (H21, 102.103). A laborunkban végzett más irányú kísérletekből kiderült, hogy a 18.73.1. inszertet homozigóta formában hordozó állatok szemszíne funkcióvesztéses és antimorf $E(z)$ allélok háttérében megsötétedik (Honti Viktor közöletlen), ami valószínűsíti az $E(z)$ fehérje szerepét az említett 866 bp hosszúságú PRE szakaszon kialakuló represszió fenntartásában.

Kísérleteink alapján megállapítható, hogy az $E(z)^{Trm}$ ektopikus inaktiváló hatásához nem szükséges a határoló szekvencia, és nem elegendő önmagában a minimális *iab-7* PRE. A kísérletekben felhasznált vonalakat más ismert *Pc-G* és *trx-G* mutációk háttérében is vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy azok a vonalak, amelyek homozigóta formában

világosíthatóak az $E(z)^{Trm}$ -mel ugyanazok, amelyek *ash1* és *trx* funkcióvesztés allélokhatárében is kivilágosodnak. Eredményeink arra utalnak, hogy a PRE közvetlen közelében elhelyezkedő TRE (*Df(3R)red-P93*, *ash1*²² és *trx-G* mutációkra érzékeny) szakaszok jelenléte szükséges az ektopikus inaktiváció kialakulásához.

4.6. AZ $E(z)^{TRM}$ INTERAKCIÓI HŐMÉRSÉKLET-ÉRZÉKENY ÉS ANTIMORF $E(z)$ ALLÉLOKKAL

A *Trm* fenotípus változásának vizsgálata különböző, molekulárisan jellemzett, független $E(z)$ allélokkal fontos információkkal szolgálhat az $E(z)$ -komplexek működésére, a különböző mutációk által érintett domének funkciójára vonatkozólag. Ezért szükségesnek látszott annak eldöntése, milyen mértékben képesek különböző funkciókat érintő, független mutációk befolyásolni az $E(z)^{Trm}$ háttérben bekövetkező ektopikus inaktivációt (4.6. táblázat).

A hőmérséklet-érzékeny $E(z)^{61}$ allél (Wu és mtsai, 1989) az $E(z)^{Trm}$ -mel sem a restriktív hőmérsékleten, sem a még szemipermisszívnek tekinthető 25°C-on nem életképes. Az $E(z)^{61}$ allél számára permisszív hőmérsékleten, 18°C-on pedig a kikelő $E(z)^{61}/E(z)^{Trm}$ állatok a $+/E(z)^{Trm}$ kombinációnál erősebb trithorax-fenotípust mutatnak és sterilek annak ellenére, hogy önmagában az $E(z)^{61}/E(z)^{61}$ homozigóták élnek és nincs saját homeotikus fenotípusuk 18°C-on. Megfigyeléseink arra utaltak, hogy a hőmérséklet-érzékeny allél valójában a permisszív hőmérsékleten is rosszabbul működik a vadnál, és/vagy a vad $E(z)$ kópiánál rosszabb kompetitor, és ezért kevésbé gátolja, vagy esetleg egyenesen elősegíti a mutáns fehérje által létrehozott ektopikus inaktivációt.

Mivel az $E(z)$ dózisának csökkentése, illetve hipomorf allélkombinációk is jelentősen erősítik az $E(z)^{Trm}$ funkciónyeréses homeotikus fenotípusát, és nagymértékben rontják a transzheterozigóták életképességét, meglepődve tapasztaltuk, hogy bizonyos $E(z)^{Trm}/E(z)^{antimorf}$ allélkombinációk nemcsak életképesek, hanem egynémely esetben a trithorax-fenotípus erős szuppresszorai, sőt az életképességet is számottevően javítják (4.5. táblázat).

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELESLÉSEK

Az antimorf $E(z)$ allélok által okozott fenotipikus szuppresszió két antimorf tulajdonságú (Pelegrini és Lehmann 1994) *son* allél esetében nemcsak a vad $E(z)$ kópia jelenlétében tapasztaltnál ($E(z)^{Tm}/+$) erősebb, de még annál is, mint amit egy menekítő konstrukció formájában bejuttatott, extra kópia $E(z)$ gén okoz.

Keresztezett allél	T1 → T2		T3 → T2		A5 → A4
A keresztezés irányát jeleztük	ap1	stp1	ap3	stp3	
<i>Oregon-R</i> ♂	31.5% n=818	0% n=212	77.3% n=616	2.8% n=212	41.8% n=160
<i>Oregon-R</i> ♀	16.7% n=2570	0% n=448	73.6% n=2706	1.7% n=448	41% n=546
$E(z)^{61}$ ♂	13%** n=58	0% n=58	18%** n=57	0% n=57	1%** n=35
$E(z)^{60}$ ♀	24%** n=57	0% n=57	19%** n=58	0% n=58	100%** n=35
$E(z)^{60}$ ♂	50% n=152	0% n=152	75% n=152	24% n=152	100% n=22
$E(z)^{son1}$ ♀	0%** n=298	0% n=298	0%** n=298	0% n=298	0%** n=45
$E(z)^{son1}$ ♂	0%** n=128	0% n=128	0.7%** n=298	0% n=298	0%** n=46
$E(z)^{son2}$ ♀	0%** n=166	0% n=166	15%** n=166	0% n=166	0%** n=42
$E(z)^{son2}$ ♂	2%** n=310	0% n=310	18%** n=310	0% n=310	0%** n=74
$E(z)^{son3}$ ♀	0.1%** n=856	0% n=856	0.1%** n=856	0% n=856	0%** n=46
$E(z)^{son3}$ ♂	0%** n=184	0% n=184	1%** n=184	0% n=184	0%** n=42

4.6. táblázat. Az $E(z)^{Tm}$ interakciói különböző antimorf és hőmérséklet-érzékeny $E(z)$ allélokkal. Az allélokat a megadott irányból kereszteztük ellentés nemű $E(z)^{Tm} Fab-7^l/Bal$ heterozigótákkal. A használt rövidítések, szimbólumok magyarázatát ld. a 4.2. táblázatban.

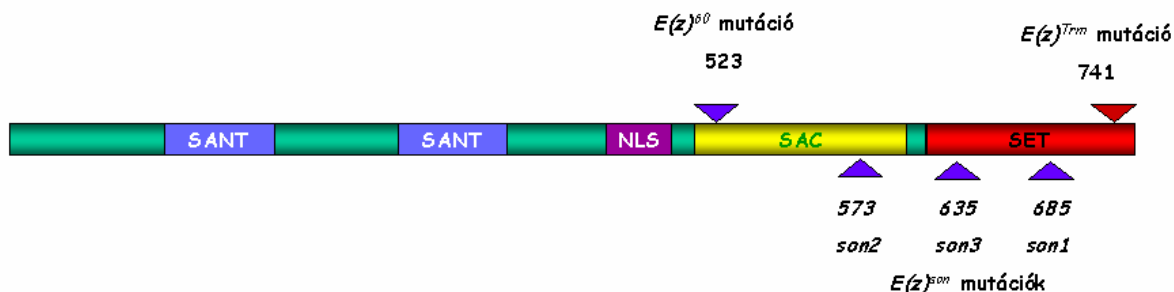
Az említett két allél (a *son1* és a *son3*) homozigóta formában, egymással, és más, funkcióvesztéses $E(z)$ allélokkal egyaránt letális, és emellett erős z^1 -szuppresszor hatást mutat. Meglepő módon azonban az ivarvonal átültetéssel (pole cell transplantation) előállított $E(z)^{son1}/E(z)^{son3}$ klónokból származó embriók egyáltalán nem mutatnak Pc-jellegű homeotikus

transzformációkat (Pelegri és Lehmann, 1994). Tehát úgy tűnik, hogy az $E(z)^{son}$ allélokban történt mutáció csak az $E(z)$ gén valamely specifikus alfunkcióját érinti, és semmiképpen sem egyszerűen az $E(z)^{son}$ allélok erős Polycomb- és az $E(z)^{Trm}$ erős trithorax-fenotípusának valamiféle eredője okozza az $E(z)^{Trm}/E(z)^{son1}$ állatok csaknem vad fenotípusát.

Fenti következtetésünket alátámasztja, hogy az $E(z)^{son2}$ allél, amely a többi *son* alléllal letális, de funkcióvesztéses $E(z)$ allélokkal életképes és fertilis (bár a felnőtt állatokban poszterior irányú transzformációkat mutat), és saját kísérleteink szerint is a legerősebb Polycomb-enhanszer hatású, a leggyengébb $E(z)^{Trm}$ szuppresszor. Pc^2 alléllal hím irányból keresztezve a son^1 és son^3 allélok csak ritkán eredményezik kis sötét klónok megjelenését a 4. tergitlemezen (Mcp-fenotípus) és a Pc^2 domináns extra szex fésű fenotípusának sem szignifikáns enhanszerei, míg a son^2 allél keresztezése erős Mcp fenotípust eredményez, és a szárnylemez redukációjához vezet (erős Cbx fenotípus), emellett a legtöbb lábon extra szex fésűk jelennek meg. Megfigyeléseink abba az irányba mutatnak, hogy valószínűleg az antimorf allélok közvetlenül képesek módosítani az $E(z)^{Trm}$ funkcionyeréses jellegét. Lehetséges, hogy a *son* allélok által kódolt mutáns $E(z)$ fehérjék oly módon képesek közvetlen fizikai kölcsönhatásba lépni az $E(z)^{Trm}$ -mel, hogy a kétféle mutáns fehérjéből kialakuló komplex már nem, vagy alig mutatja az eredeti funkcionyeréses tulajdonságokat.

Ha közelebbről szemügyre vesszük az $E(z)^{son}$ mutációk elhelyezkedését a protein szekvencián (4.15. ábra) az $E(z)^{Trm}$ mutáció által érintett pozícióhoz képest, furcsa egybeesést figyelhetünk meg. Szembeötlő, hogy a legerősebb szuppresszor hatású $E(z)^{son1}$ pontmutáció által érintett aminosav (681 Phe→Ile) mindössze 60 aminosav távolságra helyezkedik el az $E(z)^{Trm}$ -ben mutáns arginintől, az $E(z)^{son3}$ még mindig a SET-doménen belül (635 Ile→Asn) de már 106 aminosavnyira, míg a gyenge *Trm*-szuppresszor $E(z)^{son2}$ még további 62 aminosavval távolabb (573 Pro→Ile), a SET-doménen kívül, az úgynevezett cisztein-gazdag PreSET-doménben van (a *son* allélok pozíciója Jones és Carrington személyes közlése). A különböző

son mutánsokról tehát megállapítható, hogy minél közelebb következett be mutáció az $E(z)^{Trm}$ pozícióhoz képest, annál erősebb Trm-szuppresszor mutáns jött létre.



4.15. ábra Az ENHANCER OF ZESTE fehérje szerkezete a konzervált domének feltüntetésével
Az ábrázolt régióban elhelyezkedő antimorf mutációk helyzetét kék nyilak az $E(z)^{Trm}$ mutáció helyzetét piros nyíl jelöli. Az $E(z)^{60}$ mutáció oka egy *hobo* transzpozon beépülése, a jelzett aminosav pozíció után.

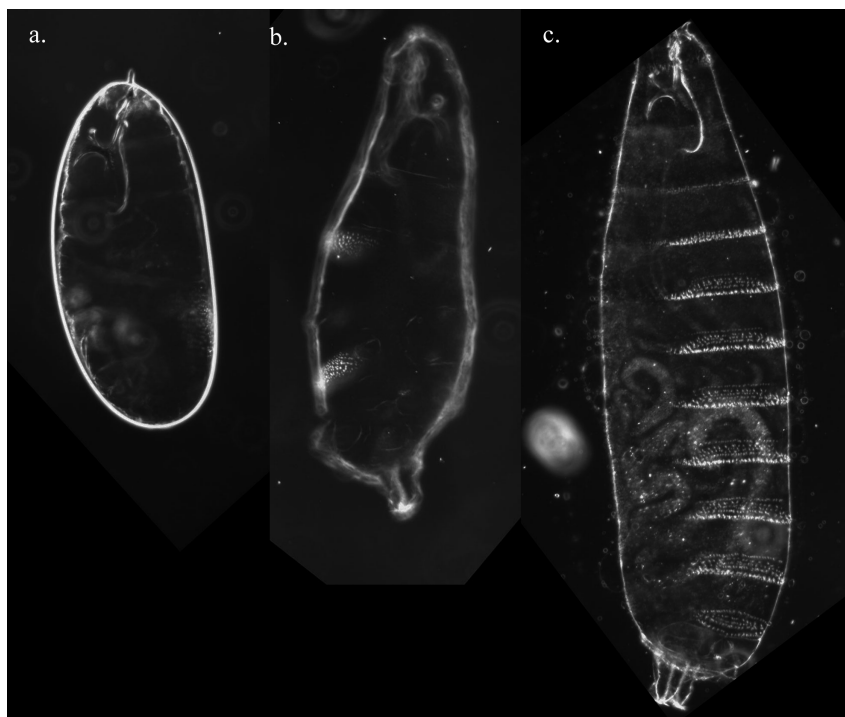
Vagyis úgy tűnik, hogy a SET domén különböző pozícióiban hibás pontmutáns fehérjék, egymással közvetlen kölcsönhatásban, vagy legalábbis hatásuk eredőjében nemcsak kompenzálni képesek az $E(z)^{Trm}$ hatását, hanem az is kiderült, hogy ez a kompenzáció annál tökéletesebb, minél közelebb vannak egymáshoz a kölcsönhatásba lépő mutáns fehérjékben érintett aminosav pozíciók.

Az $E(z)^{60}$ jelű antimorf allél egy *hobo* inszerciót tartalmaz, melynek következményeképpen egy 523 aminosav hosszúságú, SET-domén és cisztein-gazdag régió mentes, C-terminálison csonkolt fehérjét kódol (Jones és Gelbart 1993). Ez az erős antimorf allél is kikel az $E(z)^{Trm}$ -mel *transz* helyzetben, bár itt a kikelő állatok fenotípusa sokkal kevésbé szuppresszált, mint a pontmutáns antimorf allélok esetében. Az, hogy az $E(z)^{60}/E(z)^{Trm}$ kombináció életképes, és az $E(z)^{60}$ valamennyire gyengíteni is képes az $E(z)^{Trm}$ fenotípusát, arra utal, hogy esetleg az $E(z)^{60}$ által kódolt csonka fehérje is képes interakcióba lépni, vagy valamilyen szinten kompetálni a TRM-fehérjével. Ha keletkezik $E(z)^{60}/E(z)^{TRM}$

komplex, az blokkolhatja az $E(z)^{TRM}$ -et, vagy a mőködésképtelen $E(z)^{60}$ egyszerően részben helyettesíti és leszoríthatja a funkciónyeréses tulajdonságú $E(z)^{TRM}$ -et az $E(z)$ kötőhelyekről.

4.7. AZ $E(z)^{TRM}$ HATÁSA MATERNÁLIS NANOS MUTÁCIÓRA

Az $E(z)^{son}$ allélok a maternális nanos fenotípus szuppresszoraiként izolálták (4.16. ábra). Azoknak a *suppressor of nanos* (*son*) alléloknak, amelyek az $E(z)^{Trm}$ fenotípusát erősen képesek szuppresszálni erős nos-szuppresszor hatásuk van, de gyenge saját homeotikus fenotípussal rendelkeznek.



4.16. ábra A nanos fenotípus szuppressziója

a.) Homozigóta nos^{L7} embriók fenotípusa: a hátulsó szelvényezett régió teljesen hiányzik. b.) $hb^{7M}nos^{L7}/nos^{L7}$ embriókban a fenotípus gyengén szuppresszáldódik, két-három szelvény kifejlődik. c.) $hb^{7M}nos^{L7}/E(z)^{son}nos^{L7}$ embriókban a fenotípus teljesen szuppresszáldódik, a vad fenotípusú embriók életképesek és a kifejlődő felnőtt állatok fertilisek.

Kíváncsiak voltunk arra, hogy az $E(z)^{Trm}$ befolyásolja-e a maternális nanos fenotípus megjelenését, és milyen hatással van a leírt *son* allélok nos-szuppresszor fenotípusára. Más szóval meg kívántuk vizsgálni, találunk-e ebben a teljesen független rendszerben is arra utaló jelet, hogy az antimorf és a funkciónyeréses $E(z)$ fehérje közt különleges interakció lép fel, és ebben az esetben is igaz-e az, hogy a kétféle mutáns fehérje együttes jelenléte a vadhoz

hasonlóan mőködő fehérje-komplexet eredményez. Ennek érdekében $E(z)^{Trm}hb^{7M}nos^{L7}/E(z)^{son}nos^{L7}$ genotípusú anyáktól származó embriók abdominális fenotípusát vizsgáltuk meg (4.7. táblázat).

Mint az a 4.7. táblázatból is kiolvasható, az $E(z)^{Trm}$ allél bevezetése szignifikánsan gyengítette a vizsgált $E(z)^{son}$ allélok nos-szuppresszor fenotípusát. Megjegyzendő, hogy itt is erősebb szuppresszió lépett fel a mutációs helyben közelebb lévő $E(z)^{son3}$ allél esetében, annak ellenére, hogy ennek az allélnak a saját nos-szuppresszor fenotípusa ötször olyan erős, mint a másik vizsgált allélé ($E(z)^{son2}$). Emellett az $E(z)^{Trm}$ saját gyenge, de szignifikáns nos-enhanszer fenotípusa arra utal, hogy a funkciónyeréses allél a *gap* géneken is a vad $E(z)$ fehérjénél erősebb represszió létrehozására képes. Pelegri és Lehmann kísérletei szerint még gyenge hipomorf funkcióvesztéses $E(z)$ allélok is gyenge nos-szuppresszorok, míg az általunk izolált allél ellentétes irányú fenotípusa a funkciónyeréses jelleg újabb jelzője.

Keresztezett allélok	nos^{L7}	$hb^{7M}nos^{L7}$	$E(z)^{Trm}hb^{7M}nos^{L7}$
nos^{L7}	0 (470)	3,69 (2140)	1,96* (1052)
$E(z)^{son2}nos^{L7}$	0,97 (103)	9,58 (511)	3,83** (1259)
$E(z)^{son3}nos^{L7}$	8,8 (270)	50,38 (917)	2,53** (849)

4.7. táblázat Különböző $E(z)$ allélok nos-szuppresszor fenotípusa

A nos-szuppresszió penetranciájának a legalább három abdominális szelvénnel rendelkező embriók százalékban kifejezett arányát tekintettük. A megvizsgált embriók számát zárójelben tüntettük fel. *A penetrancia ($P<0,01$) szinten különbözik a kontrolltól. **A penetrancia ($P<0,001$) szinten különbözik a kontrolltól.

Eddigi kísérleteink alapján megállapítható, hogy a mutáns $E(z)^{Trm}$ fehérje a vad és a pontmutáns $E(z)$ fehérjékkel egyaránt képes együttműködni, és valószínűleg a fehérjék C-terminális részének közvetítésével közvetlen fizikai kapcsolatba lépve homomultimer komplexeket alkotnak. Kísérleteink többségében a mutáns $E(z)^{Trm}$ heterozigóta formában van jelen, ekkor a felépülő komplexek tartalmazhatnak kizárólag mutáns fehérjét, lehetnek vegyes

összetételű komplexek, vagy kizárólag vad fehérjét tartalmazóak. Az antimorf allélok bevezetése esetén pedig a csak $E(z)^{TRM}$ fehérjét, és csak antimorf $E(z)$ fehérjét tartalmazó komplexek mellett megjelennek vegyes mutáns komplexek is.

4.8. AZ $E(z)^{TRM}$ INTERAKCIÓJA MÁR *POLYCOMB*-CSOPORTBA TARTOZÓ MUTÁCIÓKKAL

Az $E(z)^{Trm}$ reverziója során is kiderült, hogy a domináns *Trm* fenotípus nemcsak funkcióvesztéses $E(z)$ allélokkal szüntethető meg. Két ismert második kromoszómás *Pc*-*G* génnek, a *Polycomblake* (*Pcl*) és az *Enhancer of Polycomb* [*E(Pc)*] géneknek az $E(z)^{Trm}$ reverziós kísérletben izolált röntgen alléljai (Sipos L., közöletlen) szintén nagyon erősen szuppresszálták az $E(z)^{Trm}$ heterozigóták domináns anterior irányú transzformációit. Mivel ismert, hogy a *POLYCOMB* fehérjék alapvető szerepüket, az általuk szabályozott gének irányított represszióját általában egymással együttműködve látják el (Franke és mtsai. 1992, Rastelli és mtsai. 1993, Carrington és Jones 1996, Tie és mtsai. 2001), érdekesnek látszott megvizsgálni, hogyan hatnak az $E(z)^{Trm}$ funkciónyeréses fenotípusára a pszeudo-revertánsként izolált *Polycomb*-csoportba tartozó gének más, ismert funkcióvesztést okozó alléljai. Miután a megvizsgált ismert *Pcl* allélok (Pcl^{T1} , Pcl^{R5}) erős fenotipikus szuppresszornak bizonyultak (4.8. táblázat), és a rendelkezésünkre álló ismert $E(Pc)$ allélnak is számottevő szuppresszor hatása volt (4.8. táblázat), érdemesnek látszott más ismert *Pc*-*G* mutánsok hatását is megvizsgálni.

Kísérleteink elvégzésének idején az $E(z)$ fehérje molekuláris partnereiről semmiféle információ sem volt ismert. A vizsgált funkcióvesztéses, illetve funkciónyeréses $E(z)$ allélok korábbi kísérletekben (Campbell és mtsai, 1995) általában csak gyenge és nehezen értékelhető, kis penetranciájú poszterior transzformációkat okoztak más ismert *Pc*-*G* mutánsokkal kombinálva, ezért az $E(z)^{Trm}$ erősen szuppresszálnak fenotípusa sokkal ígéretesebbnek látszott a vad $E(z)$ funkciót mediáló kölcsönható partnerek keresésére. Ezért az $E(z)^{Trm}$ -et számos ismert *Pc*-csoportba tartozó gén reprezentatív alléljával kereszteztük, és a

kikelő, megfelelő genotípusú állatok fenotípusát, az Anyagok és módszerek fejezetben részletesen leírt módon, értékeltük (4.8. és 4.9. táblázat).

Több olyan ismert *Pc*-G gént is találtunk, melyek az $E(z)^{Trm}$ heterozigóta fenotípusát valamely oldalról keresztezve oly mértékben szuppresszálták, hogy a kikelő transzheterozigóta állatok, vagy legalábbis bizonyos hányaduk, semmiféle anterior irányú transzformációt nem mutatott. Ezek a *Polycomblake* (*Pcl*), az *extra sexcomb* (*esc*), a *Su(z)12*, a *polyhomeotic* (*ph*), *pleiohomeotic* (*pho*) és a *Su(z)5* voltak.

Keresztezett allél	T1 → T2		T3→T2		A5→A4
A keresztezés irányát jeleztük	ap1	stp1	ap3	stp3	
<i>Oregon-R</i> ♂	31.5% n=818	0% n=212	77.3% n=616	2.8% n=212	41.8% n=160
<i>Oregon-R</i> ♀	16.7% n=2570	0% n=448	73.6% n=2706	1.7% n=448	41% n=546
<i>Pcl^{R5}</i> ♂	0% ^{**} n=78	0% n=78	0% ^{**} n=78	0% n=78	0% ^{**} n=19
<i>esc²CyO</i> ♂	5.5% ^{**} n=200	0% n=200	9.5% ^{**} n=200	0% n=200	28% [*] n=50
<i>esc¹⁰</i> ♂	6.4% ^{**} n=980	0% n=980	17.6% ^{**} n=980	0% n=980	15% ^{**} n=221
<i>esc¹⁰</i> ♀	1.8% ^{**} n=272	0% n=272	5.1% ^{**} n=272	0% n=272	2.6% ^{**} n=75
<i>pho¹</i> ♂	0% ^{**} n=298	0% n=300	65% ^{**} n=300	0% n=300	11% ^{**} n=39
<i>pho¹</i> ♀	9% ^{**} n=458	0% n=460	19.5% ^{**} n=460	0% n=460	0% ^{**} n=53
<i>ph⁴¹⁰</i> ♀	2% ^{**} n=402	0% n=402	11.4% ^{**} n=402	0% n=402	NA
<i>ph⁴¹⁰</i> ♂	9% ^{**} n=542	0% n=542	22% ^{**} n=517	0% n=517	33% n=98
<i>Su(z)5</i> ♂	4% ^{**} n=241	0% n=241	19% ^{**} n=241	0% n=241	31% n=148
<i>Su(z)12³</i> ♂	9,4% ^{**} n=239	0% n=239	2.5% ^{**} n=239	0% n=239	33% n=102

4.8. táblázat Az $E(z)^{Trm}$ interakciói *Polycomb*-csoportba tartozó géneknek a fenotípus erős szuppresszióját okozó mutáns alléljeivel

Az allélokat a megadott irányból kereszteztük ellentés nemű $E(z)^{Trm} Fab-7^1/Bal$ heterozigótákkal. A használt rövidítések, szimbólumok magyarázatát ld. a 4.2. táblázatban. NA: nincs adat, a *ph⁴¹⁰* ♀ keresztezése nem vezet életképes transzheterozigóta hímek kikeléséhez (szintetikus letalitás) ezért a hímek tergittranszformációjának mértéke ebben az esetben nem értékelhető.

Különösen erős szuppresszor hatása van a *Polycomblike* (*Pcl*) gén minden vizsgált alléljának, bármely oldalról keresztezzük is. A *Pcl/+; E(z)^{Trm}/+* kettős heterozigóta állatok túlnyomó többségében a *Trm* fenotípus nyomtalanul eltűnik. A *Pcl* mutánsok saját poszterior irányú transzformációi vagyis A4 tergiten A5-re jellemző sötét klónok megjelenése, illetve a második és harmadik pár lábbon extra szex-fésű fogak megjelenése nem váltak gyakoribbá. A *Pcl* tehát erősen haplo-insufficiensnek mutatkozik az *E(z)^{Trm}*-fenotípusának megjelenése szempontjából, ami arra utal, hogy a PCL géntermék mennyisége szükséges az *E(z)^{Trm}* által a *bithorax*-komplex *cis*-regulátorain kiváltott ektopikus inaktiváció kialakulásához. Ezen kívül úgy tűnik, hogy maga a *Pcl* lokusz nem áll *E(z)* szabályozás alatt, ami összhangban van azzal, hogy az óriáskromoszómán elfoglalt helye (55B5-7) nem kötőhelye egyetlen ismert PC-G fehérjének sem (Függelék). Szintén erős szuppresszor hatása volt az *extra sex comb* (*esc*) gén mindkét kipróbált, funkcióvesztéses alléljának (*esc*², *esc*¹⁰). Ez különösen azért érdekes, mert az *esc* gén homozigóta életképes és recesszív, csak a felnőtt homozigóták mutatnak gyenge poszterior irányú transzformációkat (főleg *Mcp*-fenotípust, valamint a hímek második és harmadik pár lábán megjelenő extra szex fésű fogakat). Embriionális fenotípusa pedig csak a homozigóta anyáktól származó homozigóta embrióknak van (Sruhl G, 1981). Annak ellenére azonban, hogy az *esc* elsősorban anyai hatású, és legkevésbé sem haplo-insufficiens, az *E(z)^{Trm}* háttérben még hím irányból keresztezve is erősen szuppresszál, homozigóta *esc* háttérben (*esc*²/*esc*¹⁰) pedig az *E(z)^{Trm}* anterior transzformációi minden megvizsgált állaton megszűnnek (saját közöletlen adat).

Szintén igen erős fenotipikus szuppresszor a *pleiohomeotic* (*pho*) gén mindkét vizsgált allélja. A szuppresszáló hatás különösen anyai oldalról erőteljes. Itt azonban az abdominális hatás (a csaknem tökéletes szuppresszió) eltér a torszelvényeken látható erőteljes, de gyakran részleges hatástól. Az *esc* és a *pho* egyaránt olyan PC-G gének, amelyek amorf alléljai homozigóta életképesek, és nincs saját domináns fenotípusuk.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELESLÉSEK

Keresztezett allél A keresztezés irányát jeleztük	T1 → T2 ap1 stp1		T3→T2 ap3 stp3		A5→A4
<i>Oregon-R</i> ♂	31.5% n=818	0% n=212	77.3% n=616	2.8% n=212	41.8% n=160
<i>Oregon-R</i> ♀	16.7% n=2570	0% n=448	73.6% n=2706	1.7% n=448	41% n=546
<i>Pc</i> ¹ ♂	0.6% ^{**} n=342	0% n=342	39.4% ^{**} n=292	0% n=292	14% ^{**} n=96
<i>Pc</i> ¹ ♀	0% ^{**} n=342	0% n=342	48% ^{**} n=292	0% n=292	58% ^{**} n=96
<i>Pc</i> ³ ♂	0.% ^{**} n=78	0% n=78	69% n=78	0% n=78	55% n=29
<i>Pc</i> ³ ♀	0.% ^{**} n=142	0% n=142	84% ^{**} n=142	0% n=142	51% ^{**} n=46
<i>Sce</i> ¹ ♀	0,4% ^{**} n=199	0% n=199	77% n=218	0% n=218	46% n=42
<i>Sce</i> ¹ ♂	0.9% ^{**} n=64	0% n=64	65.6% [*] n=64	0% n=64	50% n=23
<i>E(Pc)</i> ♂	2.1% ^{**} n=364	0% n=364	36.5% ^{**} n=364	0% n=364	70% ^{**} n=86
<i>Psc</i> ¹ ♂	0.6% ^{**} n=182	0% n=182	34% ^{**} n=182	0% n=182	67% ^{**} n=50
<i>Psc</i> ^{e22} ♂	41.9% [*] n=124	0% n=124	12.0% ^{**} n=124	0% n=124	14% [*] n=28
<i>Su(z)2</i> ¹ ♂	3% ^{**} n=80	0% n=80	9% ^{**} n=80	0% n=80	76% n=25
<i>Df(2R)Su(z)3</i> ^{iy} ♂	2% ^{**} n=64	0% n=64	31% ^{**} n=64	0% n=64	83% ⁺ n=3
<i>Scm</i> ^{DI} ♂	0% n=113	0% n=116	6% ^{**} n=116	0% n=116	32% n=25
<i>Asx</i> ^{PI} ♀	35% n=332	0% n=332	67% ^{**} n=332	0% n=332	71% ^{**} n=86
<i>Asx</i> ^{PI} ♂	35.6% n=216	0% n=216	56.4% ^{**} n=216	0% n=216	86% ^{**} n=74
<i>sxc</i> ¹ ♂	19% [*] n=182	0% n=182	78% n=184	0% n=184	86% [*] n=57
<i>sxc</i> ⁴ ♂	15% [*] n=80	0% n=80	40% ^{**} n=80	0% n=80	40% n=36

4.9. táblázat. Az *E(z)Trm* interakciói *Polycomb*-csoportba tartozó gének közepes szuppressziót okozó mutáns alléljeivel

Az allélokat a megadott irányból kereszteztük ellentés nemű *E(z)^{Trm}Fab-7¹/Bal* heterozigótákkal. A használt rövidítések, szimbólumok magyarázatát ld. a 4.2. táblázatban.

Ennél is érdekesebb, hogy az *esc* allélok, melyek homozigóta állapotban elsősorban a torban okoznak homeotikus derepressziót (erős extra sex comb fenotípust), az $E(z)^{Tm}$ által kialakított ektopikus inaktivációt is itt képesek erősebben antagonizálni, míg a homozigóta állapotban kiemelkedően erős abdominális fenotípusú *pho* allélok $E(z)^{Tm}$ szuppresszor hatása a tergiteken a legerősebb. Ez arra utal, hogy az $E(z)^{Tm}$ által kialakított ektopikus represszió hasonló összetételű és felépítésű komplexek kialakításához vezet az egyes szelvényekben hibásan kikapcsolt *cisz*-regulátorokon, mint amelyek a normálisan felépülő epigenetikus repressziót mediálják, csak ezek az ektopikus komplexek jóval érzékenyebbek a felépítő elemek mennyiségének kismértékű csökkenésére.

Hasonlóan meglepő, hogy a kipróbált homozigóta és hemizigóta életképes X-kromoszómás *polyhomeotic* allél (ph^{410}), melynek heterozigóta állapotban domináns fenotípusát nem írták le, mindkét irányból keresztezve (a heterozigóta nőstényekben is!) az $E(z)^{Tm}$ erős fenotipikus szuppresszora (4.8. táblázat). Emellett egy nagyon gyenge hipomorf *ph* allél (ph^{lac+3}), amelyet a proximális *ph* gén regulátor régiójába történt *miniwhite* riportergén inszerció hozott létre, és amely csak más, erősen *ph* allélokkal okoz poszterior irányú transzformációkat, szintén szignifikáns szuppresszora az $E(z)^{Tm}$ fenotípusnak (saját közöletlen adat).

A különösen erős szuppresszorok közé tartozik még a zeste-szuppresszor hatása alapján azonosított, de PEV-szuppresszor és Polycomb-szerű (Larsson és mtsai, 1996) hatást is mutató *Su(z)5*. A gén klónozott, és ismert, hogy az S-adenozil-metionin bioszintézisben, következésképp minden további S-adenozil-metionint igénylő katalitikus folyamatban, így például a fehérje-metilációban van szerepe.

Szintén a különösen erős szuppresszorok csoportjában találunk egy másik zeste-szuppresszor hatású lókuszt, a *Su(z)12*-t is, ebben az esetben érdekesség, hogy a génről

bebizonyosodott, hogy egyaránt képes a PEV, a PC-főggő homeotikus inaktiváció és a ZESTE-főggő párosodás-érzékeny inaktiváció befolyásolására (Birve és mtsai, 2001).

A *Pc*-G alléloknek egy másik csoportja szintén szignifikáns szuppresszora volt az $E(z)^{Trm}$ funkciónyeréses fenotípusnak (4.9. táblázat), ez a szuppresszió azonban sohasem volt teljes (a kikelő transzheterozigóta állatok mindegyike megkülönböztethető volt a vad kategóriától). Ilyen közepes, bár legalább egy transzformációt érintően szignifikáns szuppresszornak bizonyult a *Polycomb(Pc)*, az *Enhancer of Polycomb[E(Pc)]*, a *super sex comb (Sxc)*, illetve a *Sex combs on midleg (Scm)*, a *Su(z)2* komplex tagjai, illetve a *Sex comb extra (Sce)* és az *Anterior sex combs (Asx)* is.

A *Polycomb*-csoportba tartozó legtöbb gént az első lábon lévő szex fészű fogak számának megnövelése, illetve a hátrábbi lábakon ektopikus szex fészűk létrehozása alapján izolálták, ennek alapján valószínűsíthető, hogy az ANT-C-be tartozó homeotikus *Scr* gén első két torsiávényben kialakított aktivitási szintjének fenntartásában játszanak szerepet. A vizsgált *Pc*-G allélok csaknem mindegyike erős domináns szuppresszornak is bizonyult az első lábon lévő ektopikus apikális szőrök számának csökkentése alapján (Pc^l , Sce^l , $E(Pc)$, $Su(z)2^l$, Scm^{Dl}). Kevésbé egyértelmű a kép, ha a *Pc*-G allélok izolálásában nem használt, és az előzőekkel ellentétben nem a diszkuszokból, hanem az abdominális hisztoblasztokból kifejlődő tergitelemek transzformációját vizsgáljuk. Az Sce^l , az $E(Pc)$, a Psc^l , $Su(z)2^l$, az Sxc^4 , az Asx^{Pl} sőt az Scm^{Dl} sem szignifikáns szuppresszor a tergiteken. Ezek közül legkönnyebb az Asx^{Pl} hatását megértenünk, hiszen ez egy homozigóta életképes hipomorf allél, és az Asx^{Pl}/Asx^{Pl} homozigótáknak maguknak is *trx*-szerű, az ötödik tergite anterior transzformációjára utaló, saját homozigóta fenotípusa van.

A *Pc*-G allélokkal történő szisztematikus keresztezés során kiderül, hogy néhány esetben a *Trm* fenotípus szuppressziója mellett a keresztezett allél domináns „*Polycomb*”

fenotípusának súlyosbodását tapasztaltuk. Ez volt a helyzet a ph^{410} alléllal (amellyel allélunk szintetikus letális), több Pc , és az egyetlen hozzáférhető Sce allél esetében.

$E(z)^{Trm}$ háttérben a ph^{410} fenotípusa szigorodik, a hemizigóta hímek nem kelnek ki, pharat adult korukban elpusztulnak, és a kiboncolt állatok poszterior irányú transzformációi is súlyosabbak, mint vad háttérben. $E(z)^{Trm}$ háttérben a normálisan teljesen vad fenotípusú gyenge hipomorf ph^{lac+3} hímeken is megjelennek szokatlan poszterior irányú transzformációk (Mcp, esc), ami a ph^{410} allélra gyakorolt hatással párhuzamos, és a homeotikus génszabályozásban tovább csökkenő ph aktivitásra utal. Az $E(z)^{Trm}$ Pc -enhanszer hatása erős volt magának a *Polycomb* génnek az esetében is. Az erős, és csaknem 100%-os penetranciájú Cbx fenotípus megjelenése mellett a könnyen számszerűsíthető ektopikusan megjelenő szex fésűk számát vizsgálva is szignifikánsnak bizonyult az enhanszer hatás (3.10. táblázat).

Keresztezett allélok (A keresztezések irányát a felső sorban jeleztük)	Pc^I ♂	Pc^3 ♀
$Pc/E(z)^{Trm}$	4.79** n=84	3.81** n=21
$Bal/E(z)^{Trm}$	2.36 n=71	2.07 n=59

4.10. táblázat Az $E(z)^{Trm}$ allél jelenlétének független Pc allélok extra szex fésű (esc) fenotípusára gyakorolt enhanszer hatása

A számok a hímenként talált szex fésűt viselő lábak számát mutatják. n a megvizsgált egyedek száma. Az allélokat a megadott irányból kereszteztük ellentés nemű $E(z)^{Trm} Fab-7^I/Bal$ heterozigótákkal. A használt rövidítések, szimbólumok magyarázatát ld. a 4.2. táblázatban.

Megjegyzendő még, hogy az interakciós táblázatokban értékelt transzformációk mellett a Psc^I allél nagy gyakorisággal a szárnyon engrailed fenotípusú klónok megjelenését okozta, mely a nem homeotikus PC-regulált célgén, az *engrailed* erős represszióját jelzi, a homozigóta és hemizigóta $E(z)^{Trm}$ háttérben tapasztalt transzformációkhoz hasonló okok miatt.

A *Polycomb*-csoportba tartozó gének alléljaival történő interakciós keresztezések alapján azt feltételeztük, hogy az $E(z)^{Trm}$ a vad fehérje normális partnereivel együttműködve okoz inaktivációt. A különböző célgéneken a represszálo komplexek felépítése nem teljesen

azonos, emellett bizonyos PC-G géntermékek mennyisége is különbözik az eltérő fejlődési utat bejáró (pl.: diszkuszból, illetve hisztoblasztb l származó) szövetekben, ezért nem meglepő, hogy a különböző PC-G allélok szuppresszáló hatása is eltér a különböző testt jakban. Az interakciók támogatták azt a feltételezésünket, hogy a mutáns $E(z)^{TRM}$ valóban a vad E(z) fe  rj hez hasonló módon működik, és más PC-G fe  rj ket is tartalmazó inaktiváló-komplexek felépítésében vesz részt.

4.9. AZ $E(z)^{TRM}$ INTERAKCIÓI TRITHORAX-CSOPORTBA TARTOZÓ MUTÁNSOKKAL

A gének aktivált állapotának fenntartásában szerepet játszó, *trx*-csoport génjeinek mutációi a repressziót ellensúlyozó rendszer meggy ng l s hez vezetnek. Mindezek alapján a *trx*-csoport mut ci it l azt várjuk, hogy erősítik az $E(z)^{Trm}$ fenotipikus hatását. A 4.11. táblázatból látható, hogy eredményeink milyen mértékben feleltek meg ennek a v r koz s nak.

A két SET-domént tartalmazó *trx*-G tag, maga a *trithorax* (*trx*), illetve az *absent*, *small* and *homeotic disc1* (*ash1*), alléljai különösen erős enhanszerek. Ezek a mutációk emellett erősen csökkentik a transzheterozigóta egyedek életképességét is.

A *Drosophila* SWI/SNF komplex ismert tagjai, a *brm*, az *osa* a *mor*  s *snr1* valamennyien erős enhanszerek, b r az *snr1* enhanszer hatása a tergitekre korlátozódik. A vizsgált all lokon kívül Pallos Juditnak sikerült labor t riumunkban a *kismet* gén új allélját is izolálni annak erős Trm enhanszer fenotípusa alapján (Pallos és mtsai, közöletlen). A gént PC-szuppresszor fenotípusa alapján izolálták (Kennison  s Tamkun, 1988). A KISMET fe  rje a BRM fe  rj hez hasonló SNF2-szerű domént tartalmaz, ezen kívül myb DNS-kötő domént és **chromo**-domént is hordoz (Daubresse és mtsai, 1999), t h t feltehetőleg az SWI/SNF komplex ismert tagjaihoz hasonló közvetlen kromatinregul ci s szereppel b r.

A *kohtalo* (*kto*) gén viselkedése ellentmond s s volt, a gént tartalmazó kisméretű deléció $Df(3R)kto^2$ az $E(z)^{Trm}$ -mel szintetikus letalitást eredményez (nőstény oldalról keresztezve több mint 385 kikelő állatra nem jutott transzheterozigóta egyed), illetve h m

oldali keresztezésből kikelő néhány túlélő extrém erős *trx*-fenotípust mutat. A delécio azonban több ismert *trx*-G gént is tartalmaz a *kto*-n kívül, így az *ash1*-et.

Keresztezett allél	T1 → T2		T3→T2		A5→A4
A keresztezés irányát jeleztük	ap1	stp1	ap3	stp3	
<i>Oregon-R</i> ♂	31.5% n=818	0% n=212	77.3% n=616	2.8% n=212	41.8% n=160
<i>Oregon-R</i> ♀	16.7% n=2570	0% n=448	73.6% n=2706	1.7% n=448	41% n=546
<i>Df(3R)red-P93</i> ♂ (<i>trx def.</i>)	75%** n=138	2%** n=138	91%** n=138	25%** n=138	100%** n=42
<i>Df(3R)red-P93</i> ♀ (<i>trx def.</i>)	97%** n=165	3%** n=165	92%** n=165	29%** n=165	100%** n=74
<i>ash1²²</i> ♂	53%** n=135	0%	83%** n=139	13%**	84%** n=9
<i>ash1²²</i> ♀	50%** n=170	0%	84%** n=166	15%**	100%** n=83
<i>brm²</i> ♂	47%** n=100	0% n=100	91%* n=100	16%** n=100	100%** n=28
<i>osa²</i> ♂	59%** n=226	0% n=226	65%** n=222	1.8% n=226	72%** n=60
<i>urd²</i> ♂	10.3%** n=386	0% n=386	28.4%** n=386	0% n=386	56%* n=91
<i>snr1</i> ♂	28% n=358	0% n=358	48%** n=358	0% n=358	81%** n=72
<i>vdt²</i> ♂	6.2%** n=470	0% n=470	40.6%** n=470	0.4% n=470	62%** n=137
<i>kto¹</i> ♂	29.7% n=318	0% n=318	49%** n=346	0.43% n=346	62%** n=87
<i>skd²</i> ♂	23.5%* n=242	0% n=246	15.7%** n=246	0.4% n=246	35.8% n=57
<i>sls¹</i> ♂	17.8%** n=314	0% n=314	28%** n=314	0% n=314	36% n=77
<i>Trt^{R85}</i> ♂	45%** n=120	0% n=120	47%** n=120	0% n=120	91%** n=31
<i>Trt^{R85}</i> ♀	21.9%* n=114	0% n=114	30.7%** n=114	0% n=114	62%* n=26

4.11. táblázat Az $E(z)^{Trm}$ interakciói *trithorax*-csoportba tartozó gének mutáns alléljeivel

Az allélokat a megadott irányból kereszteztük ellentés nemű $E(z)^{Trm} Fab-7^1/Bal$ heterozigótákkal. A használt rövidítések, szimbólumok magyarázatát ld. a 4.2. táblázatban.

A *kto*¹ allél már sokkal kevésbé erős interaktor, a tergiten enhanszer hatást mutat, míg a lábakon szuppresszorként viselkedik. A *kohtalo* génről bebizonyosodott, hogy egy TRAP230 nevű transzkripciós faktort kódol (Janody és mtsai, 2001), szerepe valószínűleg az aktív kromatin konformáció fenntartásában nem közvetlen, lehetséges, hogy több ellentétes funkciójú (*Pc-G*, *trx-G*) gén transzkripciós aktivitásának fenntartásában is szerepe van.

Az eredetileg transzkripciós aktivátorként azonosított GAGA faktort kódoló *Trithorax-like (Trl)* gén hatása ellentmondásos volt. A tergiten egyértelműen enhanszernek látszott, míg a torszelvényeken szuppresszor hatása volt, akárcsak a *kto*¹-nek. Mivel a TRL fehérje nukleosómák mozgatására képes *in vitro*, és *in vivo* is nukleosóma mozgató komplexek tagja, ellentmondásos hatása nem annyira meglepő. Várhatóan nemcsak az aktív gének promóter és enhanszer szakaszainak működése igényel nukleosóma mozgatást, hanem a represszió fenntartásáért felelős szabályozó elemek (a PRE-k) is több DNS-kötő fehérje működését igénylik és sok, egymáshoz közel elhelyezkedő GAGA kötőhelyet tartalmaznak. A TRL fehérjének valószínűleg a PRE-k környékén kialakuló hiperszenzitív régiók létrehozásában is szerepe van. Emellett újabban a GAGA-faktort megtalálták bizonyos, POLYCOMB-fehérjéket tartalmazó komplexek építőelemeként is (Poux és mtsai, 2001). Más szerzők is kimutatták (Poux és mtsai, 1997), hogy bizonyos kombinációkban *Trl*-allélok *Pc*-enhanszerként működnek, miközben a homozigóta életképes hipomorf *Trl*^{13C} allélnak egyértelmű saját *trx*-szerű fenotípusa van.

Olyan, a *trx*-csoport tagjának tartott géneket is találtunk, amelyek egyértelmű szuppresszor hatást mutattak, ilyenek a *sallimus (sls)* és a *skuld (skd)*. Ezeket a géneket *Pc-G* allélok extra sex comb fenotípusát szuppresszáló hatásuk alapján azonosították, de mindezidáig nem sikerült bebizonyítani semmiféle direkt szerepüket az aktív kromatinszerkezet kialakításában. A például egy miozin könnyű lánc kinázt kódol, és bizonyos allélok kromoszóma kondenzációs hibákat is okoznak (Machado és Andrew, 2000).

Kísérleteink szerint a *Trm* heterozigóta háttérben kialakuló ektopikus repressziót a *sal* gén mutációja mindenestre gátolja, ami arra utal, hogy a SALLIMUS fehérje szerepe semmiféleképpen sem kizárólagosan a kromatin aktív állapotának fenntartása.

4.10. AZ $E(z)^{Trm}$ FENOTÍPUS ÉRZÉKENY A HISZTONOK SZINTJÉBEN BEKÖVETKEZŐ VÁLTOZÁSOKRA

A BX-C *cisz*-regulátorain a POLYCOMB-fehérjék hatására kialakuló represszált állapotot többen a heterokromatinra jellemző inaktív kromatinszerkezettel hasonlítják össze (Paro, 1990; Boivin és Dura, 1998; McCall és Bender, 1996). A heterokromatint felépítő, és a heterokromatin tovaterjedését és stabilizációját létrehozó faktorokat általában PEV-elősegítő (PEV-enhanszer), illetve gátló (PEV-szuppresszor) hatásuk alapján izolálták. Jelenlegi tudásunk alapján minden inaktív kromatinszerkezet alapját a hiszton fehérjékből felépülő nukleosómák jelentik. A hiszton géneket ecetmuslicában a 39D3-E1 régióban elhelyezkedő hiszton gén-klaszter kódolja, mely több száz tandem ismétlődő kópiát tartalmaz a nukleosómákat alkotó hiszton H2A, H2B, H3 és H4 hiszton génekből. A génklaszter deléciója PEV-szuppresszor hatású (Reuter és mtsai, 1982), de a hiszton-klaszter deléciójának nem sikerült semmiféle hatását kimutatni a PC-függő inaktivációra (Pirrotta, 1997).

Keresztezett allélok	T1→T2		T3→T2		A5→A4
(A keresztezések irányát jeleztük)	ap1	stp1	ap3	stp3	
<i>Oregon-R</i> ♂	31.5%	0%	77.3%	2.8%	41.8%
	n=818	n=212	n=616	n=212	n=160
<i>Df(2L)TW161</i> ♂	26.5%	0%	34.8% **	0%	29% *
38A6;40A4-B1	n=132	n=132	n=132	n=132	n=42
<i>Df(2L)TW65</i> ♂	22.4% *	0%	26% **	0%	4.5% **
37F5-38A1;39E2-F1	n=250	n=250	n=250	n=250	n=28
<i>Df(2L)DS6</i> ♂	13.8% **	0%	10% **	0%	34%
38F5;39E7-F1	n=254	n=260	n=260	n=260	n=65

4.12. táblázat Az $E(z)^{Trm}$ interakciói különböző, a hiszton gén-klasztert érintő deléciókkal. A kisméretű teljes hiszton-gén klaszter deléció (*Df(2L)DS6*) és a részleges, illetve nagyobb méretű hiszton-klaszter deléciók hatása a *Trm* homeotikus fenotípusra. Az allélokat a megadott irányból kereszteztük ellentés nemű $E(z)^{Trm}$ *Fab-7¹/Bal* heterozigótákkal. A használt rövidítések, szimbólumok magyarázatát ld. a 4.2. táblázatban.

Mivel kísérleteinkből úgy tűnt, hogy az $E(z)^{Trm}$ heterozigóta formában a normális inaktivációnál instabilabb ektopikus inaktivációhoz vezet a *cisz*-regulátorokon, érdemesnek tűnt megvizsgálni a hiszton-mennyiség csökkentésének hatását erre az érzékenyített rendszerre. A 4.12. táblázatból kiolvasható, hogy a hiszton géneket teljesen eltávolító legkisebb méretű, *Df(2L)DS6* deléción a legerősebb szuppresszor a harmadik lábon megjelenő apikális szőrök arányát tekintve, de a hiszton klasztert részlegesen deletáló *Df(2L)TW65*, illetve a viszonylag nagy méretű *Df(2L)TW161* deléción esetében is számottevő szuppresszor hatás mutatható ki minden vizsgált transzformáció tekintetében.

Nemcsak a hiszton gének számszerű csökkenése vezet a heterokromatin inaktív állapotának destabilizálódásához. PEV-szuppresszor fenotípusuk alapján a hisztonok kovalens módosításában szerepet játszó több más *Su(var)*-típusú mutációt is azonosítottak. Ezek közül néhánynak közvetlen szerepe van kovalens hiszton módosítások létrehozásában, mások pedig legalábbis képesek megváltoztatni bizonyos kovalensen módosított hisztonok mennyiségi arányait.

4.11. AZ $E(z)^{Trm}$ ÉRZÉKENY A HISZTON ACETILÁCIÓS-SZINT VÁLTOZÁSAIRA

Reuter és munkatársai azonosították a *Su(var)2-1* gént (Reuter és mtsai, 1982). A gén ismert alléljai homozigóta állapotban a hiszton H3 és hiszton H4 fehérjék hiper-acetilációját okozzák (Dorn és mtsai, 1986). Ugyanakkor ezeknek az alléloknak nincs homeotikus fenotípusuk, és az eddig vizsgált esetekben a *Pc-G* mutánsok fenotípusát sem befolyásolják. Mivel korábbi eredményeink alapján úgy tűnt, hogy az $E(z)^{Trm}$ által kiváltott ektopikus inaktiváció a normális *Pc*-függő represszióhoz képest érzékenyebb a kromatinszerkezeti változásokra, megvizsgáltuk a *Su(var)2-1* alléloknak a *Trm* heterozigóta fenotípusára gyakorolt hatását.

A *Su(var)2-1* allélok szignifikánsan szuppresszálják a heterozigóta *Trm* fenotípust. A null allélok (*Su(var)2-1¹*, *Su(var)2-1⁵*) közepesen erős szuppresszorok minden vizsgált testtájon. A hipomorf homozigóta életképes allélok (*Su(var)2-1²*, *Su(var)2-1³*, *Su(var)2-1⁴*) is

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELESLÉSEK

általában gyenge szuppresszor hatást mutatnak. A gyengén életképes $Su(var)2-I^3/Su(var)2-I^3$ kombináció pedig teljes mértékben eltünteti a *Trm* funkciónyeréssel fenotípusát, a kikelő legyek *Trm* heterozigóta háttéren vad fenotípusúak.

Keresztezett allélok (A keresztezések irányát jeleztük)	T1→T2		T3→T2		A5→A4
	ap1	stp1	ap3	stp3	
<i>Oregon-R</i> ♂	31.5% n=818	0% n=212	77.3% n=616	2.8% n=212	41.8% n=160
<i>Su(var)2-I¹</i> ♂	21%** n=240	0% n=240	37%** n=240	0% n=240	24%** n=61
<i>Su(var)2-I¹</i> ♀	13.7%** n=120	0% n=120	49%** n=215	0% n=215	25%** n=83
<i>Su(var)2-I²</i> ♂	32% n=38	0% n=38	41%** n=151	0% n=151	50% n=19
<i>Su(var)2-I²</i> ♀	22% n=97	0% n=97	32%** n=325	0% n=325	26% n=46
<i>Su(var)2-I³</i> ♂	30% n=55	0% n=55	39%** n=240	0% n=240	66% n=19
<i>Su(var)2-I³</i> ♀	20%** n=78	0% n=78	69% n=78	0% n=78	95%** n=36
<i>Su(var)2-I⁴</i> ♂	48%** n=26	0% n=26	62% n=125	0% n=125	68% n=11
<i>Su(var)2-I⁴</i> ♀	38%* n=71	0% n=71	69% n=71	0% n=71	41% n=28
<i>Su(var)2-I⁵</i> ♂	11%** n=59	0% n=59	38.5%** n=135	0% n=135	27%* n=35
<i>dMi¹</i> ♀	5.8%** n=102	0% n=102	20.5%** n=102	0% n=102	22%* n=40
<i>dMi¹</i> ♂	4.3%** n=206	0% n=206	36.3%** n=207	0% n=207	33% n=40
<i>dMi¹</i> ♀	5.8%** n=102	0% n=102	20.5%** n=102	0% n=102	33%* n=40
<i>dMi²</i> ♂	11%** n=77	0% n=77	25%** n=79	0% n=79	65% n=36
<i>dMi⁴</i> ♀	15%** n=102	0% n=102	34%** n=102	0% n=102	85%* n=40
<i>dMi⁴</i> ♂	23%** n=126	0% n=126	43%** n=127	0% n=127	42% n=50

4.13. táblázat Az $E(z)^{Trm}$ interakciói a hiszton-acetilációt befolyásoló gének mutáns alléljeivel. Az allélokat a megadott irányból kereszteztük ellentés nemű $E(z)^{Trm} Fab-7^1/Bal$ heterozigótákkal. A használt rövidítések, szimbólumok magyarázatát ld. a 4.2. táblázatban.

Azon feltételezésünk alátámasztására, hogy a heterozigóta $E(z)^{Trm}$ mutánsokban bekövetkező ektopikus inaktiváció valóban érzékeny a hisztonok acetilációs szintjében bekövetkező változásokra, kipróbáltuk egy másik lehetséges partner, a *Drosophila melanogaster* Mi-2 homológját kódoló *dMi-2* gén (Kehle és mtsai, 1998) több független allélját is. Az Mi-2 fehérjét több fajban, így *Drosophilában* is azonosították hiszton-deacetiláz komplexek alkotójaként (Wade és mtsai, 1998; Brehm és mtsai, 2000). Azt az eredményt kaptuk, hogy az általunk vizsgált mindhárom *dMi-2* allél a *Su(var)2-1* allélokhoz hasonlóan szignifikáns Trm szuppresszor (4.13. táblázat).

A hiszton-deacetiláz enzimek szerepét az $E(z)^{Trm}$ által kiváltott Polycomb-függő inaktivációban közvetlenül is megpróbáltuk kimutatni. Erre a célra legegyszerűbb megoldásnak a hiszton-deacetiláz enzimeket gátló Na-butirát etetése tűnt (ld.: Anyagok és módszerek).

Keresztezett allél	T1 → T2		T3→T2		A5→A4
	ap1	stp1	ap3	stp3	
$E(z)^{Trm}/Oregon-R$	19%		92%		42%
nipagin	n=1184		n=1134		n=243
$E(z)^{Trm}/Oregon-R$	11%**		53%**		12%**
hat napos etetés	n=454		n=454		n=86
0.01M Na-butirát					
$E(z)^{Trm}/Oregon-R$	11%**		51%**		8%**
hat napos etetés	n=384		n=388		n=99
0.05M Na-butirát					

4.14. táblázat Különböző koncentrációjú Na-butirát etetésének hatása az $E(z)^{Trm}$ fenotípusra $E(z)^{Trm}/TM3$ szűzeket és *Oregon-R* hímeket kereszteztünk kontroll (nipagin tartalmú) táptalajon, illetve 0.01M valamint 0.05M koncentrációban Na-butirátot tartalmazó táptalajon.. Az állatokat 6 napig a butirát tartalmú táptalajon tartottuk, majd normális táptalajra ráztuk őket, ahol további három napig petézték, majd a kikelő állatok fenotípusát analizáltuk. A használt rövidítések, szimbólumok magyarázatát ld. a 4.2. táblázatban.

A hisztonok acetilációs szintjének megváltozása nagyon sok gén expressziós szintjének megváltozásához vezet. Mivel számunkra az volt fontos, hogy az $E(z)^{Trm}$ mutációt hordozó embriókban már a fejlődés korai szakaszában (a Polycomb-függő inaktiváció felépülésekor) gátlódjon a hiszton-deacetiláció, ezért a vizsgált keresztezésben az anyákat

etettük Na-butiráttal, majd a normális táptalajon felnevelt utódok fenotípusát vizsgáltuk. A kísérletekben igen alacsony koncentrációban alkalmaztuk a Na-butirátot a másodlagos hatások minimálisra csökkentése céljából. Eredményeink szerint a butirát-szenzitív mutánsok azonosításához használt koncentráció egyhuszada is elegendő volt ahhoz, hogy szignifikánsan szuppressálja a vizsgált homeotikus fenotípusok mindegyikét (4.14. táblázat).

Vizsgált genotípus	T1→T2		T3→T2		A5→A4
	ap1	stp3	ap3	stp3	
<i>Oregon-R/E(z)^{Trm}</i>	31.5%	0%	77.3%	2.8%	41.8%
	n=818	n=212	n=616	n=212	n=160
<i>E(z)^{Trm}/E(z)⁶⁰</i>	50%	0%	75%	24%	100%
	n=152	n=152	n=152	n=152	n=22
<i>Su(var)2-I³/+;</i> <i>E(z)^{Trm}/E(z)⁶⁰</i>	10%**	0%	9%**	0%	14%**
	n=214	n=214	n=214	n=214	n=55
<i>SM6/+;</i> <i>E(z)^{Trm}/E(z)⁶⁰</i>	53%	0%	60%**	0%	78%
	n=94	n=94	n=94	n=94	n=16

4.15. táblázat. *Su(var)2-I* allél hatása az *E(z)^{Trm}/E(z)⁶⁰* traszheterozigóta kombináció fenotípusára

A butirát szenzitív PEV-szuppresszor *Su(var)2-I* hatását a vad *E(z)* SET-domén hiányában oly módon teszteltük, hogy a *Su(var)2-I³/SM6*; *E(z)^{Trm}/TM3* genotípusú szűzeket *E(z)⁶⁰/TM6* hímekkel kereszteztük, majd a kikelő *E(z)^{Trm}/E(z)⁶⁰* utódok fenotípusát vizsgáltuk a mutáns *Su(var)2-I³* allél jelenlétében és hiányában. Mivel anyai hatású szuppresszió is feltételezhető, kontrollként elvégeztük a *E(z)^{Trm}/TM3* szűzek *E(z)⁶⁰/TM6* hímekkel való keresztezését is. A használt rövidítések, szimbólumok magyarázatát ld. az 4.2. táblázatban. Kontrollként az *Oregon-R* hímekkel végzett keresztezésből származó *Oregon-R/E(z)^{Trm}* utódokat tüntettük fel.

Az *E(z)^{Trm}* heterozigóták erős, de nem teljes homeotikus transzformációi egyszerű lehetőséget biztosítanak számunkra, hogy ebben az érzékeny rendszerben az *E(z)* interakciós partnereit keressük. Mivel az *E(z)^{TRM}* fehérje csak egyetlen aminosavban különbözik a vad *E(z)* fehérjétől, ezért azt vártuk, hogy a legtöbb mutáció hasonló hatással legyen a heterozigóta, mint a homozigóta vagy hemizigóta *E(z)^{Trm}*-re. Azok a fehérjék azonban, amelyek a megfelelő kromatindoménokat a vad *E(z)* fehérje számára felismerhető módon megjelölik, de a mutáns fehérje nem képes az adott jel felismerésére, csak az *E(z)^{Trm}* heterozigótákban képesek a fenotípus módosítására, a csak mutáns fehérjét tartalmazó komplexek az adott jel jelenlétére vagy hiányára nézve érzéketlenek.

Miután a hisztonok acetilációjá egyike az aktív kromatinszerkezetet azonosító molekuláris jeleknek, és a megnövekedett acetilációs szint az $E(z)^{Trm}$ -függő ektopikus inaktiváció gyengüléséhez vezetett, felmerült a lehetőség, hogy a hisztonok acetilációjá képezi az $E(z)^{TRM}$ által eltévesztett molekuláris jelet, azaz a mutáns $E(z)^{TRM}$ fehérje a vad $E(z)$ fehérje jelenléte nélkül nem képes reagálni a hiszton-acetilációs szignál megváltozására. A kérdés megválaszolására kiboncoltunk néhány $Su(var)2-I^3/+$; $E(z)^{Trm}/E(z)^{Trm}$, és $Su(var)2-I^3/+$; $E(z)^{Trm}/E(z)^{IR3}$ pharat adult állatot a bábbőrből. Megfigyeléseink szerint ezeknek az állatoknak a fenotípusa kevésbé súlyos, mint azt $E(z)^{Trm}/E(z)^{Trm}$, és az $E(z)^{Trm}/E(z)^{IR3}$ állapotban tapasztaltuk. A szuppresszió számszerű jellemzése érdekében, megvizsgáltuk a $Su(var)2-I^3$ hatását a gyenge életképességű $E(z)^{Trm}/E(z)^{60}$ transzheterozigóta állatok fenotípusára (4.15. táblázat)

Kísérleteink alapján megállapítható, hogy a hiszton-acetilációs szint emelése három független módszerrel egyaránt az $E(z)^{Trm}$ fenotípus szuppressziójához vezetett. A hisztonok hiper-acetilációjá által létrehozott aktivációs jelet azonban a mutáns TRM fehérje a vadhoz hasonlóan képes felismerni, mert a csak mutáns $E(z)^{TRM}$ fehérjét tartalmazó állatok fenotípusa is függ a hisztonok acetilációs szintjétől. Mivel a mutáns fenotípus az $E(z)^{Trm}/E(z)^{60}$ kombinációban is visszaszorul, feltételezhető, hogy a hisztonok acetilációs szintjét csökkentő fehérjét tartalmazó komplexek is felismerik. Ezen az alapon valószínűsíthető, hogy az aktív kromatindoméneken nem az acetilációs jel az, amelyet a mutáns $E(z)^{TRM}$ fehérje eltéveszt.

4.12. AZ $E(z)^{TRM}$ HOMEOTIKUS FENOTÍPUSA ÉRZÉKENY A PP1 NUKLEÁRIS FOSZFATÁZ DÓZISÁRA

Az $E(z)^{TRM}$ fehérjében az $E(z)$ -típusú SET-doménekre jellemző konzervált arginin aminosav egy hasonló kémiai tulajdonságokkal rendelkező, de anionos ligandokkal gyengébb kölcsönhatásra képes lizinre cserélődni. Ismert, hogy az arginin a lizinnél nagyobb affinitással képes anionos ligandokhoz kötődni (Fromm és mtsai, 1995). Több esetben bizonyították, hogy az arginil-csoportok foszforil-csoportokkal kapcsolódnak különböző

fehérje interakciós folyamatokban (Tian és Martin, 1996). Ez felvetette azt az egyszerű hipotézist, hogy az aktív kromatindoménokban található jel foszforilációs természetű. Ez esetben a vad E(Z) fehérje inaktiváló funkcióját gátolhatja erős kötődése a foszforilált csoporthoz, míg a lizint tartalmazó E(Z)^{TRM} fehérje nem gátolható ilyen módon, ezért válik képessé aktívként megjelölt kromatindoménok inaktivációjára is.

Keresztezett allél	T1 → T2		T3 → T2		A5 → A4
A keresztezés irányát jeleztük	ap1	stp1	ap3	stp3	
<i>Oregon-R</i> ♂	31.5% n=818	0% n=212	77.3% n=616	2.8% n=212	41.8% n=160
<i>Oregon-R</i> ♀	16.7% n=257	0% n=448	73.6% n=270	1.7% n=448	41% n=546
<i>Pp1-87B^{87Bg-3}</i> ♂ amorph 5' deléción	24.8%* n=250	0% n=250	25.6%** n=250	0% n=250	6%** n=54
<i>Pp1-87B^{87Bg-3}</i> ♀ amorph 5' deléción	16.8%** n=480	0% n=480	19.2%** n=702	0% n=702	11%** n=122
<i>Pp1-87B^{87Bg-6}</i> ♂ amorph 5' deléción	8.1%** n=374	0% n=374	34.2%** n=294	0% n=294	39% n=51
<i>Pp1-87B^{87Bg-6}</i> ♀ amorph 5' deléción	7%** n=193	0% n=193	49%** n=193	0% n=193	31% n=96
<i>Df(3R)E079</i> ♂ deficiencia 86F1,2-87B9	14.7%** n=470	0% n=470	39.6%** n=480	0% n=480	30%** n=210
<i>P15</i> ♀ <i>Pp1</i> menekítő konstrukt	66.7%** n=168	5.9% n=168	83.9%* n=168	4.8%* n=168	100%** n=26
<i>7/2/1</i> ♀ <i>Pp1</i> menekítő konstrukt	31.1% n=228	0% n=228	85.2%* n=228	20%** n=228	94%** n=54

4.16.. táblázat. *Pp1* allélok hatása az E(z)^{TRM} fenotípusra

Az allélokat a megadott irányból kereszteztük ellentés nemű E(z)^{TRM} *Fab-7¹/Bal* heterozigótákkal. A használt rövidítések, szimbólumok magyarázatát ld. a 4.2. táblázatban.

Úgy gondoltuk, hogy a feltételezett foszforilált fehérje-partner foszforiláltsági szintje esetleg megváltozhat a *Su(var)3-6* gén által kódolt (Axton és mtsai, 1990), legfontosabb magi foszfatáz, a PP1-87B fehérje dózisának függvényében. A *Su(var)3-6* felelős a teljes PP1 aktivitás megközelítőleg 80%-áért *Drosophilában*. Funkcióvesztéssel *Su(var)3-6* mutációk dominánsan szuppresszálják a Pozíció Effektus Variegációt (Reuter és mtsai, 1987; Baksa és

mtsa, 1993), jelezve, hogy a Pp1-87B-főggő foszforiláció kromatinszerkezeti változásokhoz vezethet. A *Su(var)3-6* mutánsoknak nincs saját homeotikus fenotípusuk, alléljait nem izolálták Polycomb-enhanszerként, és saját kísérleteink szerint sem módosították a *Pcl^{R5}* és *Pc³* allélok homeotikus fenotípusát. Ennek ellenére úgy gondoltuk, hogy lehetséges, hogy az aktív és inaktív *cisz*-regulátorok megkülönböztetésében egy Pp1-főggő foszforilációs jel is szerepet játszhat, amely hatással lehet az E(z) fehérje repressziós működésére.

Azt az eredményt kaptuk, hogy a *Su(var)3-6* allélok képesek *E(z)^{Trm}/+* háttérben a funkciónyeréses *trx*-fenotípus szignifikáns szuppressziójára. A *Su(var)3-6* gén kópia számának emelése ellentétes módon hatott, a homeotikus fenotípus minden komponensét szignifikánsan megerősítette (4.16. táblázat). Nem zárható ki, hogy a *Su(var)3-6* gén funkcióvesztése nyomán számottevően lecsökkent defoszforilációs kapacitás hatása közvetett, de az E(z)-főggő epigenetikus represszióban valamilyen protein foszforilációs mechanizmus mindenképpen szerepet játszik. A vad E(z) fehérje reagál a foszforilációs szint megváltozására, a SET-doménen keresztül, míg *E(z)^{TRM}* fehérje működésére ez a foszforilációs változás nincs hatással.

Mivel mindkét vizsgált gén a harmadik kromoszómán helyezkedik el, ahhoz, hogy megvizsgálhassuk, hogyan hat a *Su(var)3-6* gén dózisának csökkentése a homozigóta *E(z)^{Trm}* állatok fenotípusára, a *Su(var)3-6* molekuláris méretű deléciót hordozó funkcióvesztéses allélját (*Pp1-87B^{87Bg-3}*) rárekombináltuk az *E(z)^{Trm}* kromoszómára (ld. Anyagok és módszerek). Az *E(z)^{Trm}Pp1-87B^{87Bg-3}* rekombináns *E(z)^{Trm}*-mel és a gént átfedő *E(z)^{IR3}* deficienciával keresztezve azt találtuk, hogy a kiboncolt *E(z)^{Trm}* homo-, és hemizigóta állatok fenotípusát már nem befolyásolja szignifikánsan a *Su(var)3-6* gén dózisa. Tehát a kizárólag a pontmutáns *E(z)^{TRM}* fehérjét hordozó állatokban az aktív domének foszforilációs szintjében bekövetkezett változások észrevétlenek maradnak. Vagyis a mutáns fehérje képtelen reagálni a heterozigóta *Pp1* mutáns háttérben bekövetkező foszforilációs-szint változásra.

4.13. AZ $E(z)^{Trm}$ HOMEOTIKUS FENOTÍPUSA ÉRZÉKENY A HISZTONOK FOSZFORILÁLÁSÁRA IS KÉPES KINÁZOK DÓZISÁRA

Annak a hipotézisünknek az alátámasztására, hogy az általunk keresett, az $E(z)$ -függő epigenetikus represszió kialakulását befolyásoló, a kromatinon elhelyezkedő jel foszforilációs természetű lehet, megpróbáltunk további bizonyítékokat keresni. Olyan kinázok után kutattunk, amelyeknek szerepe ismert a génszabályozásban, vagy a kromatin kondenzációban, és az általunk vizsgált fenotípust is befolyásolják. Nem sikerült interakciót kimutatnunk a *fu*, a *polo* és az *fs(1)h* gének funkcióvesztéses alléljaival, mely gének valamennyien nukleáris lokalizációjú kinázokat kódolnak.

Két olyan kinázt sikerült viszont találnunk, amelyeknek alléljai szignifikáns enhanszer hatással voltak az $E(z)^{Trm}$ fenotípusra. Az *aurora* kináz null alléljai heterozigóta formában erősítették a *Trm* fenotípust (4.17. táblázat). A használt *JIL*-kináz mutáció (*JIL*^{EP3657}) heterozigóta formában sem hím oldalról, sem nőstény oldalról keresztezve nem volt enhanszer, sőt a harmadik lábon és a tergiten egyértelmű szuppresszor hatást mutatott.

A hipomorf *JIL* allélt ([EP3657](#)) rárekombinálva az $E(z)^{Trm}$ kromoszómára a kikelő *cisz*-heterozigóták szignifikánsan erősebb *Trm* fenotípust mutattak, különösen az első lábon megjelenő apikális szőrök száma emelkedett meg, ami hasonló volt az extra *Ppl*^{87D} kópiák bevezetése nyomán létrejött transzformációkhoz (4.17. táblázat). Az általunk használt, egyébként homozigóta életképes *JIL* allél az $E(z)^{Trm}$ *JIL*^{EP6757} kromoszómával szemben nem kelt ki. Tehát a kináz mutáns hatása a fenotípusra csak akkor érvényesült, ha mindkét mutáns allél maternálisan kódolt formában volt jelen, és a mutációk hatása érvényesülhetett a fejlődő petében. Ez esetben azonban a hatás igen erős volt, és a *JIL* homozigótával szintetikus letalitást eredményezett. Ezt az eredményt legegyszerűbben úgy magyarázhatjuk, hogy a hipomorf *JIL* kináz allél jelenlétében lecsökkenő foszforilációnak már az egyedfejlődés legkorábbi szakaszában, valószínűleg a *bithorax*-komplex aktivitásának a kialakulása során érvényesülnie kell ahhoz, hogy az $E(z)^{Trm}$ ektopikus inaktivációja érzékelhetően

megezősödjön. Az JIL-kináz hatása valószínűleg a hiszton-acetilázokhoz hasonlóan igen sok célgénen érvényesül, melyek némelyike másodlagos hatással lehet a homeotikus regulációra, ezért látjuk, hogy az egyedfejlődés késői szakaszában érvényesülő *JIL* funkcióvesztés hatása megfordul.

Keresztezett allél	T1 → T2		T3→T2		A5→A4
A keresztezés irányát jeleztük	ap1	stp1	ap3	stp3	
<i>aur</i> ^{87Ac-4} ♀	78.5% ^{**}	0%	80.5%	19.3% ^{**}	80% ^{**}
	n=224	n=224	n=224	n=218	n=98
<i>aur</i> ^{87Ac-3} ♀	32.3%	0%	82.2% [*]	2.1% [*]	74% ^{**}
	n=760	n=760	n=760	n=760	n=133
<i>JIL</i> ^{EP3657} ♂	29%	0%	28%	0%	2%
	n=270	n=270	n=307	n=307	n=143
<i>JIL</i> ^{EP3657} ♀	18%	0%	23%	0%	5%
	n=623	n=623	n=615	n=615	n=300
<i>JIL</i> ^{EP3657} (hom. ♀)	56%	0%	36%	0%	12%
	n=99	n=99	n=98	n=98	n=26
<i>JIL</i> ^{EP3657} <i>E(z)</i> ^{T^{rm}} (rek. ♀)	82%	0%	62%	0%	17%
	n=69	n=69	n=69	n=69	n=26

4.17. táblázat. Hiszton-kináz gének hatása az *E(z)*^{T^{rm}} heterozigóta fenotípusára

Az allélokot a megadott irányból kereszteztük ellentés nemű *E(z)*^{T^{rm}}*Fab-7*¹/*Bal* heterozigótákkal. A használt rövidítések, szimbólumok magyarázatát ld. a 4.2. táblázatban.

Ismert, hogy az AURORA-kináz homológoknak szerepe van a sejciklusban, konzervált szerepük a H3 hiszton foszforilálása az S10 és S28 pozícióban (Hsu és mtsai, 2000; Giet és Glover, 2001; Adams és mtsai, 2001; Scrittore és mtsai, 2001; Sugiyama és mtsai, 2002; Goto és mtsai, 2002). Az aurora-kináznak szerepe van a mitotikus kromoszóma kondenzáció kialakításában, és bebizonyosodott, hogy az interfázisban direkt PP1-függő gátlás alatt áll (Murnion és mtsai, 2001).

A *Drosophila* JIL kináznak szintén szerepe van a H3 hiszton foszforilálásban az S10 pozícióban, de ebben az esetben nem sejciklus specifikus szerepről van szó. A JIL kináz az interfázisban interband régiókkal asszociálódik, és szerepe van a hím X-kromoszómák dóziskompensációjában (Jin és mtsai, 1999; 2000; Wang és mtsai, 2001). A JIL kináz

biokémiaiilag bizonyított szerepe tehát egyszerre áll közvetlen kapcsolatban a kromatinfehérjék (hisztionok) specifikus foszforilációjával és a transzkripció szintű génaktiváció indukálásával. A gént azonban nem sikerült eddig közvetlen kapcsolatba hozni a homeotikus génszabályozással, illetve a POLYCOMB-TRITHORAX rendszerrel. Laborunkban sikerült fenntartanunk a *JIL*^{EP3657} allélt homozigóta törzsben is. Saját megfigyeléseink szerint a homozigóta anyától származó homozigóta *JIL*^{EP3657} mutánsok saját gyenge trx-szerű fenotípust mutatnak, ritkán az első lábon apikális szőrök jelennek meg, ezenkívül a hatodik sterniten nagy gyakorisággal találunk az ötödik sternitre jellemző szőröket. Mindezek alapján valószínű, hogy a *JIL* funkcióvesztés a mutáns E(Z)^{TRM} jelenlététől függetlenül a normális inaktivációra is hatást gyakorol.

4.14. A MESTERSÉGESEN TERMELT E(Z) FEHÉRJÉK

A genetikai kísérleteink alapján kialakított hipotézisünk bizonyítása érdekében szükségessé vált a vad és a mutáns E(Z)^{TRM} fehérjék mesterséges előállítása, tisztítása és biokémiai módszerekkel történő vizsgálata. A biokémiai kísérletek során több kérdésre kerestünk választ. Tudni szeretnénk volna, hogy az E(Z) fehérje képes-e egyáltalán specifikusan kötődni az epigenetikus szabályozásban szerepet játszó hisztion N-terminális szakaszokhoz *in vitro*, vagyis potenciálisan képes-e az epigenetikus szabályozás egyik alapját képező hisztionkódot leolvasni. Kíváncsiak voltunk, hogy különböző kovalensen módosított N-terminális peptidek esetében különbözik-e az E(Z) fehérje kötődésének az erőssége. Azt a kérdést is megpróbáltuk megválaszolni, hogy van-e a vad, illetve a mutáns fehérjének SU(VAR)3-9-hez hasonló (Rea és mtsai, 2000) specifikus hisztion-metil-transzferáz aktivitása, illetve találunk-e valamilyen különbséget a vad és a mutáns fehérje között a katalitikus aktivitás meglétében, vagy specifitásában.

Két másik SET-domént tartalmazó fehérje humán homológjaival végzett kísérletekre alapozva, TRX és az ASH1 esetében bizonyították, hogy azok mind *in vivo*, mind *in vitro*

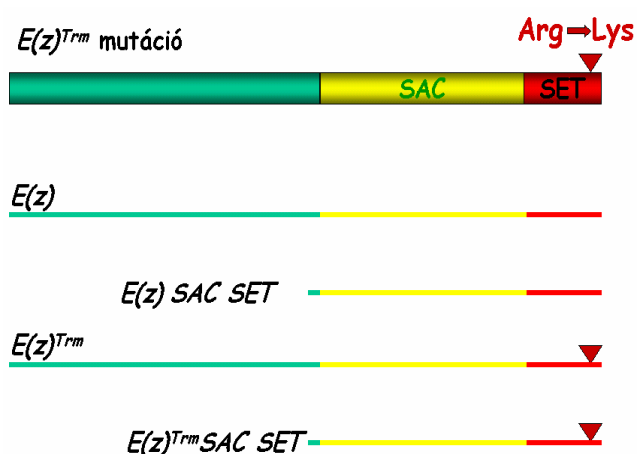
képesek kölcsönhatásba lépni önmagukkal és egymással a SET-doménjükön keresztül (Rozovskaia és mtsai, 2000), de ugyanezek a szerzők kijelentették, hogy publikálatlan megfigyeléseik szerint az emlős E(Z) homológ fehérjék nem képesek hasonló interakcióra.

Az antimorf pontmutáns $E(z)^{son}$ allélokkal végzett saját interakciós kísérleteink eredményei viszont arra utaltak, hogy Drosophilában lehetséges kölcsönhatás az E(Z) SET-domének között, ezért meg kívántuk vizsgálni azt is, hogy a mesterségesen termelt E(Z) fehérjék képesek-e egymással és más SET-domén tartalmú fehérjékkel kölcsönhatásba lépni, illetve találunk-e különbséget a vad és mutáns $E(z)^{TRM}$ fehérje kölcsönhatásának erősségében.

4.15. KÖTÉSI KÍSÉRLETEK MÓDOSÍTOTT HISZTON FARKI PEPTIDEKKEL

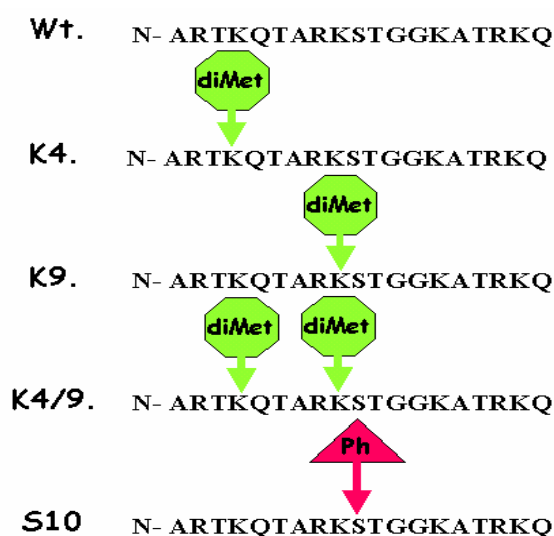
A fenti kérdések megválaszolása érdekében először *in vitro* transzlációval termelt, radioaktívan jelzett vad és mutáns $E(z)^{TRM}$ fehérjék (4.17. ábra) kötődését vizsgáltuk különböző kovalens módosításokat tartalmazó N-terminális hiszton H3 peptideken.

A kötési kísérletek során a különböző kovalens módosításokat hordozó 19 aminosav hosszúságú N-terminális hiszton peptideket, Sulfolink gyöngyökhöz kötöttük (ld. Anyagok és módszerek). A kísérletekhez módosítatlan, L4-dimetil, L9 dimetil, L4-L9-dimetil, és S10-en foszforilált peptideket használtunk fel (4.18. ábra).



4.17. ábra A kötési reakciókhoz felhasznált mesterségesen termelt E(Z) fehérjék
Az $E(z)^{TRM}$ -ben bekövetkezett mutációt piros nyíllal, a konzervált SAC-domén sárga színnel, a SET-domént piros színnel jelöltük.

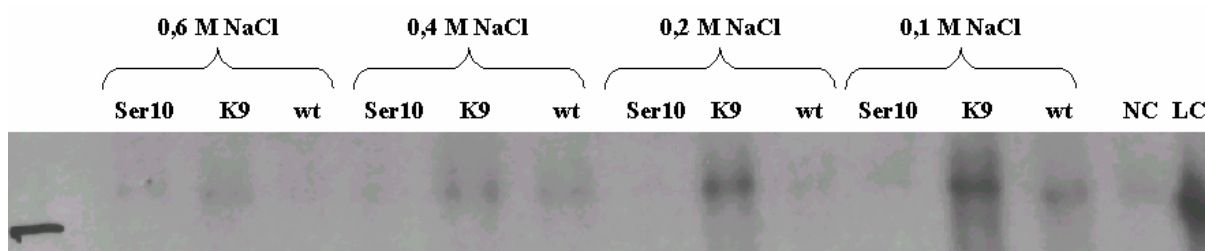
A kötési kísérletekben a kötött peptidek mellett kontrollként kötött peptidet nem tartalmazó, ciszteinnel inaktivált Sulfolink gyöngyöket használtunk. Összehasonlítottuk a teljes hosszúságú, illetve a csonkolt, csak a C-terminális 270 aminosavat tartalmazó (preSET-, és SET-domén) vad és az E(Z)^{TRM} mutáns fehérje-módosulatok kötési képességét különböző kovalensen módosított hiszton peptideken különböző stringenciájú mosások után (4.17 és 4.18. ábra).



4.18. ábra A kötési reakciókhoz felhasznált N-terminális hiszton H3 peptidek szekvenciája

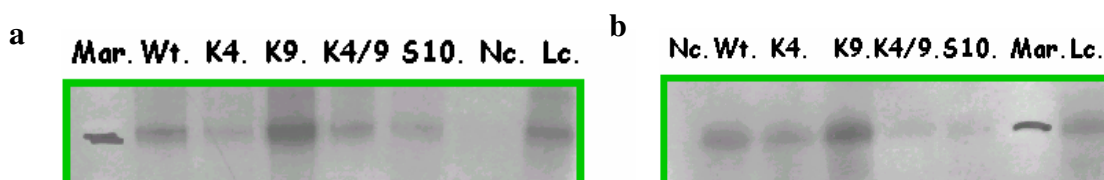
A dimet jelölés a nyíl által jelzett pozíciójú aminosav dimetilált állapotát jelzi, míg a Ph jelölés az adott aminosav foszforilációjára utal.

Megállapítható, hogy a teljes vad E(Z) fehérje specifikusan kötődik az N-terminális hiszton H3 peptidekhez. A kötés erőssége különbözik különböző kovalensen módosított peptidek esetében. Legerősebben a 9. lizin aminosavon dimetilált (K9dim), leggyengébben a 10. szerin aminosavon foszforilált (S10ph) peptid kötődik a teljes vad E(Z) fehérjéhez. A kötés erőssége az emelkedő sókoncentrációval párhuzamosan csökken, de még 0.6 M-os sókoncentrációnál is kimutatható.



4.20. ábra A teljes vad E(Z) fehérje és a hiszton H3 peptidok kötési képességének összehasonlítása, különböző sókoncentrációkon

A kötési pufferben alkalmazott NaCl koncentrációt az ábra felett, a peptidok kovalens módosításait az autoradiogram felett jeleztük. A teljes hosszúságú vad és a teljes E(Z)^{TRM} mutáns fehérje összehasonlítása azt mutatja, hogy a mutáns fehérje is képes, méghozzá a vad E(Z) fehérjéhez hasonló erősséggel kötődni a felhasznált H3 fark peptidokhoz. A tüzetesebb összehasonlítás szerint teljes E(Z)^{TRM} mutáns fehérjére is jellemző, hogy az L9dim peptidhez erősebben, a S10pho peptidhez gyengébben kötődik, mint a módosítatlan származékhoz, de a vad E(Z) fehérjéhez képest a mutáns teljes E(Z)^{TRM} kötése a foszforilált peptidhez jobban gyengül a sókoncentráció emelésével.



4.19. ábra A teljes hosszúságú vad E(Z) fehérje és az E(Z)^{TRM} módosított hiszton H3 peptid kötési képességének összehasonlítása

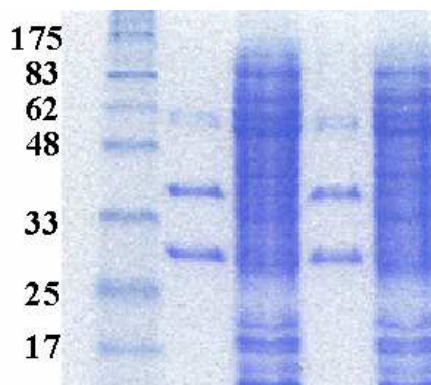
a.) A teljes hosszúságú vad E(Z) fehérje hiszton H3 peptid kötési képessége b.) A teljes hosszúságú E(Z)^{TRM} fehérje hiszton H3 peptid kötési képessége Mar.: mólsúlymarker, 80kDa, Nc.: negatív kontroll, kötött peptidet nem tartalmazó inaktívált gyöngyökről lemosott anyag, Lc.: loading kontroll, a kötéshez felvitt teljes fehérjemennyiség 10%-a. A kísérletben 0.2 M NaCl koncentrációt használtunk.

A csonkolt E(Z) fehérjék vizsgálata megerősítette, hogy az E(Z) fehérje a TRX fehérjéhez hasonló módon, a C-terminálisán elhelyezkedő SET-domént tartalmazó részén keresztül kötődik a H3 farki peptidokhoz, hiszen ezekben a kísérletekben is specifikus kötődést sikerült megállapítanunk. A kísérlet azonban bizonyos szempontból meglepő eredményhez vezetett. Az N-terminálisan csonkolt fehérjék sokkal erősebb és sórezisztensebb kötés kialakítására voltak képesek.

Megállapítható, hogy a teljes hosszúságú E(Z) fehérjének a csonkolt változatokból hiányzó N-terminális része gátolja a hiszton H3 peptidok kötését, ennek eltávolításával a kötés erőssége számottevően megnő, de a vad és a mutáns fehérjében továbbra is hasonló marad.

4.16. HISZTON-METIL TRANSZFERÁZ AKTIVITÁSMÉRÉSEN ALAPULÓ KÍSÉRLETEK

A hiszton-metil transzferáz aktivitás méréséhez baculovírus alapú klónozási rendszert használtunk fel Sf9 sejtekben. Az Anyagok és módszerek fejezetben leírt módon a vad és a TRM fehérje C-terminális 270 aminosavat kódoló részét tartalmazó DNS szakaszt PPB22 vektorba klónoztuk, és N-terminális FLAG-jelölt fehérjéket állítottunk elő.



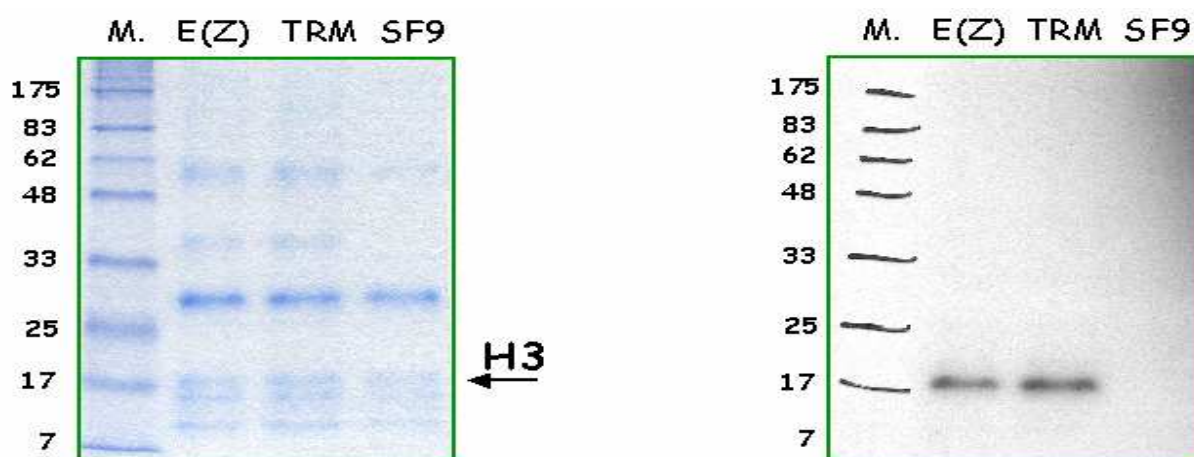
4.21. ábra Az Sf9 sejtben termelt N- terminálisan csonkolt, FLAG jelölt vad E(Z)SAC-SET és a mutáns E(Z)^{TRM}SAC-SET fehérjék tisztítása

Bal oldalon a marker fehérjék mólusúlyát tüntettük fel. Az immunoglobulin nehéz és könnyű lánc mellett, amelyek a tisztításhoz használt ellenanyagból származnak, sztöchiometrikus mennyiségű termelt E(Z) fehérje és egy ismeretlen 55KDa molekulasúlyú ismeretlen fehérje jelenik meg.

A termelt fehérjéket monoklonális anti-FLAGM2 ellenanyaggal kapcsolt gyöngyök segítségével tisztítottuk (4.21. ábra). A tisztítás során egy, a vártnak megfelelő méretű fehérjét találtunk. Az általunk termelt fehérje mellett, coomassie festéssel az immunoglobulin fehérjéken kívül egy addicionális, 55 KDa méretű ismeretlen fehérje is kimutatható. Nem tudjuk azonban biztosan megmondani, hogy a tisztítás során mindig megjelenő 55KDa fehérje milyen szerepet játszik. Ismert ugyanis, hogy a Drosophilából tisztított E(Z)-komplex tartalmaz egy 55kDa méretű hiszton kötő fehérjét (CAF1, Ng és mtsai, 2000; Tie és mtsai, 2001).

A tisztított vad E(Z)SAC-SET, és a mutáns E(Z)^{TRM}SAC-SET fehérjét anti-FLAG gyöngyökhöz kötött formában használtuk fel az Anyagok és módszerek fejezetben leírt hiszton-metil-transzferáz aktivitásmérésekhez. Az első kísérletekben az enzimaktivitást tisztított hiszton oktamer szubsztráton, az egyes hiszton fehérjékbe épült a radioaktív S-

adenozil metioninról származó ^3H -jelölt metilcsoport beépülésével arányos radioaktivitás alapján autoradiográfiásan, közvetlenül a gélből mutattuk ki. A hosszú előhívási idő (3 hét) lerövidítése, a vad és mutáns fehérje aktivitásának pontos meghatározása, valamint a speciális peptid-szubsztrátok alkalmazása szükségessé tette, hogy a további kísérletekben folyadékszintilláció segítségével határozzuk meg a beépült radioaktivitás mértékét (ld.: Anyagok és módszerek).

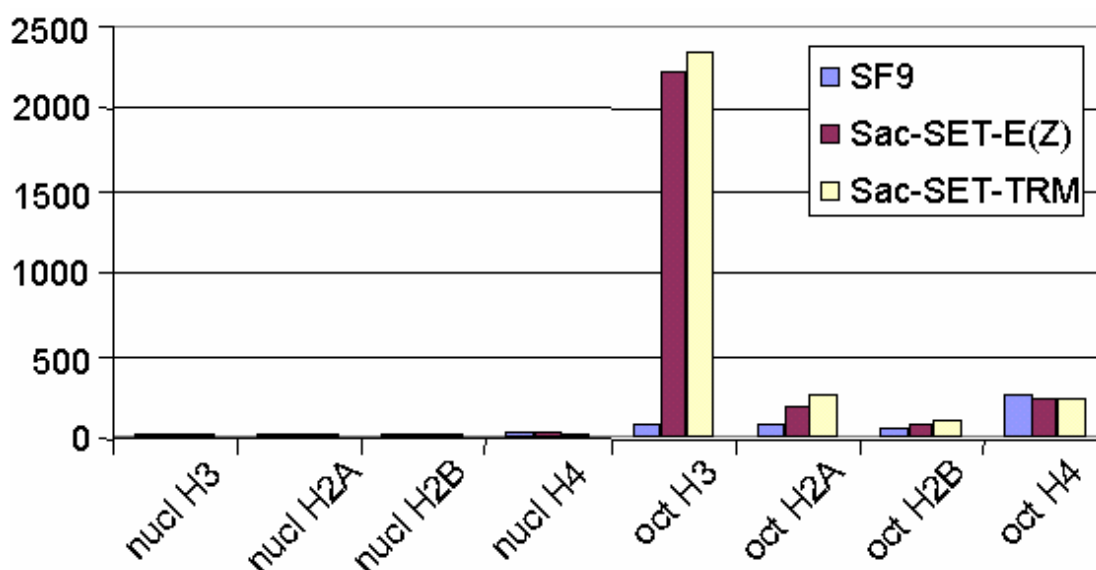


4.22. ábra A csonkolt vad E(Z) és a csonkolt mutáns E(Z)^{TRM} fehérje hiszton-metil-transzferáz aktivitása tisztított hiszton oktamer szubsztráton

Az ábrák bal oldalán a marker fehérjék mólusúlyát tüntettük fel. A metil-transzferáz reakcióban az anti-FLAG gyöngyökhöz kötött E(Z) fehérjét és a hiszton oktamerben található hisztonokat inkubáltuk. Ennek megfelelően az immunoglobulin nehéz és könnyű lánc, sztöchiometrikus mennyiségű termelt E(Z) fehérje és egy ismeretlen 55KDa molekulásúlyú ismeretlen fehérje jelent meg az oktamert alkotó négy különböző hiszton fehérje mellett. A H3 hisztont nyíl jelzi. Kontrollként mesterséges fehérjét nem termelő SF9 sejtvonalat használtunk.

Az első kísérletben sikerült kimutatnunk, hogy az általunk megtermelt mindkét fehérjének (E(Z)SAC-SET, és E(Z)^{TRM}SAC-SET) van hiszton-metil-transzferáz aktivitása. Mindkét fehérje hasonló mértékben képes az oktamer szubsztrátot metilálni, és mindkét esetben a metiláció elsődleges célpontja a hiszton H3, ezen kívül nagyon alacsony szinten a hiszton H4 is metilálódik (4.22. ábra). A fenti kísérlet sokat segített E(Z) fehérjének az epigenetikus represszióban játszott szerepének megértésében. Úgy véltük, hogy a homeotikus géneket érintő repressziós működésnek egyik előfeltétele a biokémiaailag kimutatható hiszton-metil-transzferáz aktivitás. Ennek megfelelően a mutánsban tapasztalt ektopikus helyeken fellépő repressziós működés biokémiai megfelelője egy, abnormális szubsztráton is lezajló

metil-transzfer. A laborunkban végzett, akkoriban zajló kísérletek szerint a szintén hiszton-metil-transzferáz aktivitású, de az epigenetikusan determinált aktív állapot fenntartásában szerepet játszó ASH1 fehérje nemcsak a tisztított oktamer szubsztráton, hanem DNS tartalmú poli-nukleoszóma preparátumon is aktív, sőt nagyobb aktivitást mutatott (Beisel és mtsai, 2002). Mivel ez a szubsztrát a natív kromatinhoz jobban hasonlít, úgy véltük esetleg számunkra is jobb szubsztrátnak bizonyulhat. Kipróbáltuk tehát az általunk termelt fehérjéket is polinukleoszóma szubsztráton (4.23. ábra).



4.23. ábra A csonkolt vad E(Z) és a mutáns E(Z)^{TRM} fehérje hiszton- metil-transzferáz aktivitása tisztított poli-nukleoszóma szubsztráton

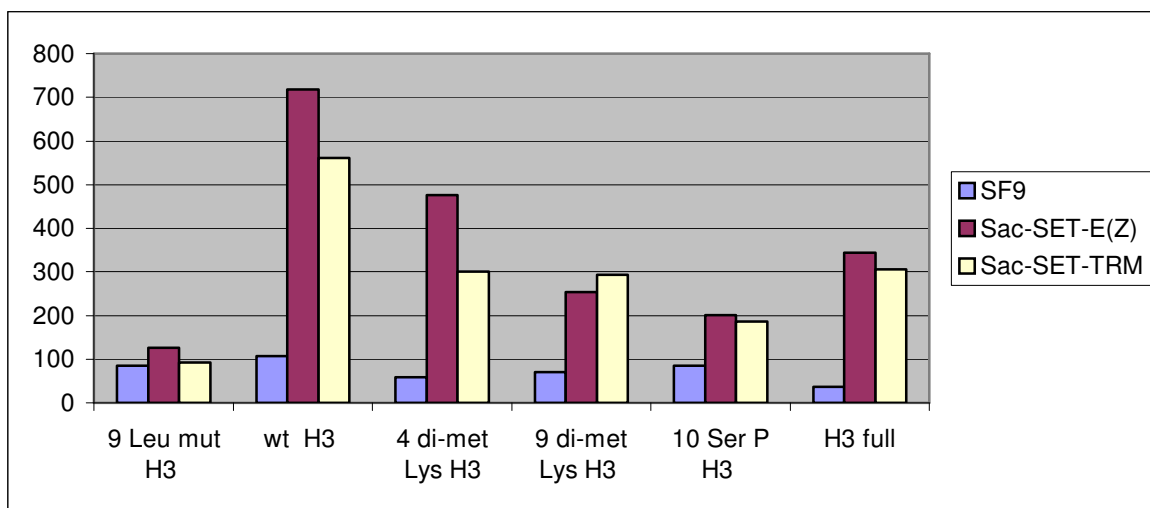
A nukleoszómából származó hisztonokat nucl. az oktamerből származókat oct. rövidítéssel jelöltük.

A táblázatból látható, hogy az általunk termelt csonkolt fehérjék egyike sem képes számottevő mértékben poli-nukleoszóma szubsztrát metilálására. Az aktivitás az oktamer szubsztráton mért érték 1%-a körül mozog, a háttértől való eltérése csekély.

Bizonyítani kívántuk azt az elképzelésünket is, hogy az E(Z) epigenetikus represszor funkciójának alapja a H3 hiszton 9. lizin aminosavának metilációja, és ugyanazon az N-terminális hiszton farkon lévő 10. szerin aminosav foszforilálása képes ennek az aktivitásnak a gátlására. Ezért megvizsgáltuk, milyen mértékben képesek a tisztított vad E(Z)SAC-SET, és a mutáns E(Z)^{TRM}SAC-SET fehérjék a teljes hosszúságú hiszton H3 és a mesterségesen termelt

módosított hiszton H3 peptidek metilálására. Az adott kísérleti rendszerben ennek megfelelően azt vártuk, hogy az S10 pozíció foszforilációja gátolja a vad E(Z)SAC-SET fehérjének az epigenetikus represszor funkcióval összefüggő metil-transzferáz aktivitását, míg a mutáns E(Z)^{TRM}SAC-SET fehérje metil-transzferáz aktivitása kevésbé gátolható.

Elképzeléseinknek megfelelően mindkét termelt fehérje képes volt a tisztított hiszton H3 fehérje metilálására, habár az aktivitás csak töredéke volt az oktamer szubsztráton tapasztaltnak (vö.: 4.23. és 4.24. ábra). A mesterségesen előállított H3 farki peptidek segítségével először behatároltuk a termelt fehérjék által létrehozott metiláció célpontját. A 19 tagszámú normál peptiden kaptunk metilációt, míg a 9. lizin aminosav leucinra cserélése rendszerünkben metilálhatatlan peptidet eredményezett (4.24. ábra).



4.24. ábra A csonkolt vad E(Z) és a mutáns E(Z)^{TRM} fehérje metil-transzferáz aktivitása tisztított H3 fehérjén és különböző kovalensen módosított 19 tagú H3 farki peptideken

A 19 tagszámú peptidek szekvenciája a 3.16. Ábrán található. A 9Leu jelű peptidben a 9. pozícióban a metilálható lizint leucinra cseréltük. H3-mal a teljes hiszton H3 fehérjét jelöltük.

A következő kérdésünk az E(Z) fehérjéknek a hiszton-kód létrehozásában betöltött pontosabb szerepének megértésére irányult. Tudni szeretnénk volna, hogy a metilációs reakcióban keletkező mono-, di-, és trimetil-lizin mindegyikét képesek-e létrehozni a termelt E(Z) fehérjék, hiszen más eredményekből úgy tűnt, hogy ezeknek a metilált lizin származékoknak az epigenetikus kód-értéke nem azonos. Különösen fontos volt annak eldöntése, hogy fehérjeink képesek-e a tri-metilált H3 L9 előállítására. Jelenleg folyó

kísérletek szerint egy másik epigenetikus represszor fehérje, a POLYCOMB ehhez, és csakis ehhez a formához képes *in vitro* kötödni (Beisel és mtsai, személyes közlés). Felmerült tehát az a lehetőség, hogy az E(Z) fehérje által kialakított metilációs jel további epigenetikus represszorok kötődését válthatja ki.. Ennek eldöntése érdekében megnéztük, hogy a termelt fehérjék képesek-e L9 dimetilált H3 farki peptid szubsztrát további metilációjára. Az előzetes elképzeléseinknek megfelelően azt kaptuk, hogy mindkét fehérje képes volt ezen a szubsztráton is további metilálásra, tehát megállapíthatjuk, hogy a termelt fehérjék potenciálisan képesek trimetilált L9 hiszton H3 jel előállítására (4.24. ábra). A kapott eredmények elemzése nyomán azt láthatjuk, hogy míg a jó szubsztrátnak bizonyuló normál peptiden az E(Z)SAC-SET fehérje jobban működik, mint az E(Z)^{TRM}SAC-SET, addig a dimetilált L9-et tartalmazó szubsztráton a mutáns fehérje viszonylag aktívabb.

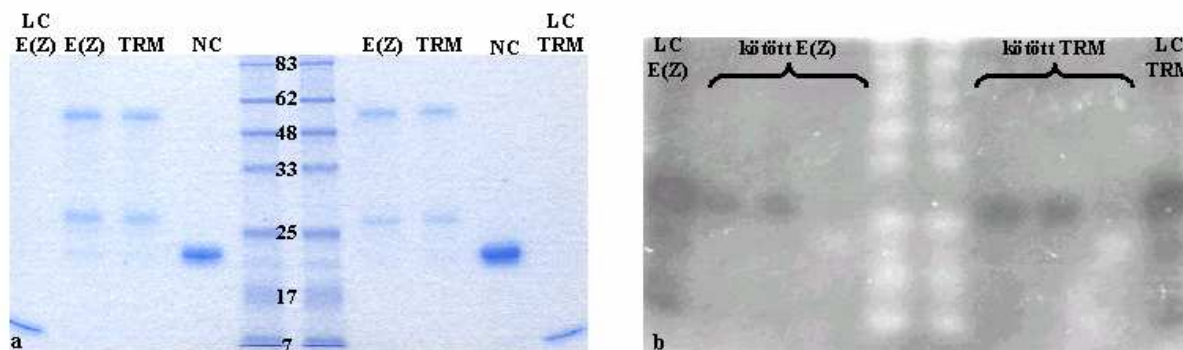
Megnéztük, hogy különbözik-e az E(Z)SAC-SET, és az E(Z)^{TRM}SAC-SET fehérjék metiltranszferáz aktivitása S10-foszforilált H3 peptideken. Kísérleteinkben azt kaptuk, hogy a pozíció foszforilációja az általunk termelt mindkét fehérje metil-transzferáz aktivitását gátolja (4.24. ábra). Nem tűnt úgy, hogy a mutáns fehérje a vadnál számottevően jobban metilálna a S10-foszforilált hiszton fark peptidet, azonban úgy látszott, hogy a normál, nem módosított peptiden kapott „eredeti” aktivitáshoz képest (azt 100%-nak véve) a termelt mutáns fehérjét mégis kevésbé gátolja a foszforiláció.

Eddigi eredményeinket összefoglalva megállapítható, hogy az általunk vizsgált szubsztrátokon a termelt E(Z)SAC-SET, és E(Z)^{TRM}SAC-SET fehérjéknek hiszton-metil-transzferáz aktivitása van. Továbbá megállapítható, hogy hiszton oktamer szubsztráton a vad és a mutáns fehérje a vadhoz hasonló aktivitást mutat, míg H3 és módosítatlan H3 farki peptiden az E(Z)^{TRM}SAC-SET aktivitása alacsonyabb. Emellett dimetilált-L9 peptidet tartalmazó szubsztráton a mutáns fehérje aktívabb, és az S10-pozíció foszforilációja viszonylag kevésbé gátolja a mutáns E(Z)^{TRM}SAC-SET metil-transzferáz aktivitását. További

hipotézisként lehetségesnek tartjuk, hogy a vad fehérje az S10 foszforilált származékot sohasem képes trimetilálni a foszforilált csoporttal lizin aminosavon, míg erre a módosítatlan és a foszforilált peptidhez gyengébben kötődő, jó trimetilációs aktivitású mutáns E(Z)^{TRM}SAC-SET képes lehet. További kísérleteket tervezünk ennek a kérdésnek a megválaszolására.

4.17. AZ E(Z) SET-DOMÉNEK KÖZTI INTERAKCIÓK *IN VITRO* KIMUTATÁSA

A FLAG jelölt E(Z)SAC-SET, és E(Z)^{TRM}SAC-SET fehérjék lehetővé tették, hogy megvizsgáljuk, létrejöh-e *in vitro* interakció az E(Z) fehérjék C-terminálisa között. Azt is megvizsgáltuk, találunk-e különbséget a teljes és a csonkolt, illetve a vad és a mutáns fehérjék interakciós képessége között. Megállapítottuk, hogy *in vivo* lehetséges stabil dimerek képződése. Megállapítottuk, hogy a C-terminális SAC-SET-régió jelenléte elegendő a vad és az E(Z)^{TRM} fehérje esetében is az E(Z) fragmentek dimerizációjához. Az E(Z)^{TRM}SAC-SET fehérje kötési képessége nem tér el számottevő mértékben a vad E(Z)SAC-SET fragmentétől (4.25. ábra).



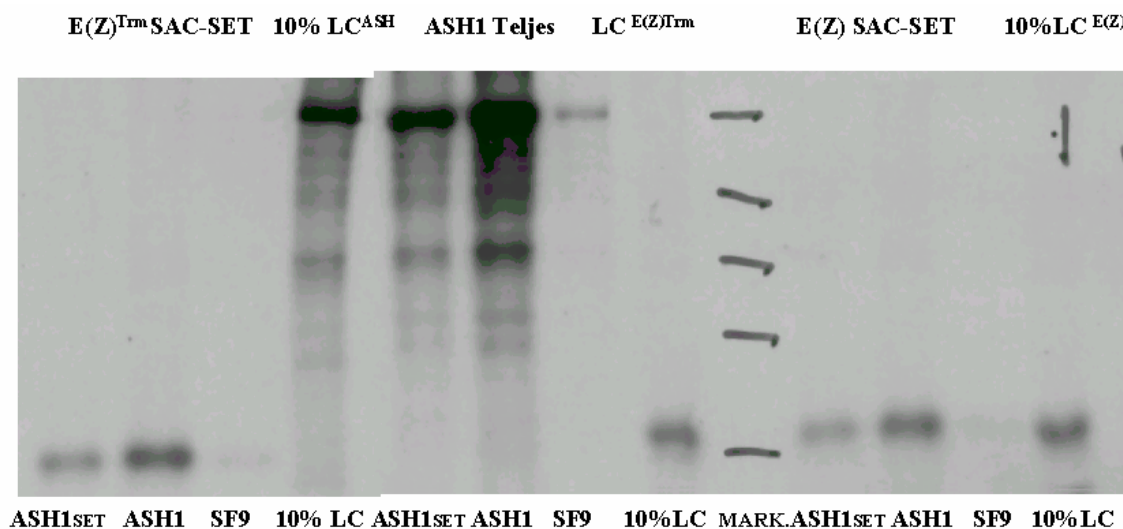
4.25. ábra A csonkolt vad E(Z) és a mutáns E(Z)^{TRM} fehérje kötődése vad és mutáns *in vitro* jelölt csonkolt E(Z) fehérjékkel

a.) A kötési kísérlethez használt mesterségesen termelt 270 aminosav hosszúságú affinitás oszlopon tisztított (Anyagok és módszerek) FLAG-jelölt vad E(Z) és a mutáns E(Z)^{TRM} fehérje coomassie festett gél. b.) Ugyanazon gén autoradiográfias képe a kötődött *in vitro* transzlációval jelölt vad E(Z) és a mutáns E(Z)^{TRM} fehérje feltüntetésével

Lc.: a kötési kísérletben használt teljes fehérjemennyiség 10%-a (loading control). Nc.: kötött E(z) fehérjét nem tartalmazó gyöngyön megkötött fehérjemennyiség: negatív kontroll.

Miután megállapítottuk, hogy a két termelt fehérje nem különbözik egymástól az E(Z) SET-domének kötési erősségében, potenciális homo-, illetve heteromultimer képzési tulajdonságaiban, megvizsgáltuk, hogy az E(Z)^{TRM} fehérjének más SET-domént tartalmazó

kromatinfehérjékkel való interakciós képessége változott-e meg. Megvizsgáltuk, hogy lehetséges-e egyáltalán az E(Z) és más SET-domén fehérjék közötti interakció kimutatása.



4.26. ábra A csonkolt vad E(Z) és a mutáns E(Z)^{Trm} fehérje kötődése teljes hosszúságú és csak PreSET-SET-postSET régiót tartalmazó ASH1 fehérjékhez

Pozitív kontrollként az ASH1 fehérje kötődését, negatív kontrollként a semmilyen mesterségesen termelt fehérjét nem tartalmazó sejtkivonattal inkubált gyöngyöket (SF9) használtuk. Az ábrán látható, hogy az E(Z) fehérjék képesek kötődni a teljes és a csonkolt ASH1 fehérjéhez egyaránt. A *Trm* mutáció nem változtatja meg a kötés erősségét, de mindkét E(Z) fehérje erősebben köti a teljes ASH1 fehérjét a csonkolt változatnál.

Megállapítottuk, hogy a vad és a mutáns mesterségesen termelt E(Z)SAC-SET fragment egyaránt specifikusan képes kötődni *in vitro* az ASH1 és a TRX fehérjéhez is. Az ASH1 fehérje esetében megállapítottuk, hogy a kötéshez elegendő az ASH1 fehérje PreSET-SET-post-SET régiójának megléte (4.26. ábra).

5. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

- trithorax-jellegű homeotikus fenotípusa alapján izoláltunk egy új, domináns mutációt: a *Trithorax-mimic* (*Trm*)-et. Megállapítottuk, hogy a harmadik kromoszómához kapcsoltn öröklődik, és nem allélikus egyetlen korábbról ismert *trx-G* génnel sem.

- A mutációt meiotikus rekombinációval térképeztük, és komplementáltuk a kapott térképpozíciót átfedő deléciókkal. Megállapítottuk, hogy az *Enhancer of zeste* [*E(z)*] gént átfedő deléciókkal a *Trm* mutáció letális, a kiboncolt hemizigótákban a szelvény-transzformációk iránya azonban ellentétes a funkcióvesztéses *E(z)* allélok jelenlétében tapasztalttal. Ezek az eredmények egy funkciónyeréses jellegű *E(z)* allélra utaltak.

- Röntgen reverzióval bizonyítottuk, hogy a *Trm* valóban az *E(z)* gén funkciónyeréses allélja, hiszen a *Trm* revertánsok fenotípusa minden vizsgált szempontból megegyezett a funkcióvesztéses *E(z)* allélokéval. Az $E(z)^{Trm}$ allél fenotípusa rendkívül érzékeny volt a vad *E(z)* gén dózisének változásaira. Az *E(z)* lokusz duplikációja, illetve extra transzgén kópia bevitele erős fenotipikus szuppresszor hatással bírt, míg az *E(z)* gén dózisének csökkentése a fenotípust erősítette. Ennek alapján megállapítottuk, hogy a mutáns fehérje kompetál a vad *E(z)* fehérjével, a funkciónyerés tehát nem neomorf jellegű, de nem is antimorf típusú, hiszen az allél fenotípusa nem utal a vad funkció károsodására.

- Kimutattuk, hogy a mutáns $E(z)^{Trm}$ fehérje kötődési mintázata *Drosophila* óriáskromoszómákhoz nem különbözik a vad *E(z)* fehérjétől. Transzgenikus PRE-t tartalmazó konstrukciók segítségével bizonyítottuk, hogy az $E(z)^{Trm}$ mutáció által kiváltott represszió a TRE szakaszok jelenlétét is igényli.

- Más funkciónyeréses *E(z)* allélok segítségével kimutattuk, hogy a homeotikus gének inaktivációját az *E(z)* multimer formában végzi, amelyben a SET-domének interakcióba

lépnek egymással. Kimutattuk, hogy a *gap*-gének regulációja során hasonló kölcsönhatások alakulnak ki az E(Z) fehérjék között.

- Mesterségesen termelt vad és E(Z)^{TRM} mutáns fehérjék felhasználásával sikerült *in vitro* kötődést kimutatnunk az E(Z) fehérjék SAC-SET-doménjei között, ezzel a genetikai kísérletek alapján tett előzetes megállapításainkat biokémiaiilag is alátámasztottuk.

- A mutáns allélt megszekvenáltuk és a parentális allélhoz képest egyetlen báziscserét találtunk, amely a 741. arginin aminosav lizinre cserélődését okozta. Homológia vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy az érintett pozíció az E(Z) fehérje erősen konzervált SET-domén régiójában helyezkedik el, és ez a pozíció az epigenetikus represszor szerepű E(Z) homológokban mindig konzervált arginin, míg az epigenetikus aktivátor TRX homológokban konzervált lizin.

- Eredményeink alapján felállítottuk egy a hipotézist, amely szerint az E(z)^{Trm} allél olyan mutáns represszort kódol, amelynek inaktiváló funkciója érintetlen, de nem képes különbséget tenni az aktív és inaktív kromatindomének között, ezért végül olyan régiókat is represszál, amelyeknek aktívnak kéne maradni.

- Az E(z)^{Trm} allél könnyen módosítható domináns fenotípusát felhasználtuk egy olyan genetikai tesztrendszer kidolgozására, amely alkalmas az E(Z)-függő represszió kialakításában illetve a különböző állapotú kromatindomének megjelölésében részt vevő fehérjéket kódoló gének azonosítására.

- Megállapítottuk, hogy az E(z)^{Trm} allél fenotípusát a *Polycomb*-csoportba tartozó ismert gének általában szuppresszálják. Az E(Z)-fehérjével közvetlen fizikai kapcsolatba lépő fehérjéket kódoló gének pedig különösen erős represszorok. Vagyis a TRM-függő ektopikus represszió ugyanazokat a fehérjéket igényli, amelyek általában is szükségesek a homeotikus gének E(Z)-függő epigenetikus inaktivációjához.

- A *trithorax*-csoportba tartozó mutánsok jelenléte a Trm fenotípust általában erősítette. Az ektopikus represszió esélyét különösen megnövelte, ha az aktiváló rendszer SET-domént hordozó fehérjéinek (ASH1, TRX) mennyisége csökkent le. Ennek az eredménynek alapján közvetlen kompetíció tételezhető fel a különböző SET-domént tartalmazó fehérjék között az aktív kromatindomének állapotának meghatározásában.

- Kimutattuk az ASH1 és a TRX fehérje *in vitro* kötődését vad és $E(Z)^{TRM}$ mutáns $E(Z)$ fragmentekhez. A vad és mutáns $E(Z)$ fehérjék kísérleteinkben nem különböztek a SET-domén interakciók tekintetében.

- Genetikai interakciós kísérletek alapján megállapítottuk, hogy az $E(z)$ -függő represszió kialakulása érzékenyen reagál a hisztonok és ezek kovalens módosítására képes fehérjék mennyiségének megváltozására. A hisztonok hiperfoszforilációját okozó *Su(var)2-1* mutánsok és a deacetiláz funkciójú *dMi* mutánsok a fenotípust szuppresszálták. Hasonló hatással bírt a deacetiláz enzimeket blokkoló Na-butirát alkalmazása. A hisztonok acetilációs állapotának felismerésében azonban a vad és az $E(Z)^{TRM}$ mutáns fehérje nem különbözik.

- Genetikai kísérletekben kimutattuk, hogy a sejtmagi PP1 foszfatazt kódoló *Su(var)3-6* gén mutációinak szintén szuppresszor hatása van a fenotípusra. Megállapítottuk, hogy a PP1-függő foszforiláció gátolja a vad $E(Z)$ fehérje repressziós működését, a TRM mutáns fehérje viszont érzéketlen a foszforilációs szintben bekövetkező változásokra.

- Azonosítottunk két olyan sejtmagi kináz gént (*aur*, *JIL*), amelyek mutánsai az $E(z)^{Trm}$ allél fenotípusát erősítették. Mivel ezek a kinázok képesek speciálisan hiszton H3 foszforilációjára, ezért biokémiai módszerekkel ellenőriztük azt az elképzelésünket, hogy a hiszton H3 10. szerin aminosavának foszforilációja az a molekuláris jel, amely meggátolja az $E(z)$ -függő epigenetikus repressziót, de amelyre az $E(Z)^{TRM}$ mutáns fehérje nem érzékeny.

- Kimutattuk, hogy mesterségesen, Sf9 sejtvonalon termelt vad és $E(Z)^{TRM}$ mutáns fehérjék képesek specifikusan kötődni a hiszton H3 N-terminális farki régióihoz, és ez a

kötődés függ a hiszton farkak kovalens módosításaitól. Legerősebben mindkét fehérjéhez a 9. lizinen dimetilált hiszton H3 N-terminális peptid kötődött, míg leggyengébben a 10. szerinen foszforilált peptid, és ez utóbbi esetben a *Trm* mutáció jelenléte a kötést csaknem teljesen megszüntette.

- Kimutattuk, hogy az általunk termelt 273 aminosav hosszúságú C-terminális vad és E(z)^{TRM} mutáns fehérjének egyaránt *in vitro* hiszton-metil transzferáz aktivitásuk van. Oktamer szubsztráton a két fehérje közel azonos aktivitást mutat, a mutáns fehérje azonban peptid szubsztrátokon 30%-kal kevésbé aktív. Kimutattuk, hogy az aktivitás mindkét fehérje esetében specifikus a H3 hiszton fark 9. lizin aminosavra és trimetiláció létrehozását is képes katalizálni. Szintén kimutattuk, hogy a 10. szerin aminosav foszforilációja mindkét fehérje esetében erősen csökkenti a metil-transzfer hatékonyságát, és hogy a mutáns fehérje hatékonyabban trimetilál.

- Kísérleteink nagyban hozzájárultak ahhoz, hogy megértsük, milyen szerepet tölt be az E(z) fehérje az epigenetikus represszióban és milyen molekuláris szignálok alapján képes a vad fehérje az aktív és inaktív kromatindomének megkülönböztetésére.

6. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

6.1. AZ E(Z) FEHÉRJE SZEREPE AZ EPIGENETIKUS REPRESSZIÓBAN

Drosophilában aktív E(Z) fehérje hiányában más POLYCOMB-fehérjék is kevésbé képesek kötődni az óriáskromoszómákhoz (Rastelli és mtsai, 1993). Ez arra utal, hogy az E(Z) fehérje kihorgonyzódása megelőzi más epigenetikus represszor fehérjék kapcsolódását. Érdekes módon azonban, ugyanezen körülmények között az epigenetikus aktiváció fenntartásában kulcsszerepet betöltő TRX fehérje kötődése is hasonló mértékben meggyengül (Rastelli és mtsai, 1993). Ez arra utal, hogy az E(Z) fehérje szerepe nem korlátozódik az epigenetikus szabályozás inaktivációs oldalának megteremtésére, hanem inkább az aktiválás-inaktiválás egyensúlyának kialakításában érhető tetten.

A ENHANCER OF ZESTE fehérje egy 600kDa méretű komplex formájában tisztítható Drosophila sejtmagból (Ng és mtsai, 2000; Tie és mtsai, 2001). A komplexet hasonló összetételben több laboratórium is megtalálta (Müller és mtsai, 2002; Czermin és mtsai, 2002; Kuzmichev és mtsai, 2002) és újabban PRC2-nek nevezték el (Kuzmichev és mtsai, 2002). A komplex az E(Z) mellett az ESC-et, a SU(Z)12-t és a CAF1-et minden szerző szerint tartalmazza és valószínűleg a komplexek egy részében a PCL (Tie és mtsai, 2003) és az RPD3 deacetiláz is megtalálható. A komplex tagjai közül az ESC fehérjéről régen bizonyított (Struhl és Brower 1982; Glicksman és Brower, 1988), hogy alapvető szerepe van abban a folyamatban, melynek során a korai embrionális fejlődés alatt a *bithorax*-komplex aktiválódási mintázatának kialakulását létrehozó faktorok átadják helyüket a POLYCOMB-TRITHORAX rendszer epigenetikus szabályozó fehérjéinek. Az E(Z) és az ESC egymás közvetlen *in vivo* partnerei a POLYCOMB-függő represszióban (Jones és mtsai, 1998; Tie és mtsai, 1998). A funkcióvesztéses allélok erősítik egymás fenotipikus hatását, és az E(Z) és ESC fehérje azonos

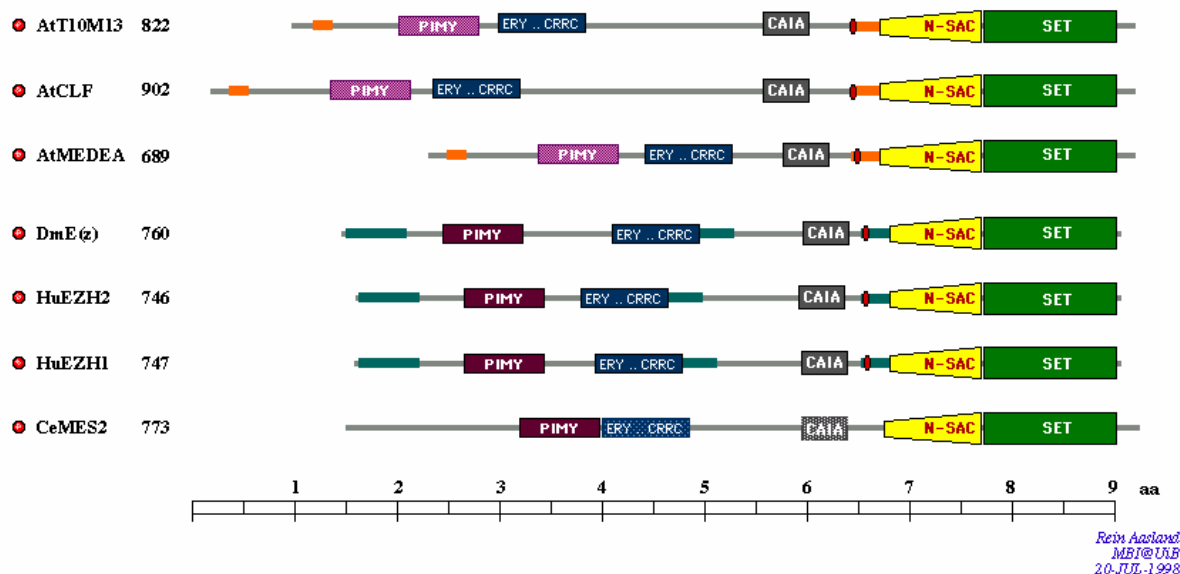
helyeken kötődik a *Drosophila* óriáskromoszómákon (Campbell és mtsai, 1995; Tie és mtsai, 1998).

Ezek a megfigyelések alátámasztják azt az elképzelést, hogy az E(Z) fehérjét tartalmazó komplex feladata, hogy biztosítsa a korai transzkripció szabályozó faktorok közreműködésével kialakult génaktivitási mintázat és kromatinszerkezeti különbségek felismerését és konverzióját az epigenetikus átadódásra képes, új fehérjék kapcsolódásával kialakuló, érett kromatinkonformációvá.

Mivel az E(Z) fehérjének szerepe van a BX-C korai transzkripció aktivitásának sejtosztódásokon keresztül megőrzendő epigenetikus mintázattá alakításában, feltételezhető, hogy szerepet játszik annak a molekuláris szintű különbségnek az érzékelésében, amely megjelöli a különböző transzkripció aktivitású kromatindoméneket. Annak a kérdésnek a megválaszolását, hogy hogyan történik a molekuláris jel leolvasása, nagyban elősegítheti olyan $E(z)$ mutánsok analízise, ahol kizárólag a felismerési folyamat sérült. Úgy gondoljuk, hogy az általunk azonosított $E(z)^{Trm}$ megfelel a leírt feltételeknek. Az $E(z)^{Trm}$ összehasonlítása egy másik funkciónyeréses alléllal, az $E(z)^I$ -gyel támogatja elképzelésünket. A két allél közül csak az $E(z)^{Trm}$ képes önmagában is a normális inaktíváló funkció hibátlan ellátására a homeotikus géneken (Jones és Gelbart, 1990; Bajusz és mtsai, 2001). A funkciónyeréses $zeste^I$ mutáció esetében a *white*-gén ectopikus inaktívációja mindkét funkciónyeréses mutáció háttérében bekövetkezik, de csak az $E(z)^{Trm}$ hoz létre ectopikus inaktívációt a homeotikus targeteken és az *engrailed* génen. Mindezek alapján úgy gondoltuk, hogy az $E(z)^{Trm}$ mutáció finomanalízisével közelebb juthatunk nemcsak az E(Z) fehérjének a korai aktiváció fenntartott aktivitássá alakításában játszott szerepének megértéséhez, de a repressziót megakadályozó molekuláris jel azonosításához is.

Az E(Z) funkciója nagyon erősen konzervált. Az E(Z)-t tartalmazó PRC2-komplex (Ng és mtsai, 2000; Tie és mtsai, 2001; Müller és mtsai, 2002; Czermin és mtsai, 2002;

Kuzmichev és mtsai, 2002) fehérjéit *C. elegans*-ban, és meglepő módon magasabbrendű növényi modellrendszerben, *Arabidopsis thaliana*-ban és kukoricában is azonosították (Springer és mtsai, 2002). Sőt, a homológia nemcsak az aminosav szekvencia szintjén jelentkezett, hanem ezeknek a növényi PC-G fehérjéknek a génszabályozásban betöltött szerepe is hasonlóknak mutatkozott.



6.1. ábra Az E(Z) homológok hasonló doménszerkezete

Rövidítések At: *Arabidopsis thaliana*, Dm: *Drosophila melanogaster*, Hu *Homo sapiens*, Ce: *Caenorhabditis elegans*. A jelzett domének az N-SAC: cisztein gazdag domén, SET: SU(VAR)3-9, E(Z), TRX domén, PIMY: Pro, Tyr, Met, Ile konzervált aminosavakat tartalmazó domén, ERY..CRRC: Glu, Arg Tyr, Cys, Arg, Arg Cys aminosavakat tartalmazó domén, CAIA: Cys Ala Ile Ala aminosavakat tartalmazó domén (Rein Aasland nyomán).

Az E(Z) fehérje *Arabidopsis* homológja (6.1. ábra), a CURLY LEAF (CLF) fehérje (Goodrich és mtsai, 1997) a virágzás során aktiválódó növényi homeotikus géneket represszálja a levél-szövetekben. Az ennyire távoli rokon fehérjék közti funkcionális hasonlóság még meglepőbb, ha tekintetbe vesszük, hogy a növényi és az állati homeotikus gének felépítése és általános szabályozása szerkezetileg különbözik (McGinnis és mtsai, 1984; Yanofski és mtsai, 1990). A SU(Z)12-höz nagyon hasonló az EMF2 nevű homológ szerepe, hiszen mutációja a csírázó magban a virágzás homeotikus génjeinek ektopikus kifejeződését okozza (Yoshida és mtsai, 2001). A FIS2 nevű homológ esetében is hasonló

represszor funkciót azonosítottak: a fehérje megtermékenyítés hiányában gátolja a mag fejlődését, amely folyamatban egyébként a másik E(Z) fehérje homológ, a FIS1/MEA fehérje mellett az ESC homológgal (FIS3/FIE) működik együtt (Grossniklaus és mtsai, 1998; Luo és mtsai, 1999, 2000). A harmadik SU(Z)12 homológ, a VRN2 (Sheldon és mtsai, 2000) a virágzás kontrolljában alapvető szerepet betöltő FLC gén epigenetikus represszora.

Emellett a PRC2 komplex két tagjának, az E(Z)-nek és a SU(Z)12-nek a homeotikus regulációnál is korábbi folyamatban, a petefejlődésben is szerepe van. Bizonyos hőmérséklet-érzékeny $E(z)$ allélokra homozigóta anyákat a permisszív hőmérsékleten petéztetve is sterilitást tapasztaltunk ($E(z)^{12}$), más allél kombinációk a restriktív hőmérsékleten mutatnak hasonló fenotípust ($E(z)^{28}$). Mindkét esetben jellemző, hogy a petefejlődés a negyedik-ötödik stádiumban megakad, a dajkasejtek degenerálódnak, a petekamrák nem növekednek és a peték nem fejlődnek tovább (Phillips és Shearn, 1990). A SU(Z)12 fehérje petefejlődésben játszott szerepét bizonyítja, hogy két független alléljáról ($Su(z)12^2$, $Su(z)12^5$) is kiderült, hogy homozigóta ivarvonal klónokban a petefejlődés korai megakadását okozzák, míg egy hipomorf alléllal ($Su(z)12^1$) kombinálva abnormális peték kifejlődését eredményezik. Az ESC-nek ugyan nem sikerült hasonló szerepét kimutatni Drosophilában, de egér homológjáról (EED) kiderült, hogy jelenléte szükséges a magzat extraembrionális szöveteinek, a trophoblast sejteknek a túléléséhez, továbbá az X-kromoszóma inaktivációhoz is (Wang és mtsai, 2001; Mak és mtsai, 2002). A többi Pc-G mutáns esetében nem találtak hasonló típusú, a csírvonalat érintő fenotípusokat, és a vizsgált esetekben a peteképződés zavartalan (Soto és mtsai, 1995).

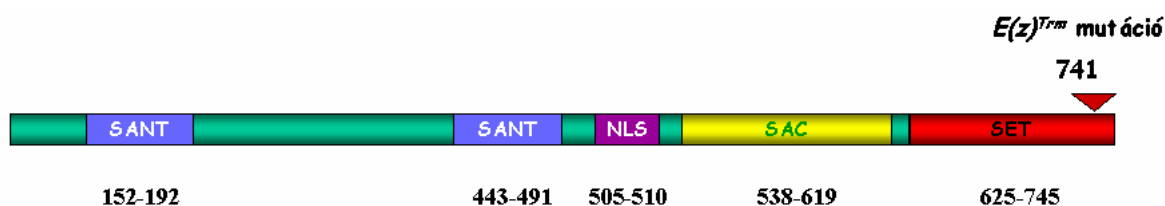
Az E(Z) fehérje szerepe azonban még ennél is szerteágazóbb. Funkcióvesztéses mutánsaiban nemcsak az epigenetikus represszió, hanem a sejtciklus folyamatai is károsodnak, hiszen a homozigóta mutáns lárvák diploid sejtjeinek mitotikus indexe messze elmarad a normálistól, illetve a sejtciklus a metafázisban blokkolt (Gatti és Baker, 1989;

Phillips és Shearn 1990). A funkcióvesztéses $E(z)$ homozigóta lárvák kis diszkusz (small disc) fenotípust mutatnak, ami szintén a lecsökkent osztódási aktivitás következménye (Shearn és mtsai, 1978). Sejtjeikben szabálytalan kondenzációt mutató, illetve fragmentálódott kromoszómákat találhatunk (Gatti és Baker, 1989). Mindezeknek a megfigyeléseknek a fényében előző megállapításainkat azzal egészíthetjük ki, hogy az $E(z)$ fehérje szerepe nemcsak az epigenetikus represszió kialakulásában alapvető, de a kromoszómák hibátlan kondenzációjához, illetve szegregációjához is szükséges. Ezekből az eredményekből úgy tűnik, hogy az $E(z)$ fehérje bizonyos szempontból összekötő kapcsot képez a sejtek proliferációja és determinációja között. Ezeknek a folyamatoknak az integrációja különösen azért fontos, mert a már kialakult determinációs állapotnak nemcsak a *bithorax*-komplex iniciációja után kell megőrződnie a teljes további életszakaszra kiterjedő fenntartó fázisban, hanem a genom teljes expressziós mintázatának konzerválódnia kell a már determinált sejtekben, miközben újra és újra a teljes genom megkettőződik, és a kromatin is újjáépül a sejtosztódások folyamán.

Ezeket a megállapításainkat alátámasztják a genetikai és biokémiai megfigyelések is. Az eddig azonosított közel száz $E(z)$ allélt a legkülönbözőbb fenotípusok alapján izolálták (mitotikus, homeotikus, zeste-interaktor, nos-szuppresszor, grappa-szuppresszor, Fab-7-szuppresszor, párosodó PRE inaktivációt befolyásoló), és a különböző allélok az eltérő tesztrendszerben eltérő, több esetben egyenesen ellentétes fenotípust mutatnak. Emellett a génnek szokatlanul sok, egymástól eltérő fenotípusú funkcionyeréses allélját is sikerült izolálni, ami együttesen arra utalt, hogy a kódolt fehérje többféle feladatot lát el, és a független mutációk eltérő funkciókat érintenek.

A fehérje doménszerkezetének vizsgálata hasonló következtetésekre vezetett. A 761 aminosav hosszúságú *Drosophila* $E(z)$ fehérjében nukleáris lokalizációs szignált (505-510), és több, különböző funkciójú fehérjében felbukkanó konzervált domént is sikerült megtalálni

(6.2. ábra) A több mint hatszáz génben előforduló SET-domén (625-745.AA) és az azt megelőző Pre-SET, vagy régebbi elnevezés szerint cisztein gazdag (Cys-rich 538-619) domén funkcionálisan is jól jellemzett. A fehérjében két, a myb DNA-binding-domének közé tartozó SANT-domén szekvenciát azonosítottak (152-292; 443-491). Ezt a domént az SWI/SNF és az ADA-komplex fehérjeiben is megtalálták (Aasland és mtsai, 1996).



6.2. ábra A Drosophila E(z) fehérje doménszerkezete

Az ábrán a különböző funkciójú fehérjékben azonosított konzervált doméneket tüntettük fel. A domének alatti számok a konzervált aminosavak pozícióját jelzik a 761 aminosav hosszúságú Drosophila E(z) fehérjében.

A közelebbi homológok (ortológok) általános doménszerkezete (6.1. ábra) és a SET-domén szekvenciája is hasonló, míg a távolabbi homológok vizsgálata alapján megállapítható volt, hogy a SET-domén valójában négy szubdoménből áll, melyek a távoli homológokban is erősen konzerváltak, melyek a metil-transzferáz aktivitást biztosítják. A szubdomének között hosszabb-rövidebb gyenge konzerváltságot mutató szakaszok helyezkednek el. Ezekről azt gondolják, hogy szerepük az adott protein speciális partnereihez való kapcsolódás.

6.2. AZ $E(z)^{Tm}$ MUTÁNS SEGÍTSÉGÉVEL SZERZETT ÚJ INFORMÁCIÓK AZ ENHANCER OF ZESTE FEHÉRJE INAKTIVÁLÓ MŰKÖDÉSÉRŐL

Felvetődött az az elképzelés, hogy az $E(z)$ gént egyaránt tarthatjuk a *Polycomb* és a *trithorax*-csoport tagjának (LaJeunesse és Shearn, 1996; Gildea és mtsai, 2000). Elméletileg elképzelhető, hogy az $E(z)$ fehérjének két egymástól független és egymással ellentétes funkciója is van. Vagyis szerepet játszik az epigenetikus represszió és az epigenetikus aktiváció folyamatában is. Ilyen szempontból az $E(z)^{Tm}$ domináns antimorf mutánsnak is tekinthető az aktivációs funkciót illetően, miközben a feltételezett represszor funkció érintetlenül marad. Formális szempontból néhány megfigyelésünk alátámasztani látszik ezt az

elképzelést. Például az $E(z)^{Trm}$ feltételezett antimorf jellege alátámasztható azzal, hogy a mutáció revertálható *cis*-helyzetben (ugyanazon a kópián) indukált Röntgen mutációkkal. Ezen kívül a funkcióvesztéses allélok *transz*-helyzetben a fenotípus enhanszerei, míg az $E(z)$ gén extra kópiáinak bevezetése a fenotípust szuppresszálja.

Más megfigyelések azonban ellene szólnak az $E(z)^{Trm}$ antimorf jellegére vonatkozó hipotézisnek. Az $E(z)^{Trm}$ *zeste*¹-enhanszer, illetve *nos*-enhanszer fenotípusa ellentétes irányú az ismert antimorf és funkcióvesztéses $E(z)$ allélok *zeste*¹-szuppresszor, illetve *nos*-szuppresszor fenotípusával, és arra utal, hogy az $E(z)^{Trm}$ mutáns a vad $E(z)$ allélhoz képest jobban inaktívál. Az a tény, hogy az $E(z)^{Trm}$ és az $E(z)^{TrmTG}$ allélok erős domináns fenotípusa egyetlen pontmutáció következménye, valószínűtlenné teszi, hogy ugyanaz az aminosav-csere egyszerre vezessen funkcióvesztéshez az aktivációs működésben és túlműködéshez az inaktivációs működés terén.

Véleményünk szerint az $E(z)^{Trm}$ független rendszerekben megfigyelt fenotípusai kivétel nélkül azzal magyarázhatóak, hogy a mutáns fehérje egy túlműködő represszor. Elképzelésünket erősen támogatja, hogy az $E(z)^{Trm}$ nemcsak funkcióvesztéses mutációkkal revertálható, hanem erős letális antimorf allélok is a homeotikus fenotípus szuppresszorai. Mindezek alapján úgy gondoljuk, hogy az $E(z)$ fehérje egyik szubfunkciója a cél gének helyes felismerése: vagyis a vad fehérje csak már represszió alatt álló targeteken hoz létre további repressziót, míg a transzkripciósan aktív célgéneket elkerüli. Úgy gondoljuk, hogy az $E(z)^{TRM}$ fehérjének ez a szubfunkciója sérült, és ennek következményeképpen a mutáns háttérben olyan gének is inaktiválódnak, amelyeknek aktívnak kellene maradniuk.

Megjegyzésre érdemes továbbá, hogy az $E(z)$ gént a *Polycomb*-csoportba saját funkcióvesztéses fenotípusa alapján sorolták be (Jones és mtsai, 1990), míg a *trithorax*-csoportba funkcióvesztéses *ash1* allélokkal adott interakciója alapján sorolható (LaJeunesse és Shearn, 1996; Gildea és mtsai, 2000). Saját kísérleteink alapján az $E(z)$ mutációk interakcióit

ma már sokkal egyszerűbben magyarázhatjuk. Ismertté vált, hogy a TRX-csoportba tartozó ASH1 fehérje képes a H3 farok speciális metilációjára mind a K4, mind a K9 pozícióban, és ezzel egy aktivációs epigenetikus szignált hoz létre (Beisel és mtsai, 2002). Saját eredményeink szerint pedig az E(Z) fehérje képes a H3 K9 pozíciójának specifikus metilációjára, amely a K27 metilációval együtt egy repressziós epigenetikus szignált hoz létre (Cao és mtsai, 2002). Amennyiben feltételezzük, hogy a *Drosophila* homeotikus szabályozó régióiban az ASH1 fehérje által kiváltott K4, K9 trimetiláció fontos az epigenetikus aktiválódás átadódásának biztosításához, míg az E(Z) fehérje által létrehozott K9-K27 trimetiláció az epigenetikus repressziót tartja fenn (akárcsak a megvizsgált analóg rendszerekben), akkor szembetűnő, hogy a mindkét fehérje által metilálható K9 pozíció bivalens szerepet tölthet be: egy epigenetikus aktivátor, és egy epigenetikus represszor szignálnak is része. Ilyen értelemben, miközben az E(Z) fehérje metilálja a K9 pozíciót, egyszerre épít egy aktiváló szerepű, illetve egy represszor értelmű epigenetikus jelet. Az általunk végzett kísérletek alapján elképzelhető, hogy az *ash1* mutánsokban limitált K9 metilációs kapacitás további szűkítése E(z) mutáció bevezetésével az aktivációs jel felépülését nehezíti meg.

6.3. AZ E(Z)^{TRM} FEHÉRJE TÁMADÁSPONTJA

Az E(z)^{Trm} allél fenotípusának egyik magyarázata lehet, hogy a mutáns fehérje ektopikus helyekre kötődik. Saját eredményeink ezt a feltételezést nem támasztják alá. A mutáns E(z)^{TRM} fehérje kötődési mintázata a nyálmirigy óriáskromoszómákhoz megkülönböztethetetlen a vad fehérje kötődési mintázatától. Ezen kívül a vad E(z) gén dózisének növelése a bevitt kópiák számával arányosan szuppresszálja az E(z) funkcionyeréses fenotípusát, ami azt jelzi, hogy a vad és a mutáns fehérje közös cél régiókat szabályoz és ezeken egymással versenyeznek. Ezek a megfigyelések abba az irányba mutatnak, hogy az E(Z) fehérje az általa szabályozott cél régiókhoz azoknak aktív, illetve

inaktív állapotától függetlenül képes kötődni, de a fehérje működése nem azonos a kétféle doménben. Más fehérjék esetében is sikerült hasonló homogén kötődést kimutatni, hiszen a nyálmirigyben inaktív *bithorax*-komplex régió egyaránt erős TRX és ASH1 kötőhely (Chinwalla és mtsai, 1995; Tripoulas és mtsai, 1996). Az epigenetikus reguláció alatt álló, a *Fab-7*-régió egy nagy darabját tartalmazó riporter gének konstrukció bekapcsolt és kikapcsolt állapotban is köt mind TRX-et mind PC-t (Rastelli és mtsai, 1993; Tripoulas és mtsai, 1996; Cavalli és Paro, 1998). Más irányú saját, független kísérleteink alapján is úgy tűnik, hogy az E(Z) fehérje nemcsak az inaktív kromatindomének állapotának epigenetikus fenntartását biztosítja, hanem az aktív doménekben a *cis*-regulátorokban elhelyezkedő enhanszerek erősségének beállításához is hozzájárul. Eredményeink alapján ugyanis az E(Z) aktivitás, valamint egy adott *cis*-regulátorban a PRE-k számának együttes lecsökkentése az adott domén hiperaktivációjához vezethet (Bajusz I., Sipos L., Pintér L., Gyurkovics H. előkészületben). Mivel elképzeléseink szerint az $E(Z)^{TRM}$ nem képes biztosan megkülönböztetni az aktívan tartandó és az inaktiválandó kromatindoméneket, ezért jelenléte a normálisan aktív domének ektopikus repressziójához vezet. Ezt a feltételezést továbbgondolva arra a következtetésre kell jutnunk, hogy a különböző állapotú kromatindomének valamiféle molekuláris jellel vannak megjelölve, amely jelet a vad E(Z) fehérje hibátlanul ismer fel, az $E(Z)^{TRM}$ fehérje azonban nem, ezért nem megfelelő helyeken is inaktivál.

Az azonban, hogy az $E(z)^{Trm}$ letálfázisa igen késői, és még az elvétve kikelő $E(z)^{Trm}/E(z)^{TrmTG}$ anyáktól származó homozigóta embriókon sem találunk homeotikus transzformációkat, sőt a kifejlődő felnőtt állatok szintén pharag adult letálisak, arra utal, hogy ez a tévesztés csak részleges, nem minden esetben kapcsolja ki a mutáns fehérje az aktív állapotban lévő célgénket. Ennek kísérleteink szerint egyik valószínű oka a rendelkezésre álló limitált represszor kapacitás volt, hiszen az E(Z)-függő represszióhoz szükséges faktorok

mutációja heterozigóta állapotban is erős szuppresszora az $E(z)^{Trm}$ -függő homeotikus fenotípusnak. Kísérleteink alapján egy másik fontos oknak látszik az $E(z)^{TRM}$ fehérje kompetíciója az aktiváló rendszer SET-domén fehérjéivel a represszió és a fenntartott aktivitás létrehozásához egyaránt szükséges célrégiókon, a PRE-TRE szakaszokon. A *bxd-Ubx* régió részletes kromatin-immunoprecipitációs analízise alapján úgy tűnik, hogy a SET-domén fehérjék által kialakított specifikus hiszton metilációs mintázat nem terjed rá az egész szabályozó régióra. A harmadik lábdiskuszbán, ahol a *bxd-Ubx* régió aktív, csak a bizonyított PRE-TRE aktivitással rendelkező (Tillib és mtsai, 1999) szakaszon és a promóter régión jelenik meg specifikus H3 trimetilált-K4 mintázat (Frank Sauer, személyes közlés). Tehát az a kromatinszakasz, ahol az aktiváció, vagy inaktiváció kérdése eldőlt, mindössze néhány nukleoszómára korlátozódik. Az általunk transzgenikus rendszerben végzett kísérletek azt mutatják, hogy azoknak a párosodás-érzékeny inszertet hordozó állatoknak a szemszíne világosodik $E(z)^{Trm}$ -függő módon, amelyekre a funkcióvesztéses *trx* és *ash1* allélok is hasonló hatást gyakorolnak. Ez azt jelenti, hogy az *iab-7* szabályozó régióknak ugyanazok a darabjai szükségesek a *white*-riportergén $E(z)^{Trm}$ -függő ektopikus inaktivációjához, amelyeken a *trx* és *ash1*-függő aktiváció is mediálódik, vagyis az ektopikus represszió a TRE szakasz jelenlétét is igényli.

6.4. AZ $E(z)^{TRM}$ SET- DOMÉNJÉNEK SZEREPE A PC-G-FÜGGŐ INAKTIVÁCIÓBAN

Az antimorf $E(z)^{son}$ allélokkal végzett interakciós kísérletekből kiderült, hogy a preSET és a SET-doménben bekövetkezett antimorf hatású *son* mutációk (Carrington E. A. és Jones R. S. közöletlen adat) hatékonyan szuppresszálják az $E(z)^{Trm}$ *trx*-jellegű fenotípusát, és csaknem teljesen megakadályozzák az ektopikus inaktivációt, miközben az $E(z)^{Trm}$ allél jelenléte erősen gátolja az $E(z)^{son}$ allélok nos-szuppresszor fenotípusát. Az is megállapítható, hogy az említett allélok kölcsönös szuppresszáló hatása annál erősebb, minél közelebb vannak a mutációk által érintett aminosavak egymáshoz a fehérje szekvenciában, ami egyébként az

eddig meghatározott szerkezetű SET-domének esetében (1N6C, 1H3I, 1MVX, 1MUF) korrelál a térbeli közelséggel. Ezek a kísérletek azt sugallják, hogy az E(Z) fehérje működését homodimer, vagy homomultimer formában látja el. A homomultimer E(Z) komplexekben a preSET és SET-domének lépnek egymással fizikai interakcióba. Más szerzők is valószínűsítették azonban $E(z)$ homomultimer komplexek létezését (Jones és Gelbart 1993).

Kötési kísérletek során sikerült közvetlen biokémiai bizonyítékot szereznünk arra vonatkozólag, hogy a teljes hosszúságú, és a csak preSET és SET-domént tartalmazó mesterségesen termelt E(Z) fehérjék képesek kötődni a FLAG peptiddel jelölt 273 aminosav hosszúságú C-terminális E(Z) fehérje darabokhoz. Azt is megállapítottuk, hogy a genetikai interakciós kísérletek alapján várt eredményeknek megfelelően mind a vad, mind az $E(z)^{Trm}$ mutáns fehérje darabok képesek *in vitro* erre az interakcióra. Habár az E(Z) fehérjék *in vivo* asszociációja még nem bizonyított, úgy gondoljuk, hogy a több E(Z) fehérje által formált közös SET-domén felszín két egymással összefüggő feladatot is ellát. Érzékeli a célgének aktív, illetve inaktív állapotát jelölő szignálok jelenlétét, és ezeknek megfelelően szabályozza a PC-függő inaktiváció kialakulását.

Hogyan befolyásolhatja az E(Z) fehérje által formált közös SET-domén felszín a célgének epigenetikus represszióját? Az egyik lehetőséget a két független allélban ($E(z)^{Trm}$ és $E(z)^{TrmTG}$) is bekövetkezett azonos speciális aminosav-csere sugalmazza, ami egy kulcsszerepű régióban egy E(Z)-típusú SET-domént egy TRX-típusú SET-doménné konvertál. Más SET-domén tartalmú fehérjék, így a TRX és az ASH1 képesek önmagukkal és egymással *in vitro* és *in vivo* is fizikai interakcióba lépni a SET-doménjükön keresztül (Rozenblatt-Rosen, 1998). Ezt azonban az $E(z)$ homológok által kódolt fehérjék esetében nem bizonyították, sőt az említett szerzők szerint a teljes hosszúságú E(Z) fehérje nem képes *in vitro* sem kötődni a TRX és az ASH1 fehérjéhez. Saját kísérleteink szerint azonban az általunk használt 273 aminosav hosszúságú E(Z) fehérje darabok egyaránt képesek asszociálódni a TRX

és az ASH1 fehérjékhez a Rosenblatt-Rosen-féle (1998) publikációnak megfelelő kötési kísérletben. Ráadásul a kötés az ASH1 fehérje esetében még 0.4 M-os NaCl koncentrációnak is ellenáll, ami a fenti szerzők által használt sókoncentráció négyszerese. Ezek a kísérletek megmagyarázhatják azokat a genetikai eredményeket, amelyek szerint a *trx* gén dózisének változtatása igen erős hatást gyakorolnak nemcsak az általunk izolált allél fenotípusára, de általában az E(Z)-függő epigenetikus inaktiváció hatékonyságára is. Kísérleteink során azonban az is bebizonyosodott, hogy nincs számottevő különbség a vad és az $E(z)^{Trm}$ mutáns SET-domént hordozó fehérjék asszociációs képessége között. Tehát a Trm mutáns fenotípus nem magyarázható közvetlenül a vad és az $E(z)^{Trm}$ mutációt hordozó E(Z) fehérjék SET-doménjei közötti, illetve az epigenetikus aktivátor TRX és ASH1 fehérjékkel létrejövő interakció megváltozásával.

6.5. AZ $E(Z)^{TRM}$ FEHÉRJE EGYÜTTMŰKÖDŐ PARTNEREI

A célgénnek részleges inaktivációja az $E(z)^{Trm}$ mutáció hátterében kiváló lehetőséget biztosít olyan faktorok azonosítására, amelyek szükségesek az E(Z)-függő epigenetikus represszióhoz, illetve olyanokéra, amelyek ez ellen hatnak. Kísérleteink szerint a *Polycomb* csoportba tartozó mutánsok egy része az $E(z)^{Trm}$ allél domináns fenotípusát csaknem eltünteti. Ezek a *Polycomblike* (*Pcl*), az *extra sexcomb* (*esc*), a *Su(z)12*, a *polyhomeotic* (*ph*), *pleiohomeotic* (*pho*) és a *Su(z)5*. A fenti mutációk közül a *Pcl*, az *esc* és a *Su(z)12* közvetlen *in vivo* partnerei az E(Z) fehérjének a Pc-függő epigenetikus represszióban (Ng és mtsai, 2000; Tie és mtsai, 2001; Müller és mtsai, 2002; Czermin és mtsai, 2002; Kuzmichev és mtsai, 2002). Tehát az általunk létrehozott genetikai interakciós rendszer valóban képes független módon is bizonyítható funkcionális kölcsönhatások kimutatására. Az általunk használt interakciós rendszerben szuppresszornak bizonyultak a Pc-G más ismert tagjai is: a *Polycomb*(Pc), az *Enhancer of Polycomb* [*E(Pc)*], a *super sex combs* (*sxc*), illetve a *Sex combs on midleg* (*Scm*), a *Su(z)2* komplex tagjai, illetve a *Sex comb extra* (*Sce*) és az *Anterior*

sex combs (*Asx*) is. Tehát a más szerzők által a toron trithorax és Polycomb enhanszernek bizonyuló (Enhancer of Trithorax and Polycomb: ETP) gének null alléljai a mi interakciós rendszerünkben alapvetően gyenge, de szignifikáns szuppresszorként, azaz *Pc*-G tagként viselkedtek. Találtunk azonban mi is olyan hipomorf és különleges *Pc*-allélokat, amelyek az abdomenen enhanszerként viselkednek. Ezeknek az alléloknak azonban van saját abdominális *trx*-fenotípusuk: pl. a hipomorf *Asx^{Pl}* esetében (Sinclair és mtsai, 1992; Milne és mtsai, 1999), illetve bizonyos gének esetében az eltérő allélok ellentétes irányú fenotípus-módosító hatást mutatnak (*Psc^l*, *Psc^{e22}*) (Wu és Howe, 1995).

A legtöbb *trx*-csoportba tartozó mutáció az elvárásoknak megfelelően Trm enhanszerként viselkedett. Kiemelkedett a SET-doménnel rendelkező fehérjét kódoló két *trx*-G gén, az *ash1* és a *trx* enhanszer hatása, amely az életképesség erős csökkenését is eredményezte. Szintén erős volt a BRAHMA-komplex azonosított fehérjeit kódoló gének (*brm*, *mor*, *snr1*, *osa*) enhanszer hatása, találtunk azonban olyan allélokat is, amelyeknek bizonyos testtájakon nyilvánvaló szuppresszor hatásuk volt (*sls* és *skd*), aminek alapján az érintett géneket ETP hatásúaknak tartjuk. Ezeket az allélokat *Pc*-szuppresszor fenotípusuk alapján azonosították, és meglepő, hogy az ektopikus inaktiváció ellen hatottak az általunk használt rendszerben. Az eredmények alapján nyilvánvaló, hogy ha egy adott génnek nincs saját homeotikus fenotípusa, pusztán a másodlagos interakciók alapján igen nehéz eldönteni, hogy működése a kromatin aktív, vagy inaktív állapotának meghatározásához szükséges. Adott gének ETP-csoportba sorolása sokszor a felhasznált tesztrendszer függvénye, és úgy tűnik, hogy néhány esetben a váratlan és paradox interakciók felbukkanása a PC-TRX-rendszer általános egyensúlyvesztésének következménye. A targetspecifitás különbségei, és a PC-TRX-rendszer komplex regulációja nyomán felerősített különbségek a célgének kifejeződését a várttal ellentétesen is változtathatják.

6.6. A HISZTON-ACETILÁCIÓ FONTOS AZ AKTÍV KROMATINDOMÉNEK KIJELÖLÉSÉBEN

Kísérleteink szerint a *Trm* fenotípus különösen érzékeny a hiszton-gének dózisének megváltozására, jelezvén, hogy az ektopikus inaktivációhoz szükséges PC-komplex bizonyos komponensei képesek interakcióba lépni a magi hisztonokkal, és ez a kölcsönhatás fontos a hatékony epigenetikus represszió létrejöttéhez. A hiszton hiperacetilációt okozó *Su(var)2-1* mutációk és a hiszton-deacetiláz inhibitor hatású Na-butirát korai hatása azt jelzi, hogy a magas szintű hiszton-acetilációs szint nem fér össze az $E(z)^{Trm}$ által okozott ektopikus PC-függő inaktivációval. Az acetilált hisztonok epigenetikus repressziót gátló szerepére független kísérletek is utalnak. Cavalli és Paro kísérletei szerint (1999), ha a fejlődés korai szakaszában az *iab-7* PRE átíródik, a transzgén inszerciós helyén magas szintű hiszton acetiláció jelenik meg, és ez egybeesik azzal, hogy az acetilálódott PRE nem képes a riporter gént inaktívan tartására. Az $E(z)$ fehérjének a hiszton-acetilációval ellentétes szerepét sugallja, hogy *Drosophilában* $E(z)$ -ESC komplexhez kapcsolatosan tisztítható az RPD3 fehérje (Tie és mtsai, 2001), egy olyan hiszton deacetiláz, amelynek *in vivo* is szerepe van az inaktív kromatinszerkezet alakításában (De Rubertis és mtsai, 1996). Kísérleteink alapján azonban a vad és a *Trm* mutáns $E(z)$ -komplex inaktivációs működését egyaránt gátolja a hiszton acetilációs szint emelése, vagyis nem ez az a szignál, amit az általunk izolált mutáns nem képes felismerni.

6.7. A FOSZFORILÁCIÓ SZEREPE AZ AKTÍV KROMATINDOMÉNEK KIJELÖLÉSÉBEN

Az aktív kromatindoméneket molekuláris jelek különböztetik meg az inaktív doménektől (Srahl és mtsai, 1999; Smith és mtsai, 2001; Briggs és mtsai, 2002). Az a molekuláris jel, amelyet az $E(z)^{Trm}$ eltéveszt, többféle lehet. Mivel a hiperacetilációt okozó *Su(var)2-1* mutáció nemcsak heterozigóta, de hemizigóta állapotban is hat a mutáns háttérben bekövetkező epigenetikus represszióra, valószínűtlen, hogy az általunk keresett jel hiszton

fehérjék farki régióinak acetilációja. Ez az eredmény ugyanis azt jelzi, hogy a kizárólag mutáns fehérjét tartalmazó inaktiváló komplexek továbbra is képesek érzékelni a hisztonok acetilációjában bekövetkező változásokat, az $E(z)^{TRM}$ fehérje nem hibás ebben az értelemben, hiszen az ektopikus inaktiváció a hiperacetilált hisztonok jelenlétében gátlódik.

Ezzel ellentétben azt találtuk, hogy homozigóta állapotban az $E(z)^{Trm}$ mutáció fenotípusa nem változik számottevően $Su(var)3-6$ mutációk jelenlétében, vagyis a mutáns fehérje önmagában érzéketlen a PP1-szint változásaira. A vad $E(z)$ fehérje jelenléte esetében azonban (heterozigóta állapotban) a Trm fenotípus erősen szuppresszáható $Su(var)3-6$ mutációk bevezetésével. Ez az eredmény azt jelzi, hogy a vad $E(z)$ fehérje inaktiváló működését az aktív doménben lévő valamely foszforilált fehérje képes gátolni, de ez a hatás a mutáns $E(z)^{TRM}$ fehérjén nem érvényesül.

Ismertek olyan független eredmények, amelyek szerint a foszforiláció fontos szerepet játszik a PC-függő inaktiváció létrejöttében, hiszen az ESC fehérje csak foszforilált állapotban képes kapcsolódni az $E(z)$ -ESC komplexhez. Ez a foszforiláció azonban nem az ektopikus inaktiváció megakadályozásához, hanem a normális ESC-funkció ellátásához szükséges, hiszen a foszforilálható aminosav mutációja *esc* funkcióvesztést okoz (Ng és mtsai, 2000). A mi eredményeink ezzel szemben arra utalnak, hogy a protein foszforiláció az aktív domének megjelölésében is szerepet játszik.

Két elképzelést vettünk fontolóra. Úgy gondoltuk, hogy a feltételezett foszforilált fehérje jelenléte az aktív kromatinon vagy gyengíti az $E(z)$ -fehérje asszociációját, vagy rontja kompetíciós képességét az aktiváló rendszer fehérjével (főképpen a SET-domént tartalmazó ASH1-gyel és TRX-szel). Az $E(z)$ -fehérjékre jellemző 741. arginin kicserélése a TRX fehérjékre jellemző lizinre az $E(z)^{Trm}$ -ben kivédheti a foszforilált fehérje inaktiváció-gátló hatását, ami végső soron a normálisan aktív kromatindomének inaktivációjához, trx-szerű transzformációkhoz vezet.

További kísérleteink arra irányultak, hogy megpróbáljuk azonosítani a kulcsszerepet betöltő foszforilált kromatinfehérjét. Először közvetett genetikai megközelítést alkalmaztunk, és további interakciós kísérleteket végeztünk. Olyan Trm-enhanszer fenotípusú sejtmagi kinázokat kerestünk, amelyek kromatinfehérjéket foszforilálnak. Két sejtmagi kináz gént sikerült azonosítanunk, amelyeknek enhanszer hatása volt a Trm fenotípusra, az *aurora* és a *JIL* kinázt. Mindkét fehérjéről kiderült, hogy képesek a hiszton H3 farok 10. szerinjére (S10) foszfor csoportot kapcsolni (Hsu és mtsai, 2001; Wang és mtsai, 2001). Biokémiai bizonyítékok vannak arra, hogy a PP1 foszfatáz és az AURORA kinázok asszociálódnak a kromatinnal (Murnion és mtsai, 2001). Az is bebizonyosodott, hogy a PP1-típusú fehérjék specifikus gátlása (okadain-sav használata) sejt kultúrában megemelkedett H3 S10 foszforilációhoz vezet (Mahadevan és mtsai, 2000), ami arra utalt, hogy a PP1 szerepet játszik az S10 foszfát eltávolításában. Mindemellett kimutatták, hogy az interfázisos sejtben a kromatin a hiperacetilált (általában transzkripciósan aktív) régiókban foszforilálódik is (Barratt és mtsai, 1994; Cheung és mtsai, 2000; Clayton és mtsai, 2000). Mindezek alapján úgy gondoltuk, lehetséges, hogy az aktív kromatindomének E(Z)-függő inaktivációját a H3 S10 foszforilációja gátolja meg.

Ennek az elképzelésnek a bizonyítására biokémiai kísérleteket végeztünk. Kiderült, hogy a TRX képes közvetlenül kapcsolódni a hiszton oktamerekhez és ez a kapcsolat az N-terminális farkak jelenlétét igényli (Katsani és mtsai, 2001). Megvizsgáltuk, hogy képes-e az E(Z)-fehérje kapcsolódni a H3 N-terminális farki régiójához. Természetesen arra is kíváncsiak voltunk, hogy különbözik-e a kötődés erőssége a vad és a TRM mutáns fehérje esetében, illetve speciális kovalens módosításokat hordozó terminális H3 peptidek alkalmazásakor. Azt találtuk, hogy mindkét fehérje képes kapcsolódni az N-terminális hisztonokhoz, és mindkét fehérje esetében a 9. pozícióban dimetilált peptid kötődése volt a legerősebb. Különbség

mutatkozott azonban az S10-foszforilált peptid kötődésében. Ez a forma sokkal gyengébben asszociálódott a mutáns E(Z)^{TRM}-fehérjével, mint a vad változattal.

6.8. AZ E(Z)^{TRM} FEHÉRJE HISZTON-METIL-TRANSZFERÁZ AKTIVITÁSA

Mivel genetikai interakciós kísérletekben az S-adenozil-metionin bioszintézisben szerepet játszó SU(Z)5 fehérje génjének funkcióvesztéses mutáns allélja a Trm fenotípus erős szuppresszora, alternatív magyarázatok is felmerültek a funkciónyeréses fenotípus magyarázatára. Az S-adenozil-metionin ugyanis kofaktor szerepet játszik a fehérje metilációs folyamatokban. Továbbá egy SET-domént tartalmazó, PEV-szuppresszor hatású kromatin fehérjéről, a SU(VAR)3-9-ről közölték, hogy *in vitro* specifikus H3 K9 metilációra képes (Rea és mtsai, 2000). A SU(VAR)3-9 hiszton-metil-transzferáz aktivitásának közelebbi vizsgálata bebizonyította, hogy a fehérje SET-doménjének két régiója felelős a speciális aktivitás létrejöttéért (6.3. ábra).

(Hs)SUV39H1	VYTVDAAYYGNISHFVNHSCDPNLQVYNVFI..LPRIAFFATRTIRAGE..ELTFDYNMQVDPVDME
(Mm)Suv39h1	VYTVDAAYYGNISHFVNHSCDPNLQVYNVFI..LPRIAFFATRTIWAGE..ELTFDYNMQVDPVDME
(Mm)Suv39h2	EFTVDAAYYGNVSHFVNHSCDPNLQVFSVFI..LPRIALFSTRITINAGE..ELTFDYQMKGSGEASS
(Dm)SU(VAR)3-9	EYTTIDAANYGNISHFINHSCDPNLAVFPCWI..LPHLWFFTLRPIKAGE..ELSFDYIRADNEDVP
(Dm) E(Z)	DFVVDATRKGNKIRFANHNVNPNKYAKVMMV..DHRIGIFAKRAIQTGE..ELFVDYRYSQA.DAL-
(Hs) E(Z)H2	DFVVDATRKGNKIRFANHNVNPNKYAKVMMV..DHRIGIFAKRAIQTGE..ELFFDYRYSQA.DAL-
(Hs) HRXEV	EV.VDATMHGNRARFINHSCPNCSRVINI..QKHIVIFAMRKIYRGE..ELTYDYKFPPIE.DASN

6.3. ábra A *Drosophila* SU(VAR) E(Z) és TRX SET-doméneknek a hiszton-metil-transzferáz aktivitás létrehozásában szerepet játszó régióinak összehasonlítása
Az ábrán a különböző funkciójú fehérjékben megjelenő konzervált doméneket azonos színnel tüntettük fel. A katalitikus aktivitásban szerepet játszó aminosavakat zölddel, az asszociációhoz szükséges második szubdomént kékkel tüntettük fel.

Az egyik régió (SH-NHS) a metil-transzfert katalizáló aktív centrum felépítésében vesz részt, míg a másik (a GEEL-FDY) motívum nem vesz részt közvetlenül a katalízis folyamatában, de a régiót érintő mutációk a specifikus hiszton-metil-transzferáz aktivitás elvesztéséhez vezetnek (Rea és mtsai, 2000). Mindezek alapján a GEEL-FDY régiót a

szubsztrátfelismerés és a szubsztráthoz való kötődés folyamatáért teszik felelőssé. Az $E(z)$ génben az első konzervált régió kismértékben különbözött a $SU(VAR)3-9$ -től, az általunk vizsgált allélban pedig a második konzervált régió tirozinja után következő arginin cserélődött lizinre, ami azt a hipotézist vetette fel, hogy esetünkben is a specifikus hiszton-metil-transzferáz aktivitásban állt be változás. Habár Rea és munkatársai (2000) közölték, hogy kísérleteik szerint a teljes hosszúságú $E(z)$ -fehérje nem rendelkezik hiszton-metil-transzferáz aktivitással, mi kipróbáltuk, hogy rendelkezik-e egy preSET-SET domént tartalmazó C-terminális $E(z)$ fehérje-darab ilyen aktivitással. Sikertelenül kimutatnunk, hogy mind a vad, mind a TRM mutáns C-terminális fragment aktív hiszton-metil-transzferáz. Bebizonyítottuk, hogy az aktivitás specifikus a hiszton H3 9. lizin (K9) aminosavára, és az említett pozíció trimetilációját is képes katalizálni. A metil-transzferáz kísérletek bizonyos mértékig magyarázzák a dimetilált K9 hiszton farokhoz való kiemelkedően erős kötődést, hiszen ez a forma az $E(z)$ -fehérje szubsztrátjának tekinthető. Azt is sikerült kimutatnunk, hogy az S10 foszforilált peptid nemcsak gyengén kötődik az általunk vizsgált $E(z)$ -fehérjéhez, de csaknem tízszer kevésbé metilálható *in vitro* rendszerben. A hiszton oktamer szubsztráton a vizsgált enzimek hasonló aktivitást mutattak, míg a peptid szubsztrátok alkalmazásakor az $E(z)^{TRM}$ fehérje gyengébb aktivitással rendelkezett. Megállapítható volt azonban, hogy a mutáns fehérje aktivitása a dimetilált K9 trimetilálttá alakításában viszonylag jobb. Tehát sikerült ugyan bebizonyítanunk, hogy a mutáns fehérje rendelkezik a vadhoz hasonló mértékű hiszton-metil-transzferáz aktivitással, és kisebb eltéréseket is találtunk a különböző peptidszubsztrátok vizsgálatakor, nem sikerült közvetlen funkcionyerést kimutatnunk a S10-P peptid alkalmazásával, azaz belátnunk, hogy a mutáns $E(z)^{TRM}$ aktívabb metil-transzferáz a foszforilált szubsztráton.

6.9. AZ E(Z) FEHÉRJE SZEREPE ÉS MŰKÖDÉSE A KROMATINDOMÉNEK FELISMERÉSÉBEN ÉS INAKTIVÁCIÓJÁBAN

Kísérleteink alapján a következő kép rajzolódik ki az E(Z) fehérje működéséről. Az E(Z) fehérjét tartalmazó komplexben a fehérje homomultimer formában van jelen, és képes felismerni az aktív kromatindoménokban lévő hisztonok acetilációját, ami a továbbiakban az inaktiváló működést gátolja. Szintén gátló hatással van az inaktiváló működésre a H3 hiszton foszforilációja, amelynek érzékelésében fontos szerepet tölt be a SET-domén C-terminális szakaszán elhelyezkedő 741. arginin aminosav. Az E(Z) fehérje képes kötődni a nukleosómális hisztonok N-terminális farki régiójához és a 9. lizin aminosavat trimetilálni. Az általunk vizsgált *in vitro* rendszerben nem zárható ki, hogy az aktivitás feltétele egy 55 KDa méretű fehérje asszociációja. A tisztított E(Z) komplexek (Müller és mtsai, 2002; Czermin és mtsai, 2002; Kuzmichev és mtsai, 2002) és az általunk használt csonkolt fehérjék metiltranszferáz aktivitása egyaránt alacsony, mindössze néhány peptid szubsztrát metilálódik óránként. Mivel a 9. lizinen metilálódott H3 farokhoz erősebben képes kötődni az E(Z) fehérje, véleményünk szerint a hiszton kód kialakítása és leolvasása tekintetében az E(Z) szerepe kettős. Egyrészt kis sebességgel, de képes a H3 9. lizinjét trimetilálni, ezáltal egy irreverzibilis, vagy legalábbis a jelenleg ismert kovalens módosítások közül a leghosszabb féléletidejű molekuláris jelet létrehozni, másrészt képes erősen kötődni a már létrehozott metilált lizinhez, ezáltal leolvasni a kódot és inaktivációt indukálni. Mind a speciális hiszton metiláció, mind a kötődés valószínűleg előfeltétele a fehérje helyes inaktivációs működésének. Az E(Z) fehérje által létrehozott metiláció és a komplex kötődése a metilált régiókhoz megteremti az E(Z)-komplexhez asszociált hiszton-deacetiláz aktivitás bekapcsolódásának előfeltételeit. Az elsődlegesen kialakult E(Z)-függő inaktiváció pedig bizonyos idő elteltével kapcsolódhat és stabilizálódhat a PRC1-kompleksszel, vagy átadhatja annak a helyét.

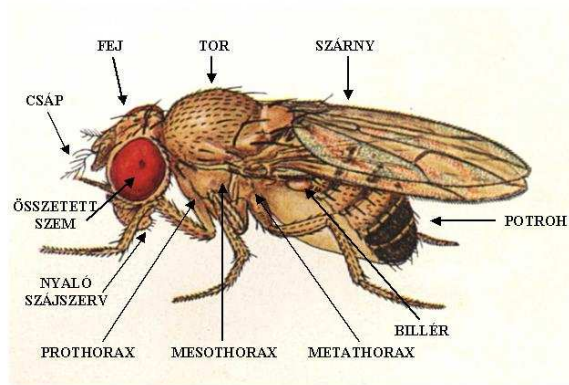
Az E(Z)-függő inaktiváció speciális kromatin szakaszokon történik. Szükséges hozzá a PRE régió jelenléte és valószínűleg speciális DNS-kötő fehérjék, elsősorban a PHO működése. Az E(Z) fehérjét valószínűleg az N-terminálison asszociálódó ESC és PCL fehérjék irányítják a PRE-hoz.

Az E(Z)^{TRM}-függő inaktiváció csak a PRE és TRE szakaszok együttes jelenlétében jön létre, ami arra utal, hogy a TRE régiókon közvetlen kompetíció zajlik a SET-domént tartalmazó aktiváló és inaktiváló kromatinfehérjék között. A kompetíció egyrészt a közös szubsztráton az N-terminális hiszton farkon érvényesülhet, amelyet az aktiváló szerepű (ASH1) és az inaktiváló hatású [E(Z)] fehérjék különböző mintázatban metilálnak, és ezáltal eltérő értelmű epigenetikus jelet eredményeznek. Másrészt maguknak a SET-domén tartalmú fehérjéknek a már átalakított szubsztráthoz való kötődése kompetíciós hatással bírhat. Az ASH1 és a TRX fehérje *in vivo* asszociációja a SET-doménen keresztül és az általunk kimutatott E(Z)-TRX és E(Z)-ASH1 SET-domén interakciók felvetik a közvetlen SET-domén kompetíció lehetőségét is.

7. FÜGGELÉK

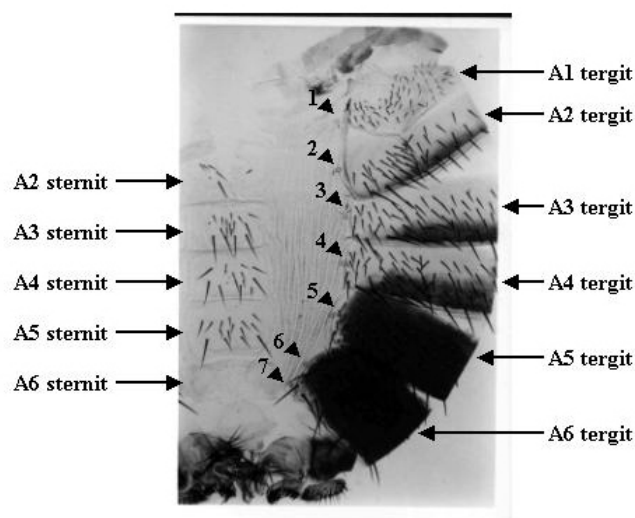
7.1. A *DROSOPHILA MELANOGASTER* MORFOLÓGIÁJA

A *Drosophila melanogaster* az Ízeltlábúak (*Artropoda*) törzsébe, a Rovarok (*Insecta*) osztályába, a Színrovarok (*Holomerentoma*) alosztályába, a Felsőrendű rovarok (*Pterygota*) csapatába, a Kétszárnyúak (*Diptera*) rendjébe tartozik. Ennek megfelelően kitinnel borított teste ízekből épül fel, és három fő testtájra: fejre (*caput*), torra (*thorax*) és potrohra (*abdomen*) tagolódik, légcsövekkel (*tracheák*) lélegzik. A rovarokra általában jellemző hat fejszelvényből az első három (*procephalon*) még az embrionális fejlődés során sem különül el, és a második három (*gnathocephalon*) is csak az embrionális fejlődés korai szakaszában válik el, a kifejlett állatban a fejszelvények összeolvadnak, a fejtájsz megalkotásán túl egy pár csáp, két hatalmas összetett szem és három pontszem, valamint nyáló szájszervet alakítanak ki. A torzszelvények a fejlődés minden szakaszában jól elkülöníthetők és megkülönböztethetők. Az előtor (*prothorax*), a középtor (*mesothorax*) és az utótor (*metathorax*) egyaránt egy pár lábat visel, melyek morfológiája mindhárom szelvényben különbözik, és a rend több mint százezer más fajához hasonlóan, csak a középtori szelvényen vannak szárnyak. Az utótori szelvény szárny-módosulatként egy pár kis méretű egyensúlyozó struktúrát, úgynevezett billért, vagy rezgettyűt (*haltera*) hordoz (7.1. ábra). Az abdomenről megállapítható, hogy csak az első nyolc szelvény vesz részt kialakításában, a további szelvények párzó-, illetve ivarszervekké alakultak. Az abdominális szelvények jól elkülöníthetők, azok mindegyike kismértékben eltérő morfológiájú (7.2. ábra). Egy nagyobb szklerotizálódott háti tergitlemezből, a hasi oldalt borító puhább kutikularészből (*pleura*), a tracheák kivezető nyílásából, valamint a hasi oldal közepén található megszilárdult kutikuladarabból, az úgynevezett sternitlemezből áll az abdominális szelvény kültakarója muslicában.



7.1. ábra A *Drosophila melanogaster* testfelépítése
A nyilak a megfelelő testtájra mutatnak.

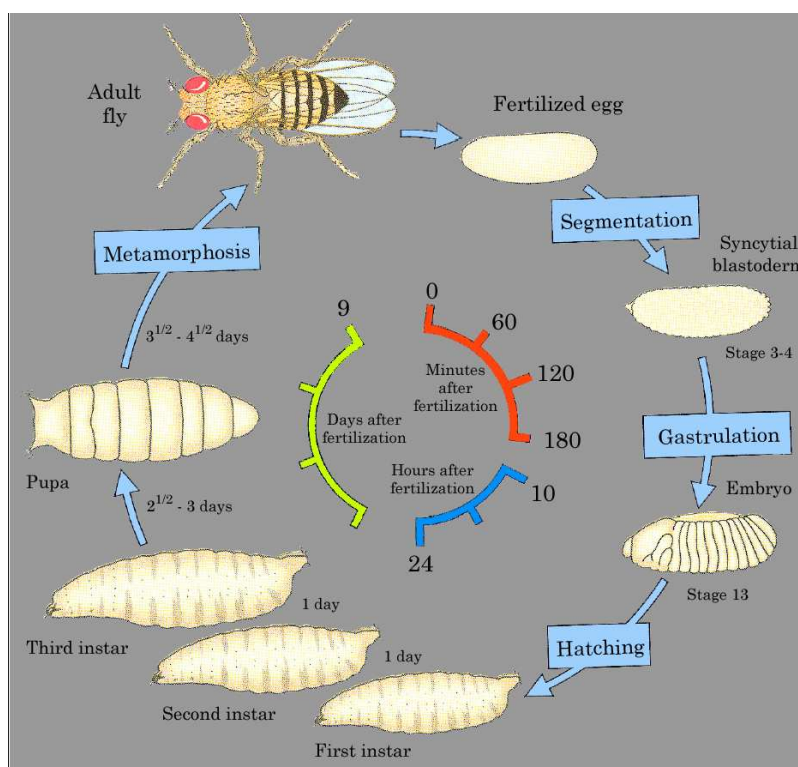
Az abdominális szelvények színének, formájának és az őket borító *micro-* és *macrochaete* elhelyezkedésének különbsége tesz minden szelvényt egyedivé. Az abdomen ivari-dimorfizmust mutat, a nőstényeknél hét, a hímeknél hat látható tergitlemezből áll. Különösen feltűnő, hogy a hímek ötödik és hatodik abdominális szelvénye (A5, A6) teljesen sötét, és a hatodik sternitlemez az öt megelőzőekkel ellentétben nem visel szőröket. A hetedik abdominális szelvény *Drosophila* hímekben nem fejleszt tergít-, illetve sternitlemezt, helyét csak egy hetedik pár tracheanyílás jelzi.



7.2. ábra A *Drosophila melanogaster* hasi szelvényeit bemutató kutikula preparátum
A nyilak a jelzett szelvények háttlemezére (tergít), illetve haslemezére (sternit) mutatnak.

7.2. A *DROSOPHILA MELANOGASTER* EGYEDFEJLŐDÉSE ÉS ÉLETCIKLUSA.

A *Drosophila melanogaster* teljes átalakulással fejlődik (7.3. ábra). A muslica petékből kikelő lárvákból, bebábozódásuk után egy teljesen más testszerveződésű és formájú imágó kel ki. A lerakott peték 25°C-on 22 óra alatt kelnek ki. A kikelő apró, első stádiumos lárvák folyamatosan táplálkoznak, és újabb egy nap elteltével megvedlenek, második stádiumú lárvává alakulnak át. További egy nap táplálkozás után a lárvák, egy újabb vedlést követően harmadik stádiumú lárvává alakulnak. A negyedik napon a kifejlett, közel ötmilliméteres harmadik stádiumú lárvák vándorolni kezdenek, majd bebábozódnak. A lárva bőre kemény bábbórré változik, a mozdulatlan lárvá újra megvedlik, majd hormonális stimulusok hatására lárvális szöveteinek nagy része feloldódik. A báb belsejében további öt teljes napot vesz igénybe az imágó kifejlődése.



7.3. ábra A *Drosophila melanogaster* egyedfejlődése

Az egyes stádiumokról készült rajzok nem méretarányosak. Az egyes stádiumok hosszúságát az embrionális fejlődés alatt órákban, míg a lárvális fejlődésre vonatkozó időtartamokat napokban tünteti fel a rajz. Az adatok 25°C-ra vonatkoznak (S. Barges nyomán).

Eközben a lárva teste bonyolult átrendeződésen megy keresztül, a politén lárvális szövetek helyét az imaginális szervkezdemenyekből kialakuló diploid szövetek foglalják el. A kifejlett imágó kutikulája részben a lárvában található imágókorongokból (imaginális diszkuszokból), részben a potrohi szövetképző őssejtekből (abdominális hisztoblasztokból) alakul ki. A kifejlett legyek (pharat adult) a bábbórt homlokhólyagjuk (ptilinum) segítségével repesztik fel (a *Drosophila melanogaster* a Kerek bábrésűek, Cyclorrapha osztágába tartozik). A kikelő állatok néhány óra elteltével megszáradnak, szárnylemezeik szétterülnek, kutikulájuk megkeményedik, és átlátszatlaná válik, emésztőtraktusukból a névadó fekete színű *meconium* eltűnik, és fertilissé válnak. A nőstények már kikelésük napján képesek petéket rakni, a teljes generációs idő tehát mindössze tíz nap.

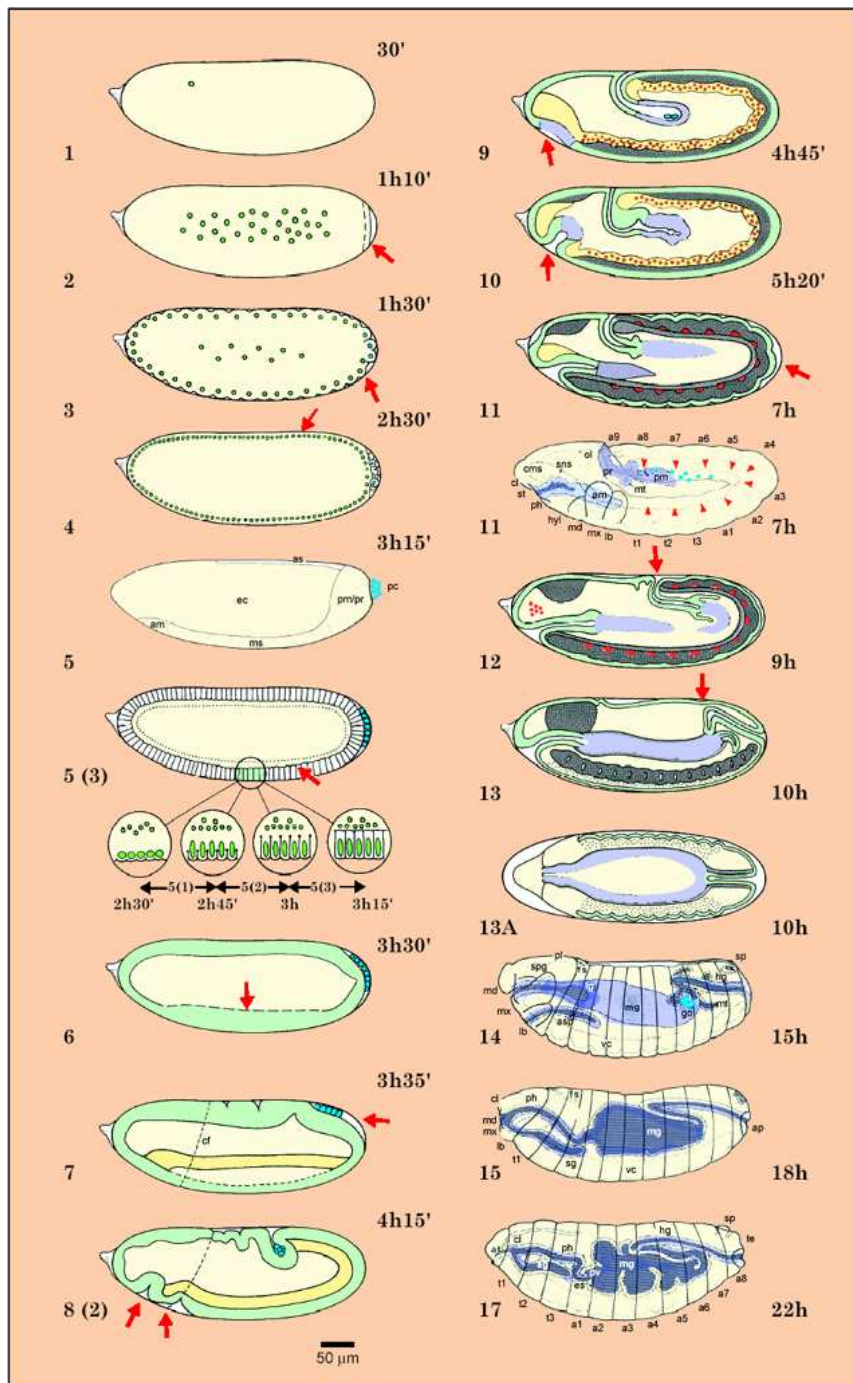
7.3. A *DROSOPHILA MELANOGASTER* KORAI EGYEDFEJLŐDÉSE ÉS AZ AZT SZABÁLYOZÓ FAKTOROK

A *Drosophila melanogaster* embrionális fejlődésének kezdetén csak a sejtmagok osztódnak, az eukarióta szervezetek közt egyedülállóan nagy sebességgel, mindössze tízperces ciklusidővel. A nyolcadik osztódási ciklust követően a keletkezett sejtmagok a periféria felé kezdenek vándorolni. Először az embrió hátulsó részén elhelyezkedő, mikroszkóposan jól elkülönülő, erős fénytörést mutató állományon, az úgynevezett poláris plazmán áthaladó sejtmagok, az ősvarsejtek prekursorai érik el a fejlődő embrió felszínét a nyolcadik-kilencedik osztódási ciklusra, majd ezek a sejtmagok is fűződnek le először önálló sejtekké (7.5. ábra 4). A 12. ciklus idejére a sejtek többsége is eléri a felszínt, és a 13. ciklusban elkezdődik körülöttük a későbbi elválasztó szeptumok kialakulása, ezzel véget ér az egyedfejlődés első szakasza: a *syncytialis blastoderma* fázis. A magokat körülvevő sejthártyák kialakulása a celluláris blasztoderma (sejtes hólyagcsíra) állapot és a barázdálódás kezdetét jelzi (7.5. ábra 5).

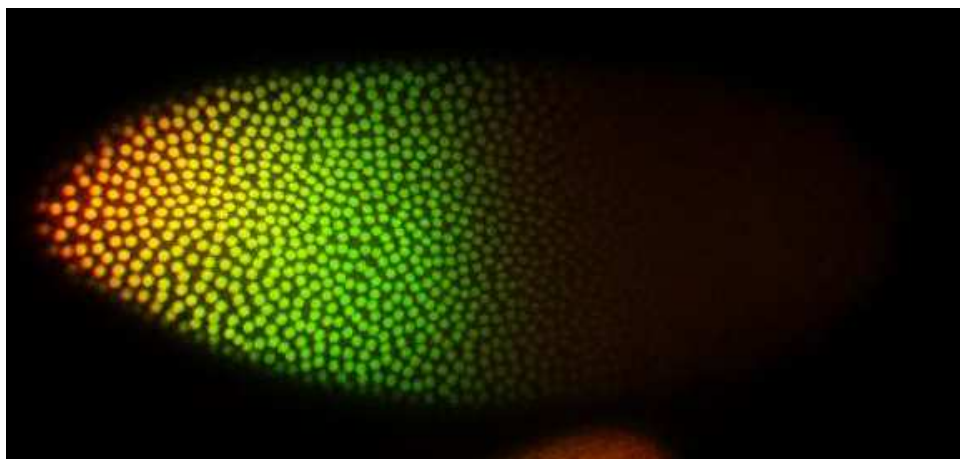
7.5. ábra Az embrionális fejlődés stádiumai

A *Drosophila melanogaster* egyedfejlődését bizonyos könnyen észrevehető morfológiai jelek alapján stádiumokra osztották. A képen az egyes stádiumokra jellemző rajzok mellett a 22°C-on a stádium eléréséhez szükséges időt tüntették fel (S. Barges nyomán).

Ekkorra kapcsol be a zigotikus transzkripció is a szomatikus sejtekben, míg az ősvarsejtek osztódásukat és transzkripciójukat ekkor függesztik fel. A korai gyors magosztódások során ugyanis a magok transzkripcionálisan inkompetensek, osztódásuk a dajkasejtek által a petesejtbe pumpált fehérjék és más faktorok segítségével valósul meg. A dajkasejtek és folliculáris sejtek azonban nem egyszerűen csak a



kezdeti magosztódások feltételeit teremtik meg, nemcsak tápanyaggal és energiával töltik fel, támasztják és védik a petesejtet, de működésük eredményeképp a petesejtbe jutnak és speciálisan lokalizálódnak olyan RNS molekulák is, amelyekből a petesejtben elülső-hátulsó, illetve hasi-háti koncentrációgradienst alkotó fehérjék képződnek.



7.6. ábra A BICOID fehérje (piros) és a maternális HUNCHBACK fehérje (zöld) előlről hátra csökkenő koncentrációgrádiense

Az anyai eredetű fehérjék transzkripció, illetve transzlációs regulátorok, melyek a testtengelyek mentén morfogénekként befolyásolják az embrió fejlődését. Koncentrációfüggő módon képesek bizonyos zigotikus, testfelépítést szabályozó mestergének aktivációjára illetve gátlására, ezáltal az embrió alapvető polaritási viszonyainak meghatározására, már a *syncytialis blastoderma*-ban, még a zigotikus génműködés beindulása előtt. A *Drosophilában* négy fő, elsődlegesen anyai eredetű rendszert ismerünk, amely meghatározza a fejlődő embrió testszerveződését:

A BICOID és HUNCHBACK gradiens együtt indítja el az egyéb *gap* gének kifejeződésének beállítását. Így az embrió középső részén kialakuló *Krüppel* expressziót a BICOID fehérje és a HUNCHBACK fehérje alacsony koncentrációja aktiválja, míg a magas HUNCHBACK koncentráció gátolja. A *kni* és *gi* expresszió szintén gátlódik magas HUNCHBACK fehérje koncentrációnál, de a két promóter érzékenysége különböző, valamint a *gi* magas BICOID koncentrációval is aktiválható. A *knirps* domén hátulsó határát a *tailles* gátló hatása alakítja ki. A rendkívül rövid (néhány perces) féléletidejű *gap*-gén fehérjék élesen elváló végső expressziós mintázata, mely a korai embriót testtájakra bontja (7.7. ábra), ezek szerint bonyolult transzkripció keresztiszabályozás eredményeképp alakul ki.

A *szegment polaritási* gének a fejlődő embrióban a *pair-rule* gének szabályozása alatt állnak és 14 hosszanti csíkban fejeződnek ki. Míg a *syncytialis* környezetben akadálytalanul diffundáló és gradienseket alkotó *gap*-, és *pair-rule* gének nagyrészt transzkripciós faktorok, addig a cellularizálódott embrióban működő *szegment polaritási* géneknek csak a kifejeződési mintázatuk szimmetriája közös, funkciójukat tekintve sokfélék.

A *pair-rule* gének mindig hét, de egymáshoz képest elcsúsztatott hosszanti csíkban jelennek meg a fejlődő embrióban a cellularizáció megtörténte előtt (7.8. ábra). Bizonyos *pair-rule* gének a páratlan (pl.: *even-skipped*), míg mások a páros számú paraszegmentekben expresszálódnak (pl.: *fushi tarazu*). Egymással nem átfedő expressziójuk átlépheti a későbbi szegmenthatárokat. Mutációjuk esetében korai kifejeződési mintázatuknak megfelelően minden második szelvényben okoznak mutáns fenotípust. A hét élesen elváló csíkból álló karakterisztikus expressziós mintázatuk fokozatosan alakul ki. Az *even-skipped* gén például kezdetben alacsony szinten minden magban kifejeződik, majd először egy elmosódó, a későbbi páratlan szegmentek elülső részén megjelenő hétsávós mintázat alakul ki, majd a többi *pair-rule* gén csík megjelenésével párhuzamosan az expresszió megerősödik, és élesen körülhatárolódik. A hétsávós mintázat létrejöttét a *pair-rule* gének esetében igen bonyolult 5' szabályozó régiók biztosítják, melyek lehetővé teszik az egyes expressziós sávok független, és különböző módon realizálódó kontrollját. Az elsődleges *pair-rule*-gének egy adott expressziós csíkot szabályozó enhanszer elemei a szabályozó maternális és *gap*-gén faktorok különböző affinitású kötőhelyeit tartalmazzák. Ezek aktivátorként, illetve represszorként hatnak, és az embrió egy adott régiójában lévő együttes koncentrációjuk fordítódik le az adott *pair-rule* gén adott ponton kialakuló expressziójára.

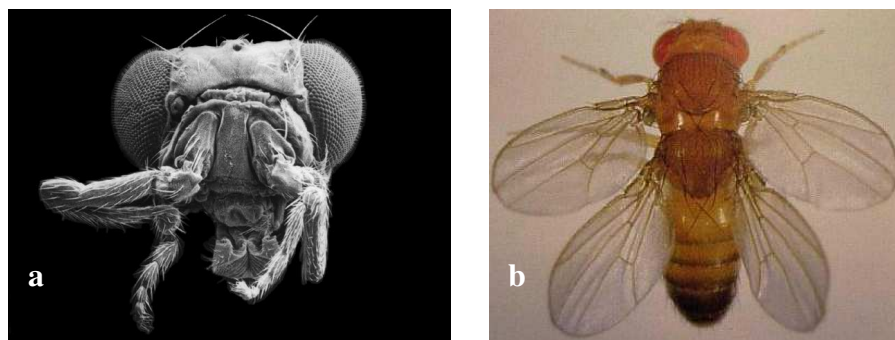
A másodlagos *pair-rule* gének expresszióját az elsődleges *pair-rule* gének is szabályozzák. A *pair-rule* gének definiálják mind a 14 PS anterior határát, de akárcsak a *gap*-gének esetében expressziójuk csak nagyon rövid ideig mutatható ki. A közben cellularizálódó

embrióban a paraszegment határok meghatározása és rögzítése már a *szegment polaritási* gének feladata.

Az egyik legfontosabb szegment polaritási gén az *engrailed*. A páratlan paraszegmentekben az *even-skipped*, a párosakban a *fushi tarazu* gén aktiválja, és a paraszegmentek anterior határán fejeződik ki, 14 körülbelül három sejtsor széles sávban. Sejtvonal leszármazási vizsgálatok bebizonyították, hogy az *engrailed* gén szelektor génnek tekinthető abban az értelemben, hogy a fejlődés során megőrzött expressziója képes a paraszegmenteket olyan módon véglegesen definiálni, hogy az expressziója által meghatározott kompartmentben (PS-ben) lévő sejtek és utódaik mindvégig azonos genetikai kontroll alatt maradnak, sorsuk determinálódik és a további fejlődés folyamán sohasem lépnek át más kompartmentbe. Az előzőekben kifejtett paraszegment-szegment tranzíció következményeképp azonban a továbbiakban az *engrailed* a szelvények poszterior kompartmentjének meghatározásáért lesz felelős. Az *engrailed* expresszió fenntartását többlépcsős folyamat biztosítja. Az *engrailed* expresszáló sejtekben termelődik egy szekretált protein, a HEDGEHOG is, amely a *patched* gén által kódolt receptoron keresztül aktiválja a paraszegment határ másik oldalán a szintén szekrécióra kerülő glikoprotein, a WINGLESS expresszióját, amely viszont pozitívan hat vissza az *engrailed* és *hedgehog* expresszióra, és azt a kifejeződés eredeti helyén fenntartja. Az *engrailed* gén ektopikus kifejeződését az eredetileg *engrailed*-et nem expresszáló sejtek leszármazottaiban pedig a POLYCOMB-csoport fehérjéi gátolják meg (Moazed és O'Farrel, 1992).

A már cellularizálódott embrióban tehát a *szegment-polaritási* gének periodikusan ismétlődő mintázata kijelöli a szegmentnyi egységeket, de a különböző szegmentek egyedi fejlődési programját, az egyes szelvények elkülönült morfológiájának kialakulását, az adott szelvények eltérő fizikai képleteinek megfelelő kifejlődését már a homeotikus szelektor gének vezérlik (Garcia-Bellido, 1977). A homeotikus gének működésének megzavarása homeotikus

transzformációhoz vezet, olyan változásokhoz, amelyeknek során egy adott testtáj, testrész, vagy testszelvény egy másik testszelvényre jellemző tulajdonságokra tesz szert (7.7. ábra).



7.7. ábra Jellegzetes homeotikus transzformációk *Drosophila*-ban

a.) Antennapedia fenotípus, azaz a csápok (antennák) helyett lábak nőnek az állat fején. b.) a harmadik torszelvényen lévő billérek szárnyrá transzformálódása (E. Lewis és W. Bender nyomán).

A homeotikus gének két génkomplexet alkotnak a muslicában. A génkomplexek általában olyan rendkívül szorosan kapcsolt génekből állnak, amelyekről hasonló funkciót feltételeznek. Az egyik homeotikus-komplex, az *Antennapedia*-komplex (ANT-C) a harmadik kromoszóma 84B régiójában található, és működésének eredményeképpen alakulnak ki az elülső testtájak (PS1-4) (Kaufman és mtsai, 1980, 1990). A középtortól hátrébb elhelyezkedő szelvények (PS5-14) megfelelő kialakításáért a 89E2-5 régióban található *bithorax*-komplex (BX-C) felelős (Lewis, 1978; Duncan, 1987). Az anália kialakulását a maternálisan is szükséges, komplexen kívüli homeotikus gén, a *caudal* (*cad*) biztosítja (Mlodzik és mtsai, 1990).

7.4. A HOMEOTIKUS GÉNKOMPLEXEK FELÉPÍTÉSE ÉS MŰKÖDÉSI MÓDJA

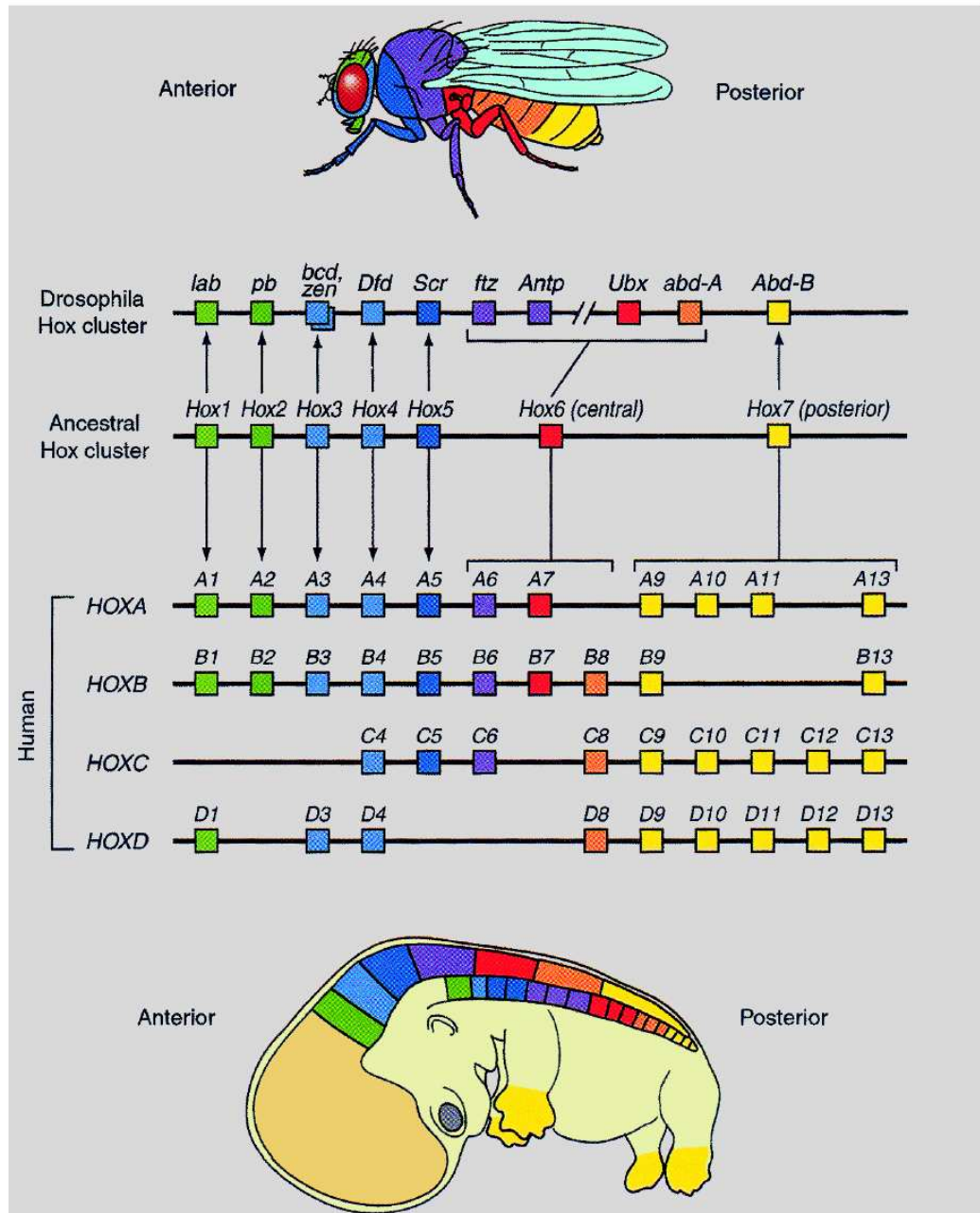
Az *Antennapedia*-komplex (ANT-C) öt homeotikus szelektorgént kódol, amelyek (a kromoszómán proximo-disztális irányban nézve) a következők: *labial* (*lab*), *Deformed* (*Dfd*), *proboscipedia* (*pb*), *Sex combs reduced* (*Scr*) és az *Antennapedia* (*Antp*) (Kaufman és mtsai, 1990). A *bithorax*-komplex (BX-C) három homeotikus gént kódol, melyek, szintén proximo-disztális sorrendben a következők: *Ultrabithorax* (*Ubx*), *abdominal-A* (*abd-A*) és *Abdominal-B* (*Abd-B*). A homeotikus géneket a *Drosophila melanogaster*-ben ismerték meg először (McGinnis és mtsai, 1984a), és később a homeotikus gének homológjait minden vizsgált

többsejtű állatban megtalálták, sőt a megismert komplexekben a homológok sorrendje (7.8. ábra) is megegyezik az ecetmuslicában meghatározottal (Boncinelli és mtsai, 1991). A komplexeken kívüli homeodomén (HD) tartalmú fehérjék is általában az élőlények testfejlődésének bizonyos aspektusait szabályozzák (Manak és Scott, 1994).

A homeotikus gének valamennyien egy konzervált 60 aminosav hosszú DNS-kötő motívumot, a homeoboxot tartalmazó transzkripciós regulátor fehérjét kódolnak (McGinnis és mtsai, 1984/b). Kifejeződési mintázatuk és koncentrációjuk determinálja az egyes szelvények morfológiáját, de nem közvetlenül, hanem mestergénekként, számtalan más gén szintjét szabályozva hozzák létre az egyes szelvények egyedi jellegzetességeit. Az a megfigyelés, hogy a komplexen belül az egyes homeotikus gének sorrendje a kromoszómán megegyezik a kifejeződésük térbeli sorrendjével a térbeli kolinearitás szabálya. A legtöbb élőlényben érvényes az időbeli kolinearitás szabálya is, azaz a proximálisan kódolt és kifejeződő gének időben is hamarabb, azaz a fejlődésnek egy korábbi szakaszában kezdenek el kifejeződni. Az ecetmuslica kivétel ez alól a szabály alól, mert rendkívül gyors fejlődésének köszönhetően a homeotikus gének, az egyedfejlődés korai szakaszában, csaknem egy időben kezdenek el kifejeződni.

A homeotikus génkomplexek erősen konzerváltak. A 180 bázispár hosszúságú homeodomént minden vizsgált többsejtű állat genomjában megtalálták (McGinnis és Krumlauf, 1992; Kenyon 1994). A különböző fajok közti hasonlóság a génkomplexek alapvető felépítésében és szabályozásában arra utal, hogy ezek a komplexek valamennyien egy ősi gén többszörös duplikációjával, majd a keletkezett kópiák lassú divergálódásával, illetve esetleges elvesztésével alakultak ki. Ezt követhette egész komplexek duplikációja, vagy feldarabolódása. Így jöhetett létre a *Caenorhabditis* négy génből álló komplexe, a *Drosophila melanogaster* két részre szakadt, összesen nyolc génből álló komplexe, illetve az ember összesen 39 gént tartalmazó négy homeotikus génkomplexe (Carroll, 1995). Ám továbbra is

igaz marad az a szabály, hogy a homeotikus gének elhelyezkedésének sorrendje a kromoszómán mindig megegyezik az általuk szabályozott szelvények sorrendjével (7.8. ábra) az elülső-hátulsó testtengely, vagy a végtagok proximo-disztális tengelye mentén (Graham és mtsai, 1989).



7.8. ábra A homeotikus génkomplexek konzervált szerkezete

A képen középen a feltételezett ősi génkomplexet tüntették fel (Ancestral), míg felül a *Drosophila* két génkomplexe, alul a négy emberi komplex van feltüntetve (Wolpert: Principles of development nyomán).

A rendkívül konzervált homeodomént (HD) tartalmazó proteinek regulátor kapacitása erősen eltérő lehet. A különböző kötési specificitást részben a homeodomén helix-turn-helix DNS-kötő hélixén belül az 50. glutaminsav megléte vagy hiánya (Biggin és McGinnis, 1997), illetve a HD turn régióinak variabilitása okozza (Gehring és mtsai, 1994). Szerepet játszhat még a HD közvetlen szomszédságában elhelyezkedő aminosavak kémiai tulajdonságai, illetve különböző heterodimerek kialakulása (Wolberger, 1996). A homeotikus gének által regulált célgénekről és a realizátor génekről (melyek valójában létrehozzák az egyedi szelvénymorfológiát) még viszonylag keveset tudunk (Pradel és White 1998). Az egyik legjobban jellemzett homeotikus célgén, a transzkripció regulációra képes TGF- β homológ *decapentaplegic (dpp)*, mely kulcsszerepet tölt be, például a középbél morfogenezisében. Az *Ubx* közvetlenül képes aktiválni a *dpp*-t a PS5-PS7 régióban, míg a PS8-12-ben az *abd-A* expresszió a *dpp* kifejeződését megakadályozza (Hursh és mtsai, 1993; Capovilla és mtsai, 1994; Manak és mtsai, 1994).

A homeotikus gének egyéb célgénjeiken kívül egymást és önmagukat is szabályozzák (Hafen és mtsai, 1998; Struhl és White 1985). A *Dfd* pozitív autoregulációja hozzájárul kifejeződésének fenntartásához (Kuziora és McGinnis, 1988). Általában a hátrébb expresszáldó homeotikus gének gátolják az előrébb kifejeződő homeotikus gének transzkripcióját. Az ANTP például represszálja az *Scr*-t, az UBX az *Antp*-t, míg az ABD-B nagy koncentrációban gátolja az *Ubx* és az *abd-A* transzkripcióját (White és Wilcox, 1985; Struhl és White, 1985; Karch és mtsai, 1990). Érdekeség azonban, hogy míg ha egy homeotikus gén a rá jellemző expressziós territóriumnál előrébb kifejeződik, az homeotikus transzformációkhoz vezet, addig a normál expressziós területnél hátrábbi kifejeződés általában nem jár fenotipikus következményekkel. (Gonzales-Reyes és Morata, 1990; Mann és Hogness, 1990). Ezek szerint a hátrébb megjelenő homeotikus géntermékeknek van fontosabb szerepe a szelvényidentitás kialakításában, ez az általános tendencia poszterior prevalencia

szabálya (review: Duboule és Morata, 1994). Muslicában azonban akadnak kivételek a poszterior dominancia jelensége alól. A *Dfd*, illetve az *Scr* ektopikus expressziója a hátulsó torszelvekben homeotikus transzformációkkal jár, bár a sokkal hátrábbi abdominális szelveket már valóban nem képes transzformálni (Kuziora és McGinnis 1988).

Az ENHANCER OF ZESTE fehérje aminosav szekvenciája

MNSTKVPPEW KRRVKSEYIK IRQQKRYKRA DEIKEAWIRN WDEHNNHVQD LYCESKVVQA
*E (Z)*⁶³ 60
 MET-ILE
 KPYDPPHVDC VKRAEVTSYN GIPSGPQKVP ICVINAVTPI PTMYTWAPTQ QNFMVEDETV 120
 LHNIPYMGDE VLDKDGKFIE ELIKNYDGKV HGDKDPSEMD DAIFVELVHA LMRSYSKELE 180
 EAAPSTSTAI KTEPLAKSKQ GEDDGVVDVD ADCESPMKLE KTESKGLTD VEKKETEEPV 240
 ETEDADVKA VEEVKDKLPF PAPIIFQAIS ANFPDKGTAQ ELKEYIELT EHQDPERPQE 300
 CTPNIDGIKA ESVSRETRTMH SFHTLFCRRC FKYDCFLHRL QGHAGPNLQK RRYPELKPF 360
 EP**C**NSNSCYML IDGMKEKLAA DSKTPPIDSC NEASSEDSND SNSQFSNKDF NHENSKDNGL
*E (Z)*²⁸ 420
 CYS-TYR
 TVNSAAVAEI NSIMAGMMNI TSTQCVWTGA DQALYRVLHK VYLKNYCAIA HNMLTKTCRQ 480
 VYEFAQKEDA EFSFEDLRQD FTPPRKKKKK QRLWSLHCRK IQLKKDSSSN HVYNYTPCDH 540
 ▲
*E (Z)*⁶⁰ HOBO
 PGHP**C**DMNCS CIQTQNFCEK FCNCSSDCQN RFP**G**CRCKAQ CNTKQCPCYL AVRECDPDLC 600
*E (Z)*³² *E (Z)*^{SON2}
 CYS-TYR PRO-LEU
 QAC**G**ADQFKL TKITCKNVCV QRLGHKLLM APSD**I**AGWGI FLKEGAQKNE FISE**Y**CGEII 660
*E (Z)*⁶¹ *E (Z)*^{SON3} *E (Z)*¹
 CYS-TYR ILE-ASN TYR-ASN
 SQDEADRRGK VYDKYMC**S**FL **F**NLNNDVVD ATRKGNKIRF ANHSINPCY AKVMMVTGDH 720
*E (Z)*⁶² *E (Z)*^{SON1}
 SER-LEU PHE-ILE
 RIGIFAKRAI QPGEELFFDY **R**YGPTEQLKF VGIEREMEIV 760
E (Z)^{TRM}
 ARG-LYS

7.9. ábra Az ENHANCER OF ZESTE fehérje aminosav sorrendje

A C-terminális SET-domént és az azt megelőző cisztein-gazdag pre-SET-domént aláhúzás jelzi. A szövegben említésre kerülő pontmutációkat és a bekövetkezett aminosav cserét a szekvencia alatt jeleztük.

SUMMARY

In multicellular organisms, the division of a single totipotent cell, the fertilized zygote, ultimately results in a myriad of cells with different structures and functions. The basis of this diversity is differential gene expression, and different cell types are characterized by distinct gene expression patterns. Once established, the cell type-specific gene expression patterns have to be maintained throughout life. Wide range of morphogenic factors and signaling mechanisms are known which are responsible for establishing specific gene expression patterns and recent findings indicate the existence of a complex epigenetic maintenance system conserved in eukaryotes which is responsible for the maintenance of this pattern through numerous mitotic cycles. These epigenetic mechanisms are thought to establish transcriptionally active or silent state of genes by dynamic changes in chromatin structure.

The factors mediating epigenetic activation or repression of gene expression were first identified in *Drosophila* as regulators of homeotic gene complexes, and have been divided in two antagonistic groups, the *Polycomb*- and the *trithorax*-group. POLYCOMB-group proteins are thought to establish and maintain inactive transcriptional states. In contrast, *TRITHORAX*-group (*TRX*-G) establishes and maintains active transcriptional states. Although PC-G and TRX-G homologues are phylogenetically highly conserved, and a substantial number of papers describe their mode of action, it remains unknown how any of these proteins recognizes and distinguishes chromatin domains containing genes to be activated or repressed. Homeotic genes furnish an excellent model system to tackle this problem.

The segment-specific expression of *Drosophila* homeotic genes is governed by complex DNA-regions, called *cis*-regulators. *Cis*-regulators are activated in a sequential order along the anterior-posterior axis in the early embryo by the transiently expressed segmentation genes. Each *cis*-regulator is activated early in development in one specific parasegment and

control the level of expression of the appropriate homeotic gene. After the cessation of segmentation gene expression, the activity pattern of *cis*-regulators is epigenetically maintained through the remainder of development. The appropriate level of homeotic genes control morphogenetic differentiation of body segments, and their misexpression produces homeotic transformations.

We have identified a dominant mutation with a strong *trx*-like phenotype, which we termed *Trithorax-mimic* (*Trm*). The mutation was localized to the third chromosome and was not allelic to any of the known *trx*-G mutations, but strongly enhanced their phenotype. Recombination experiments located it to the 34,25 region not harboring any known *trx*-G allele, but overlapping the location of a *Pc*-G gene *Enhancer of zeste* [*E(z)*]. However the homeotic phenotype of our allele was the opposite to the phenotype of the characterized loss of function *E(z)* alleles.

The X-ray reversion of the *Trm* mutation proved that its *trx*-like phenotype could be reverted by inducing a new loss of function *E(z)* mutation on the *Trm* chromosome, indicating that *Trm* is really an *E(z)* allele and should be termed $E(z)^{Trithorax-mimic}$ [$(E(z)^{Trm})$]. The *E(z)* is an important factor responsible for the repression of homeotic selector genes during *Drosophila* embryogenesis, and if its activity is lost these genes are ectopically activated after the disappearance of transient morphogenic factors. In contrast, the presence of the isolated $E(z)^{Trm}$ allele results in the ectopic repression of normally active *cis*-regulators.

The mutant allele is fully capable of performing the normal inactivation function of *E(z)*, hence there is no sign of weakening of the repressor function even in $E(z)^{Trm}$ hemizygous or homozygous conditions. The existence of intact repressor function in $E(z)^{Trm}$ is further supported by the result that the allele is capable of inducing the repression of the *white* gene in *zeste*¹ (*z*¹) background in hemizygous condition, in contrast to another gain of function allele, $E(z)^L$.

In spite of its gain of function nature the isolated allele is not conventionally neomorphic, hence the homeotic transformations caused by the *Trm* mutants depend on the dosage of wild type *E(z)*. Introducing chromosomal duplications of the *E(z)* region or transgenic *E(z)* rescue constructs strongly alleviates the mutant phenotype. This finding indicates that the mutant protein competes with the wild type *E(z)* and suggest that it targets much the same genes as the wild type *E(z)*. Supporting this hypothesis we also found that immunohistochemical detection of the *E(z)* protein on the salivary gland giant chromosomes does not reveal any major difference of the binding pattern of the wild and mutant version of *E(z)*. Based on these findings we propose that the *E(z)*^{TRM} fully retains the epigenetic repressor activity but lacks target recognition specificity. This is the reason why *E(z)*^{TRM} also represses active domains. Based on our results we propose that the wild type *E(z)* protein is involved in the early decision of which domains should be inactivated.

E(z) protein contains a number of characterized protein-interacting domains in its NH₂-terminal half. At least two PC-G proteins (EXTRA SEX COMBS, ESC, and POLYCOMB LIKE, PCL) are known to interact with this part of *E(z)*. Additionally, *E(z)* contains a SET domain at its COOH-terminal end. SET domain was identified as a conserved motif found in three chromatin-associated proteins of *Drosophila*, SUPPRESSOR OF VARIEGATION 3-9, ENHANCER OF ZESTE and TRITHORAX. Nowadays the number of the known SET domain proteins is over 600. The name-giving three chromatin associated proteins [SU(VAR)3-9, *E(z)*, TRX] perform different regulatory functions. The SU(VAR)3-9 is important for the silencing of heterochromatin, *E(z)* is involved in epigenetic silencing of homeotic genes, while TRX is an epigenetic activator. The mammalian homologue of SU(VAR)3-9 was shown to specifically methylate histone H3 on lysine 9, whereas TRITHORAX, although has no proven enzymatic activity, is able to interact specifically with histone tails.

Sequencing the $E(z)^{Trm}$ allele revealed a single amino acid exchange point mutation in the SET domain that converts arginine (R) at position 741 into lysine (K) (R741K). It is noteworthy that all E(Z) homologues contain R at position 741, while TRX homologues contain K.

Crossing the $E(z)^{Trm}$ with different other $E(z)$ alleles leads to surprising results. First, four of the homozygous lethal antimorphic alleles are not only viable with the *Trm* mutant but suppress its *trx*-like phenotype. The suppression is moderate in case of the transposon induced $E(z)^{60}$ mutation which codes for a truncated E(Z) protein lacking the C-terminal SAC- (cystein rich, pre-SET) and SET-domains. Stronger suppression is detected using the three $E(z)^{son}$ alleles which carry point mutations in the SAC-SET-region. The suppressor effect is proportional to the distance of the mutated positions of the antimorphic alleles from the 741 arginin. The suppressor effect of the $E(z)^{son1}$ and $E(z)^{son3}$ alleles, in which the mutated positions are only 60 and 106 amino acid away from the $E(z)^{Trm}$ transition, are so strong that most of the $E(z)^{Trm} E(z)^{son1}$ and $E(z)^{son3}$ trans-heterozygotes look wild type. This effect does not depend on the Pc-enhancer phenotype of the examined *son* alleles. The strongest Pc-enhancer $E(z)^{son2}$ allele in fact the weakest suppressor. These results indicate a specific interaction between the mutated SET-domain regions and suggest that E(Z) proteins inactivate as homodimers or homomultimers, in which the SET-regions are closely contacted.

This hypothesis is further supported by the independent experiment in which the *nos*-suppressor phenotype of the above mentioned $E(z)^{son}$ alleles was examined in $E(z)^{Trm}$ background. Similarly to the homeotic interactions, in this experiment the suppressor effect of $E(z)^{Trm}$ is also proportional to the distance of the affected mutations from the 741. position, and does not depend on how strong *nos*-suppressors the $E(z)^{son}$ alleles are on their own. Surprisingly the strongest *nos*-suppressor $E(z)^{son3}$ allele is most suppressible by $E(z)^{Trm}$. Taken together these results lead to the conclusion, that the SAC-SET regions of at least two E(Z)

proteins form an interactive surface functioning in the epigenetic repression of both homeotic and *gap*-genes.

Our results implied that the mutated part of the SET domain of E(Z) plays an important role in distinguishing silent and active *cis*-regulators. Based on this we concluded that E(Z)^{TRM} may represent a valuable tool to identify factors and mechanisms that are involved in the recognition process.

We have employed genetic analysis to decipher how this single point mutation in the SET domain leads to repression of normally active *cis*-regulators in *Drosophila*. We were able to prove that the ectopic repression initiated by the mutant protein is dependent on the same factors involved in the normal repression function of E(Z). Mutations in many of the known *Pc*-G genes suppress the phenotype of *E(z)^{Trm}*. Reduction of the dosage of *Polycomblike* (*Pcl*), *extra sex combs* (*esc*), *Suppressor of zeste 12* [*Su(z)12*], *polyhomeotic* (*ph*), *pleiohomeotic* (*pho*), and *Suppressor of zeste 5* [*Su(z)5*] almost completely abolished the mutant phenotype. Of these, PCL, ESC and SU(Z)12 are known to interact directly with the wild type E(Z) both *in vitro* and *in vivo*, whereas PHO is the only conventional PC-G protein with proven DNA binding properties. These results suggest that the E(Z)^{TRM}-mediated ectopic repression requires the same epigenetic partners which are involved in the normal silencing function of the wild type E(Z), and indicate a high degree of similarity between normal and ectopic inactivation. Therefore, factors identified by using the sensitive *E(z)^{Trm}* phenotype as a screening system are likely to play a similar role in normal PC-G dependent silencing.

By genetic means, we have identified four factors, which suppress ectopic repression by E(Z)^{TRM} and have no previously demonstrated effect on homeotic gene regulation. Protein phosphorylation, histone gene dosage, mutations in two histone modifying enzymes, and deacetylase-inhibitor (Na-butyrate) feeding affect ectopic repression by E(Z)^{TRM}. These were the first *in vivo* results implying that specific histone modifications play an important role in

the recognition of different transcriptional states and the consequent formation of epigenetically activated and silenced chromatin domains.

We were able to show the followings:

-Reducing the dosage of histone genes by half, significantly suppresses the $E(z)^{Trm}$ phenotype.

-Ectopic repression of homeotic genes by $E(z)^{TRM}$ is suppressed by mutant alleles of the *Su(var)2-1* gene. This gene has been described as a modifier of position effect variegation (PEV), and the specific alleles used were shown to cause significant hyperacetylation of the bulk of histone H3 and H4 proteins in homozygous conditions. These results indicate that histone acetylation and deacetylation plays an important role in $E(z)^{TRM}$ -mediated repression of transcription. This hypothesis is further supported by our independent result that increasing the overall level of acetylated histones by feeding the mutant flies with histone deacetylase-inhibitor Na-butyrate, also suppressed the $E(z)^{Trm}$ phenotype.

-We have shown that an another PEV modifier with no known homeotic function, *Su(var)3-6* also modifies the $E(z)^{Trm}$ phenotype. The *Su(var)3-6* (*PpI^{87D}*) gene product is responsible for about 80% of the total protein-phosphatase-1 activity in the fly. Mutations in the *PpI^{87D}* gene suppress the $E(z)^{Trm}$ phenotype, while extra wild type copy of the same gene enhances it. On the other hand, loss-of-function mutations of the genes encoding the *aurora* kinase and the *JIL* kinase enhanced the $E(z)^{Trm}$ phenotype. These results raise the possibility that phosphorylation/dephosphorylation of some protein substrates is a part of the mechanism which marks active and inactive domains in the homeotic gene complexes, and that the $E(z)$ protein is able to recognize this mark. In contrast to the phenotype of heterozygous $E(z)^{Trm}$, the phenotype of the homozygous mutant is not sensitive to the dosage of *PpI^{87D}*. This indicates that the mutant $E(z)^{TRM}$ protein is unable to respond to the presence of the same phosphorylated compound. However, it is not due to a general insensitivity of the

homozygous $E(z)^{Trm}$ phenotype, because it is strongly suppressed by the overall increase of the level of histone acetylation caused by *Su(var)2-1* mutations. Taken together, our results indicate that the $E(z)^{Trm}$ is wild type in every aspect of the $E(z)$ function, except for its inability to respond to the presence of a phosphorylated compound.

In order to reveal the phosphorylated compound marking active chromatin domains we have looked for nuclear kinases modifying the *Trm* specific repression in the opposite direction to the $PP1^{87D}$ phosphatase. We have been able to find two kinases with significant enhancer effect on the homeotic phenotype of $E(z)^{Trm}$: *aurora* (*aur*) and *JIL*.

Recently *Pp1*-type phosphatases, *aur*-type kinases and the *Drosophila JIL* kinase itself are shown to influence the level of H3 phosphorylation. Based on these findings we speculate that the phosphorylation of histone tails in the active chromatin domains may be responsible for inhibiting the inactivating function of wild type $E(z)$.

To reach our final aim and elucidate the molecular mechanisms underlying the recognition of appropriate chromatin domains by $E(z)$, besides *in vivo* genetical interaction experiments we analyzed and compared the biochemical properties of wild type $E(z)$ and the $E(z)^{Trm}$ mutant. These experiments provided valuable clues towards the understanding of the molecular mechanisms underlying not only the recognition, but also the establishment of $E(z)$ -dependent epigenetic repression.

The genetic interactions of $E(z)^{Trm}$ with the $E(z)^{son}$ alleles indicated *in vivo* interaction between the $E(z)$ SAC-SET regions. In case of two other SET-domain proteins ASH1 and TRX the existence of specific homo-, and heteromer interactions were proven both *in vivo* and *in vitro*. In order to look for similar interactions in the case of $E(z)$ we performed specific binding experiments using Sepharose linked $E(z)$ C-terminal SAC-SET fragment and radioactively labeled *in vitro* translated $E(z)$, TRX and ASH1 protein. We could detect significant binding in all examined combination. In order to determine the domain involved in

the interaction we could show that this interaction does not require the full length E(Z) and ASH1. The radioactively labeled E(Z) and ASH1 pre-SET-SET fragment was also capable of interaction. We could not detect significant differences in the specificity or strength of the binding between the wild type protein and the appropriate E(Z)^{TRM} fragments in any of the examined cases.

Among the strong suppressors of the homeotic phenotype of *E(z)^{Trm}* we have found the *Su(z)5* gene which codes for an enzyme responsible for the biosynthesis of S-adenosil methionin, the important cofactor for all methyl transferase reactions. The SET-domains of two other chromatin associated proteins, SU(VAR)39H and ASH1, possess histone-methyl-transferase activity. Therefore, we speculated that E(Z)^{TRM} could possess a novel, or, compared to E(Z), altered histone methyl-transferase (HMT) activity, which may contribute to the repression of active transcription domains. We therefore examined whether E(Z) is a HMT. We generated a recombinant baculovirus which expresses epitope-tagged (FLAG) versions of wild type and mutant E(Z) in *Sf9* cells. Recombinant E(Z) derivatives were purified from *Sf9* cells using affinity-chromatography techniques.

To test whether wild type and mutant E(Z) proteins are able to methylate histones, we used conventional HMT-activity assays. Recombinant E(Z) proteins were incubated with the methyl-group donor [³H]-adenosyl-methionine (SAM), and individual recombinant core histones (H2A, H2B, H3, H4), purified histone core-octamer, reconstituted nucleosomes, and polynucleosomes. After the reaction, proteins were separated by SDS-PAGE, and radiolabeled proteins were detected by fluorography. These assays revealed that both the wild type E(Z) and the E(Z)^{TRM} mutant has H+ specific methyl-transferase activity, as expected based on the genetic experiments.

A recent study implies that the SET-domain of TRX, which possesses no HMT-activity, binds nucleosomes, and specific mutations in TRX SET domain abolish the interaction of TRX

with nucleosomes. Preliminary results implied that histone acetylation and phosphorylation play an important role in marking active domains for E(Z) in *Drosophila*. This raised the possibility that E(Z)^{TRM} interacts differently with covalently modified histones.

To test this hypothesis, we performed protein-protein interaction assays, using N-terminal histone H3 tail peptides, and in vitro translated wild type and Trm mutant E(Z) proteins. Sepharose-beads loaded with differently modified H3 peptides were incubated with radio-labeled E(Z) and E(Z)^{TRM}. Interactions were detected by fluorography. We found that E(Z) and E(Z)^{TRM} binds to the used H3 peptides and in both cases the K9-dimethylated peptide showed the strongest binding. As opposed to this the binding of the S10 phosphorylated version was always weak and E(Z)^{TRM} binds less effectively than the wild type version to this phosphorylated tail peptide. These experiments elucidated that E(Z)^{TRM} has similar overall binding specificity to different covalently modified H3 peptides but interacts with modified, S-10 phosphorylated NH₂-terminal histone tail different to wild type E(Z).

In conclusion, our results imply that the interaction and modification of histones plays an important role in the repression of gene expression by E(Z). The C-terminal SAC-SET-domains are capable of specific histone H3 interaction, and possess intrinsic histone-methyltransferase activity. The C-terminal half of the SET-domain plays an important role in recognizing the specific chromatin domains to be methylated, and finally repressed.

IRODALOMJEGYZÉK

- [Aasland R, Stewart AF, Gibson T.](#) The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIB. Trends Biochem Sci. 1996 Mar; 21 (3):87-8. Review.
- [Adams RR, Maiato H, Earnshaw WC, Carmena M.](#) Essential roles of Drosophila inner centromere protein (INCENP) and aurora B in histone H3 phosphorylation, metaphase chromosome alignment, kinetochore disjunction, and chromosome segregation. J Cell Biol. 2001 May 14; 153 (4): 865-80.
- [Adler PN, Charlton J, Brunk B.](#) Genetic interactions of the suppressor 2 of zeste region genes. Dev Genet. 1989; 10 (3): 249-60.
- [Akasaka T, van Lohuizen M, van der Lugt N, Mizutani-Koseki Y, Kanno M, Taniguchi M, Vidal M, Alkema M, Berns A, Koseki H.](#) Mice doubly deficient for the Polycomb Group genes Mel18 and Bmi1 reveal synergy and requirement for maintenance but not initiation of Hox gene expression. Development. 2001 May; 128 (9): 1587-97.
- [Alkema MJ, Bronk M, Verhoeven E, Otte A, van't Veer LJ, Berns A, van Lohuizen M.](#) Identification of Bmi1-interacting proteins as constituents of a multimeric mammalian polycomb complex. Genes Dev. 1997 Jan 15; 11 (2): 226-40.
- [Atchison L, Ghias A, Wilkinson F, Bonini N, Atchison ML.](#) Transcription factor YY1 functions as a PcG protein in vivo. EMBO J. 2003 Mar 17; 22 (6): 1347-58.
- [Axton JM, Dombradi V, Cohen PT, Glover DM.](#) One of the protein phosphatase 1 isoenzymes in Drosophila is essential for mitosis. Cell. 1990 Oct 5; 63 (1): 33-46
- [Bajusz I, Sipos L, Gyorgypal Z, Carrington EA, Jones RS, Gausz J, Gyurkovics H.](#) The Trithorax-mimic allele of Enhancer of zeste renders active domains of target genes accessible to polycomb-group-dependent silencing in Drosophila melanogaster. Genetics. 2001 Nov; 159 (3) :1135-50.
- [Baksa K, Morawietz H, Dombradi V, Axton M, Taubert H, Szabo G, Torok I, Udvardy A, Gyurkovics H, Szoor B, et al.](#) Mutations in the protein phosphatase 1 gene at 87B can differentially affect suppression of position-effect variegation and mitosis in Drosophila Genetics. 1993 Sep; 135 (1): 117-25.
- [Baldi P, Brunak S, Chauvin Y, Krogh A.](#) Naturally occurring nucleosome positioning signals in human exons and introns. J Mol Biol. 1996 Nov 8; 263 (4): 503-10.
- [Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T.](#) Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. Nature. 2001 Mar 1; 410 (6824): 120-4.
- [Barratt MJ, Hazzalin CA, Cano E, Mahadevan LC.](#) Mitogen-stimulated phosphorylation of histone H3 is targeted to a small hyperacetylation-sensitive fraction.Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 May 24; 91 (11): 4781-5.
- [de la Barre AE, Angelov D, Molla A, Dimitrov S.](#) The N-terminus of histone H2B, but not that of histone H3 or its phosphorylation, is essential for chromosome condensation.EMBO J. 2001 Nov 15; 20 (22): 6383-93.
- [Beachy PA, Helfand SL, Hogness DS.](#) Segmental distribution of bithorax complex proteins during Drosophila development. Nature. 1985 Feb 14-20; 313 (6003): 545-51.
- [Beisel C, Imhof A, Greene J, Kremmer E, Sauer F.](#) Histone methylation by the Drosophila epigenetic transcriptional regulator Ash1 Nature. 2002 Oct 24; 419(6909): 857-62.
- [Belikov S, Gelius B, Almouzni G, Wrangé O.](#) Hormone activation induces nucleosome positioning in vivo. EMBO J. 2000 Mar 1; 19(5): 1023-33.

[Benyajati C, Worcel A.](#) Isolation, characterization, and structure of the folded interphase genome of *Drosophila melanogaster*. *Cell*. 1976 Nov; 9 (3): 393-407.

[Bender W, Hudson A.](#) P element homing to the *Drosophila bithorax* complex. *Development*. 2000 Sep; 127 (18): 3981-92.

[Biggin MD, McGinnis W.](#) Regulation of segmentation and segmental identity by *Drosophila* homeoproteins: the role of DNA binding in functional activity and specificity. *Development*. 1997 Nov; 124 (22): 4425-33. Review.

[Biggin MD, Tjian R.](#) Transcription factors that activate the Ultrabithorax promoter in developmentally staged extracts. *Cell*. 1988 Jun 3; 53(5): 699-711.

[Birve A, Sengupta AK, Beuchle D, Larsson J, Kennison JA, Rasmuson-Lestander A, Muller J.](#) Su(z)12, a novel *Drosophila* Polycomb group gene that is conserved in vertebrates and plants. *Development*. 2001 Sep; 128 (17): 3371-9.

[Boivin A, Dura JM.](#) In vivo chromatin accessibility correlates with gene silencing in *Drosophila*. *Genetics*. 1998 Dec; 150(4):1539-49.

[Boncinelli E, Simeone A, Acampora D, Mavilio F.](#) HOX gene activation by retinoic acid. *Trends Genet*. 1991 Oct; 7 (10): 329-34.

[Boulet AM, Lloyd A, Sakonju S.](#) Molecular definition of the morphogenetic and regulatory functions and the cis-regulatory elements of the *Drosophila* Abd-B homeotic gene. *Development*. 1991 Feb; 111 (2): 393-405.

[Boyer LA, Logie C, Bonte E, Becker PB, Wade PA, Wolffe AP, Wu C, Imbalzano AN, Peterson CL.](#) Functional delineation of three groups of the ATP-dependent family of chromatin remodeling enzymes. *J Biol Chem*. 2000 Jun 23;275 (25): 18864-70.

[Breen TR, Harte PJ.](#) Molecular characterization of the trithorax gene, a positive regulator of homeotic gene expression in *Drosophila*. *Mech Dev*. 1991 Sep; 35 (2): 113-27.

[Breen TR, Harte PJ.](#) Trithorax regulates multiple homeotic genes in the bithorax and Antennapedia complexes and exerts different tissue-specific, parasegment-specific and promoter-specific effects on each. *Development*. 1993 Jan; 117 (1): 119-34.

[Breen TR.](#) Mutant alleles of the *Drosophila* trithorax gene produce common and unusual homeotic and other developmental phenotypes. *Genetics*. 1999 May; 152 (1): 319-44.

[Brehm A, Langst G, Kehle J, Clapier CR, Imhof A, Eberharder A, Muller J, Becker PB.](#) dMi-2 and ISWI chromatin remodelling factors have distinct nucleosome binding and mobilization properties. *EMBO J*. 2000 Aug 15; 19 (16): 4332-41.

[Breiling A, Bonte E, Ferrari S, Becker PB, Paro R.](#) The *Drosophila* polycomb protein interacts with nucleosomal core particles In vitro via its repression domain. *Mol Cell Biol*. 1999 Dec; 19 (12): 8451-60.

[Briggs SD, Bryk M, Strahl BD, Cheung WL, Davie JK, Dent SY, Winston F, Allis CD.](#) one H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*. 2001 Dec 15;15 (24): 3286-95.

[Brizuela BJ, Elfring L, Ballard J, Tamkun JW, Kennison JA.](#) Genetic analysis of the brahma gene of *Drosophila melanogaster* and polytene chromosome subdivisions 72AB. *Genetics*. 1994 Jul; 137 (3):803-13.

[Brown JL, Mucci D, Whiteley M, Dirksen ML, Kassis JA.](#) The *Drosophila* Polycomb group gene pleiohomeotic encodes a DNA binding protein with homology to the transcription factor YY1. *Mol Cell*. 1998 Jun; 1 (7): 1057-64.

[Brown JL, Fritsch C, Mueller J, Kassis JA.](#) The *Drosophila* pho-like gene encodes a YY1-related DNA binding protein that is redundant with pleiohomeotic in homeotic gene silencing. *Development*. 2003 Jan; 130 (2): 285-94.

- [Buchenau P, Hodgson J, Strutt H, Arndt-Jovin DJ.](#) The distribution of polycomb-group proteins during cell division and development in *Drosophila* embryos: impact on models for silencing. *J Cell Biol.* 1998 Apr 20; 141 (2): 469-81.
- [Busturia A, Casanova J, Sanchez-Herrero E, Morata G.](#) Structure and function of the bithorax complex genes of *Drosophila*. *Ciba Found Symp.* 1989; 144: 227-38; discussion 239-42, 290-5. Review.
- [Busturia A, Bienz M.](#) Silencers in abdominal-B, a homeotic *Drosophila* gene. *EMBO J.* 1993 Apr; 12(4): 1415-25.
- [Campbell RB, Sinclair DA, Couling M, Brock HW.](#) Genetic interactions and dosage effects of Polycomb group genes of *Drosophila*. *Mol Gen Genet.* 1995 Feb 6; 246(3): 291-300.
- [Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y.](#) Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science.* 2002 Nov 1; 298 (5595):1039-43.
- [Capovilla M, Brandt M, Botas J.](#) Direct regulation of decapentaplegic by Ultrabithorax and its role in *Drosophila* midgut morphogenesis. *Cell.* 1994 Feb 11; 76(3): 461-75.
- [Carlson M, Osmond BC, Neugeborn L, Botstein D.](#) A suppressor of SNF1 mutations causes constitutive high-level invertase synthesis in yeast. *Genetics.* 1984 May; 107(1): 19-32.
- [Carrington EA, Jones RS.](#) The *Drosophila* Enhancer of zeste gene encodes a chromosomal protein: examination of wild type and mutant protein distribution. *Development.* 1996 Dec; 122 (12): 4073-83.
- [Carroll SB.](#) Homeotic genes and the evolution of arthropods and chordates. *Nature.* 1995 Aug 10; 376 (6540): 479-85.
- [Castelli-Gair J.](#) Implications of the spatial and temporal regulation of Hox genes on development and evolution. *Int J Dev Biol.* 1998; 42(3 Spec No):437-44. Review
- [Cavalli G, Paro R.](#) The *Drosophila* Fab-7 chromosomal element conveys epigenetic inheritance during mitosis and meiosis. *Cell.* 1998 May 15; 93(4): 505-18
- [Cavalli G, Paro R.](#) Epigenetic inheritance of active chromatin after removal of the main transactivator. *Science.* 1999 Oct 29; 286(5441): 955-8.
- [Casares F, Sanchez-Herrero E.](#) Regulation of the infraabdominal regions of the bithorax complex of *Drosophila* by gap genes. *Development.* 1995 Jun; 121 (6): 1855-66.
- [Celniker SE, Sharma S, Keelan DJ, Lewis EB.](#) The molecular genetics of the bithorax complex of *Drosophila*: cis-regulation in the Abdominal-B domain. *EMBO J.* 1990 Dec; 9(13): 4277-86.
- [Chan CS, Rastelli L, Pirrotta V.](#) A Polycomb response element in the Ubx gene that determines an epigenetically inherited state of repression. *EMBO J.* 1994 Jun 1; 13 (11): 2553-64.
- [Chang YL, Peng YH, Pan IC, Sun DS, King B, Huang DH.](#) Essential role of *Drosophila* Hdac1 in homeotic gene silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Aug 14; 98 (17): 9730-5.
- [Cheng NN, Sinclair DA, Campbell RB, Brock HW.](#) Interactions of polyhomeotic with Polycomb group genes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 1994 Dec; 138 (4): 1151-62.
- [Cheung P, Tanner KG, Cheung WL, Sassone-Corsi P, Denu JM, Allis CD.](#) Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol Cell.* 2000 Jun; 5 (6): 905-15.
- [Chiang A, O'Connor MB, Paro R, Simon J, Bender W.](#) Discrete Polycomb-binding sites in each parasegmental domain of the bithorax complex. *Development.* 1995 Jun; 121 (6): 1681-9.

- [Chinwalla V, Jane EP, Harte PJ.](#) The *Drosophila* trithorax protein binds to specific chromosomal sites and is co-localized with Polycomb at many sites. *EMBO J.* 1995 May 1; 14(9): 2056-65.
- [Clayton AL, Rose S, Barratt MJ, Mahadevan LC.](#) Phosphoacetylation of histone H3 on c-fos- and c-jun-associated nucleosomes upon gene activation. *EMBO J.* 2000 Jul 17; 19 (14): 3714-26.
- [Collins RT, Furukawa T, Tanese N, Treisman JE.](#) Osa associates with the Brahma chromatin remodeling complex and promotes the activation of some target genes. *EMBO J.* 1999 Dec 15; 18 (24): 7029-40.
- [Corona DF, Langst G, Clapier CR, Bonte EJ, Ferrari S, Tamkun JW, Becker PB.](#) ISWI is an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Mol Cell.* 1999 Feb; 3 (2): 239-45
- [Czermin B, Melfi R, McCabe D, Seitz V, Imhof A, Pirrotta V.](#) *Drosophila* enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell.* 2002 Oct 18; 111 (2): 185-96.
- [Daubresse G, Deuring R, Moore L, Papoulas O, Zakrajsek I, Waldrip WR, Scott MP, Kennison JA, Tamkun JW.](#) The *Drosophila* kismet gene is related to chromatin-remodeling factors and is required for both segmentation and segment identity. *Development.* 1999 Mar; 126 (6): 1175-87.
- [Deuring R, Fanti L, Armstrong JA, Sarte M, Papoulas O, Prestel M, Daubresse G, Verardo M, Moseley SL, Berloco M, Tsukiyama T, Wu C, Pimpinelli S, Tamkun JW.](#) The ISWI chromatin-remodeling protein is required for gene expression and the maintenance of higher order chromatin structure in vivo. *Mol Cell.* 2000 Feb; 5 (2): 355-65.
- [DeCamillis M, Cheng NS, Pierre D, Brock HW.](#) The polyhomeotic gene of *Drosophila* encodes a chromatin protein that shares polytene chromosome-binding sites with Polycomb. *Genes Dev.* 1992 Feb; 6 (2): 223-32.
- [de la Barre AE, Angelov D, Molla A, Dimitrov S.](#) The N-terminus of histone H2B, but not that of histone H3 or its phosphorylation, is essential for chromosome condensation. *EMBO J.* 2001 Nov 15; 20 (22): 6383-93.
- [DeLorenzi M, Ali N, Saari G, Henry C, Wilcox M, Bienz M.](#) Evidence that the Abdominal-B element function is conferred by a trans-regulatory homeoprotein. *EMBO J.* 1988 Oct; 7 (10): 3223-31.
- [Denell RE, Frederick RD.](#) Homoeosis in *Drosophila*: a description of the Polycomb lethal syndrome. *Dev Biol.* 1983 May; 97(1):34-47.
- [Dingwall AK, Beek SJ, McCallum CM, Tamkun JW, Kalpana GV, Goff SP, Scott MP.](#) The *Drosophila* snr1 and brm proteins are related to yeast SWI/SNF proteins and are components of a large protein complex. *Mol Biol Cell.* 1995 Jul; 6 (7): 777-91.
- Dorn, R., Heymann, S., Lindigkeit, R. and Reuter, G., 1986 Suppressor mutation of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster* affecting chromatin properties. *Chromosoma* **93**: 398-403.
- [Duboule D, Morata G.](#) Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends Genet.* 1994 Oct; 10 (10): 358-64. Review.
- [Duncan IM.](#) Polycomblike: a gene that appears to be required for the normal expression of the bithorax and antennapedia gene complexes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 1982 Sep;102(1):49-70.
- [Duncan I.](#) The bithorax complex. *Annu Rev Genet.* 1987; 21:285-319. Review
- [Estrada B, Sanchez-Herrero E.](#) The Hox gene Abdominal-B antagonizes appendage development in the genital disc of *Drosophila*. *Development.* 2001 Feb; 128 (3): 331-9.
- [Elfring LK, Deuring R, McCallum CM, Peterson CL, Tamkun JW.](#) Identification and characterization of *Drosophila* relatives of the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Mol Cell Biol.* 1994 Apr; 14 (4): 2225-34.

- [Eissenberg JC, James TC, Foster-Hartnett DM, Hartnett T, Ngan V, Elgin SC.](#) Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Dec 87 (24): 9923-7.
- [Farkas G, Gausz J, Galloni M, Reuter G, Gyurkovics H, Karch F.](#) The Trithorax-like gene encodes the *Drosophila* GAGA factor. *Nature*. 1994 Oct 27; 371 (6500): 806-8.
- [Faust C, Lawson KA, Schork NJ, Thiel B, Magnuson T.](#) The Polycomb-group gene *eed* is required for normal morphogenetic movements during gastrulation in the mouse embryo. *Development*. 1998 Nov; 125 (22): 4495-506.
- [Fauvarque MO, Dura JM.](#) polyhomeotic regulatory sequences induce developmental regulator-dependent variegation and targeted P-element insertions in *Drosophila*. *Genes Dev*. 1993 Aug; 7 (8): 1508-20.
- [Fauvarque MO, Zuber V, Dura JM.](#) Regulation of polyhomeotic transcription may involve local changes in chromatin activity in *Drosophila*. *Mech Dev*. 1995 Aug; 52 (2-3): 343-55.
- [Felsenfeld G, McGhee JD.](#) Structure of the 30 nm chromatin fiber. *Cell*. 1986 Feb 14; 44 (3): 375-7. Review
- [Fitzgerald DP, Bender W.](#) Polycomb group repression reduces DNA accessibility. *Mol Cell Biol*. 2001 Oct; 21 (19): 6585-97.
- [Francis NJ, Saurin AJ, Shao Z, Kingston RE.](#) Reconstitution of a functional core polycomb repressive complex. *Mol Cell*. 2001 Sep; 8 (3): 545-56.
- [Franke A, DeCamillis M, Zink D, Cheng N, Brock HW, Paro R.](#) Polycomb and polyhomeotic are constituents of a multimeric protein complex in chromatin of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J*. 1992 Aug; 11 (8): 2941-50.
- [Fromm JR, Hileman RE, Caldwell EE, Weiler JM, Linhardt RJ.](#) Differences in the interaction of heparin with arginine and lysine and the importance of these basic amino acids in the binding of heparin to acidic fibroblast growth factor. *Arch Biochem Biophys*. 1995 Nov 10; 323 (2): 279-87.
- [Galloni M, Gyurkovics H, Schedl P, Karch F.](#) The bluetail transposon: evidence for independent cis-regulatory domains and domain boundaries in the bithorax complex. *EMBO J*. 1993 Mar; 12 (3): 1087-97.
- [Garcia-Bellido A, Santamaria P.](#) Developmental analysis of the wing disc in the mutant engrailed of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 1972 Sep; 72 (1): 87-104.
- [Gatti M, Baker BS.](#) Genes controlling essential cell-cycle functions in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev*. 1989 Apr; 3 (4): 438-53.
- [Gaul U, Seifert E, Schuh R, Jackle H.](#) Analysis of Kruppel protein distribution during early *Drosophila* development reveals posttranscriptional regulation. *Cell*. 1987 Aug 14; 50 (4): 639-47
- [Gavin I, Horn PJ, Peterson CL.](#) SWI/SNF chromatin remodeling requires changes in DNA topology. *Mol Cell*. 2001 Jan; 7(1):97-104.
- [Gehring WJ.](#) box, and the genetic control of development. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1985; 50:243-51.
- [Gehring WJ, Affolter M, Burglin T.](#) Homeodomain proteins. *Annu Rev Biochem*. 1994; 63: 487-526. Review.
- [Giet R, Glover DM.](#) *Drosophila* aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. *J Cell Biol*. 2001 Feb 19; 152(4): 669-82.
- [Gildea JJ, Lopez R, Shearn A.](#) A screen for new trithorax group genes identified little imaginal discs, the *Drosophila melanogaster* homologue of human retinoblastoma binding protein 2. *Genetics*. 2000 Oct; 156 (2): 645-63.

- [Glicksman MA, Brower DL.](#) Misregulation of homeotic gene expression in *Drosophila* larvae resulting from mutations at the extra sex combs locus. *Dev Biol.* 1988 Apr; 126 (2): 219-27.
- [Gindhart JG Jr, Kaufman TC.](#) Identification of Polycomb and trithorax group responsive elements in the regulatory region of the *Drosophila* homeotic gene Sex combs reduced. *Genetics.* 1995 Feb; 139 (2): 797-814.
- [Gonzalez-Reyes A, Morata G.](#) The developmental effect of overexpressing a Ubx product in *Drosophila* embryos is dependent on its interactions with other homeotic products. *Cell.* 1990 May 4; 61 (3): 515-22.
- [Goodrich J, Puangsomlee P, Martin M, Long D, Meyerowitz EM, Coupland G.](#) A Polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in *Arabidopsis*. *Nature.* 1997 Mar 6; 386 (6620): 44-51.
- [Goto H, Yasui Y, Nigg EA, Inagaki M.](#) Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation. *Genes Cells.* 2002 Jan; 7 (1): 11-7.
- [Granok H, Leibovitch BA, Shaffer CD, Elgin SC.](#) Chromatin. Ga-ga over GAGA factor. *Curr Biol.* 1995 Mar 1; 5 (3): 238-41. Review.
- [Graziano V, Gerchman SE, Schneider DK, Ramakrishnan V.](#) Histone H1 is located in the interior of the chromatin 30-nm filament. *Nature.* 1994 Mar 24; 368 (6469): 351-4.
- [Grossniklaus U, Vielle-Calzada JP, Hoepfner MA, Gagliano WB.](#) Maternal control of embryogenesis by MEDEA, a polycomb group gene in *Arabidopsis*. *Science.* 1998 Apr 17; 280 (5362): 446-50.
- [Guillen I, Mullor JL, Capdevila J, Sanchez-Herrero E, Morata G, Guerrero I.](#) The function of engrailed and the specification of *Drosophila* wing pattern. *Development.* 1995 Oct; 121 (10): 3447-56.
- [Gunster MJ, Satijn DP, Hamer KM, den Blaauwen JL, de Bruijn D, Alkema MJ, van Lohuizen M, van Driel R, Otte AP.](#) Identification and characterization of interactions between the vertebrate polycomb-group protein BMI1 and human homologs of polyhomeotic. *Mol Cell Biol.* 1997 Apr; 17 (4): 2326-35.
- [Gurley LR, Walters RA, Tobey RA.](#) Cell cycle-specific changes in histone phosphorylation associated with cell proliferation and chromosome condensation. *J Cell Biol.* 1974 Feb; 60 (2): 356-64.
- [Guschin D, Wade PA, Kikyo N, Wolffe AP.](#) ATP-Dependent histone octamer mobilization and histone deacetylation mediated by the Mi-2 chromatin remodeling complex. *Biochemistry.* 2000 May 9; 39 (18): 5238-45.
- [Graham A, Papalopulu N, Krumlauf R.](#) The murine and *Drosophila* homeobox gene complexes have common features of organization and expression. *Cell.* 1989 May 5; 57 (3): 367-78.
- [Graziano V, Gerchman SE, Schneider DK, Ramakrishnan V.](#) Histone H1 is located in the interior of the chromatin 30-nm filament. *Nature.* 1994 Mar 24; 368 (6469): 351-4.
- [Gyurkovics H, Gausz J, Kummer J, Karch F.](#) A new homeotic mutation in the *Drosophila* bithorax complex removes a boundary separating two domains of regulation. *EMBO J.* 1990 Aug; 9(8): 2579-85.
- [Hafen E.](#) Kinases and phosphatases--a marriage is consummated. *Science.* 1998 May 22; 280 (5367): 1212-3.
- [Hagstrom K, Muller M, Schedl P.](#) A Polycomb and GAGA dependent silencer adjoins the Fab-7 boundary in the *Drosophila* bithorax complex. *Genetics.* 1997 Aug; 146 (4): 1365-80.
- [Hanson RD, Hess JL, Yu BD, Ernst P, van Lohuizen M, Berns A, van der Lugt NM, Shashikant CS, Ruddle FH, Seto M, Korsmeyer SJ.](#) Mammalian Trithorax polycomb-group homologues are antagonistic regulators of homeotic development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Dec 7; 96(25): 14372-7.
- [Harding K, Wedeen C, McGinnis W, Levine M.](#) Spatially regulated expression of homeotic genes in *Drosophila*. *Science.* 1985 Sep 20; 229 (4719): 1236-42. Review.

- [Harding K, Levine M](#). Gap genes define the limits of antennapedia and bithorax gene expression during early development in *Drosophila*. *EMBO J*. 1988 Jan; 7(1): 205-14
- [Hoey T, Doyle HJ, Harding K, Wedeen C, Levine M](#). Homeo box gene expression in anterior and posterior regions of the *Drosophila* embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Jul; 83 (13): 4809-13.
- [Hogga I, Mihaly J, Barges S, Karch F](#). Replacement of Fab-7 by the gypsy or scs insulator disrupts long-distance regulatory interactions in the Abd-B gene of the bithorax complex. *Mol Cell*. 2001 Nov;8(5): 1145-51.
- [Horard B, Tatout C, Poux S, Pirrotta V](#). Structure of a polycomb response element and in vitro binding of polycomb group complexes containing GAGA factor. *Mol Cell Biol*. 2000 May; 20(9):3187-97.
- [Huang DH, Chang YL, Yang CC, Pan IC, King B](#). pipsqueak encodes a factor essential for sequence-specific targeting of a polycomb group protein complex. *Mol Cell Biol*. 2002 Sep; 22 (17): 6261-71.
- [Hursh DA, Padgett RW, Gelbart WM](#). Cross regulation of decapentaplegic and Ultrabithorax transcription in the embryonic visceral mesoderm of *Drosophila*. *Development*. 1993 Apr; 117 (4): 1211-22.
- [Hsu JY, Sun ZW, Li X, Reuben M, Tatchell K, Bishop DK, Grushcow JM, Brame CJ, Caldwell JA, Hunt DF, Lin R, Smith MM, Allis CD](#). Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell*. 2000 Aug 4; 102 (3): 279-91.
- Ingham P, and Whittle R, *Trithorax*: a new homeotic mutation of *Drosophila melanogaster* causing transformations of abdominal and thoracic imaginal segments *Molec. Gen. Genet.* 179, 607-614
- [Inoue H, Nojima H, Okayama H](#). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 1990 Nov 30; 96(1):23-8.
- [Irish VF, Martinez-Arias A, Akam M](#). Spatial regulation of the Antennapedia and Ultrabithorax homeotic genes during *Drosophila* early development. *EMBO J*. 1989 May;8 (5): 1527-37.
- [Irish V, Lehmann R, Akam M](#). The *Drosophila* posterior-group gene nanos functions by repressing hunchback activity. *Nature*. 1989 Apr 20; 338 (6217): 646-8.
- [Ito T, Bulger M, Pazin MJ, Kobayashi R, Kadonaga JT](#). ACF, an ISWI-containing and ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor. *Cell*. 1997 Jul 11; 90(1): 145-55.
- [Jacobs SA, Taverna SD, Zhang Y, Briggs SD, Li J, Eissenberg JC, Allis CD, Khorasanizadeh S](#). Specificity of the HP1 chromo domain for the methylated N-terminus of histone H3.*EMBO J*. 2001 Sep 17; 20 (18): 5232-41.
- Janody et al., 2001 blind spot (bli) and kohtalo (kto), the *Drosophila* homologs of TRAP240 and TRAP230, cause specific and identical developmental phenotypes. *A. Dros. Res. Conf.* 42: 332B
- [Jenuwein T, Laible G, Dorn R, Reuter G](#). SET domain proteins modulate chromatin domains in eu- and heterochromatin. *Cell Mol Life Sci*. 1998 Jan; 54(1): 80-93. Review.
- [Jin Y, Wang Y, Walker DL, Dong H, Conley C, Johansen J, Johansen KM](#). JIL-1: a novel chromosomal tandem kinase implicated in transcriptional regulation in *Drosophila*. *Mol Cell*. 1999 Jul; 4(1): 129-35.
- [Jin Y, Wang Y, Johansen J, Johansen KM](#). JIL-1, a chromosomal kinase implicated in regulation of chromatin structure, associates with the male specific lethal (MSL) dosage compensation complex. *J Cell Biol*. 2000 May 29; 149 (5): 1005-10.
- [Jones RS, Gelbart WM](#). Genetic analysis of the enhancer of zeste locus and its role in gene regulation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 1990 Sep; 126 (1): 185-99.
- [Jones RS, Gelbart WM](#). The *Drosophila* Polycomb-group gene Enhancer of zeste contains a region with sequence similarity to trithorax. *Mol Cell Biol*. 1993 Oct; 13(10): 6357-66.

[Jones CA, Ng J, Peterson AJ, Morgan K, Simon J, Jones RS.](#) The Drosophila esc and E(z) proteins are direct partners in polycomb group-mediated repression. *Mol Cell Biol.* 1998 May; 18 (5): 2825-34.

Jürgens, G., 1985 A group of genes controlling the spatial expression of the bithorax complex in *Drosophila*. *Nature* **316**: 153-155.

[Kalisch WE, Rasmuson B.](#) Changes of zeste phenotype induced by autosomal mutations in *Drosophila melanogaster*. *Hereditas.* 1974; 78(1): 97-104

[Karch F, Weiffenbach B, Peifer M, Bender W, Duncan I, Celniker S, Crosby M, Lewis EB.](#) The abdominal region of the bithorax complex. *Cell.* 1985 Nov; 43 (1): 81-96.

[Karch F, Bender W, Weiffenbach B.](#) abdA expression in *Drosophila* embryos. *Genes Dev.* 1990 Sep; 4(9): 1573-87.

[Kassis JA.](#) Unusual properties of regulatory DNA from the *Drosophila* engrailed gene: three "pairing-sensitive" sites within a 1.6-kb region. *Genetics.* 1994 Mar; 136 (3): 1025-38

[Katsani KR, Arredondo JJ, Kal AJ, Verrijzer CP.](#) A homeotic mutation in the trithorax SET domain impedes histone binding. *Genes Dev.* 2001 Sep 1; 15 (17): 2197-202.

[Kaufman PD.](#) Nucleosome assembly: the CAF and the HAT. *Curr Opin Cell Biol.* 1996 Jun; 8(3): 369-73. Review.

[Kaufman TC, Seeger MA, Olsen G.](#) Molecular and genetic organization of the antennapedia gene complex of *Drosophila melanogaster*. *Adv Genet.* 1990; 27:309-62. Review

[Kehle J, Beuchle D, Treuheit S, Christen B, Kennison JA, Bienz M, Muller J.](#) dMi-2, a hunchback-interacting protein that functions in polycomb repression. *Science.* 1998 Dec 4; 282 (5395): 1897-900.

[Kennison JA.](#) Transcriptional activation of *Drosophila* homeotic genes from distant regulatory elements. *Trends Genet.* 1993 Mar; 9(3):75-9. Review.

[Kennison JA.](#) The Polycomb and trithorax group proteins of *Drosophila*: trans-regulators of homeotic gene function. *Annu Rev Genet.* 1995; 29:289-303. Review.

[Kennison JA, Tamkun JW.](#) Dosage-dependent modifiers of polycomb and antennapedia mutations in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Nov; 85 (21): 8136-40.

[Kenyon C.](#) If birds can fly, why can't we? Homeotic genes and evolution. *Cell.* 1994 Jul 29; 78(2): 175-80

[King IF, Francis NJ, Kingston RE.](#) Native and recombinant polycomb group complexes establish a selective block to template accessibility to repress transcription in vitro. *Mol Cell Biol.* 2002 Nov; 22(22): 7919-28.

[Kingston RE, Bunker CA, Imbalzano AN.](#) Repression and activation by multiprotein complexes that alter chromatin structure. *Genes Dev.* 1996 Apr 15; 10 (8): 905-20. Review

[Klein RR, Houtz RL.](#) Cloning and developmental expression of pea ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit N-methyltransferase. *Plant Mol Biol.* 1995 Jan; 27 (2): 249-61.

[Kornberg RD, Lorch Y.](#) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell.* 1999 Aug 6; 98(3): 285-94. Review.

[Korf I, Fan Y, Strome S.](#) The Polycomb group in *Caenorhabditis elegans* and maternal control of germline development. *Development.* 1998 Jul; 125(13):2469-78.

[Kornfeld K, Saint RB, Beachy PA, Harte PJ, Peattie DA, Hogness DS.](#) Structure and expression of a family of Ultrabithorax mRNAs generated by alternative splicing and polyadenylation in *Drosophila*. *Genes Dev.* 1989 Feb; 3 (2): 243-58.

- [Kurz A, Lampel S, Nickolenko JE, Bradl J, Benner A, Zirbel RM, Cremer T, Lichter P.](#) Active and inactive genes localize preferentially in the periphery of chromosome territories. *J Cell Biol.* 1996 Dec; 135(5): 1195-205.
- [Kuziora MA, McGinnis W.](#) Autoregulation of a *Drosophila* homeotic selector gene. *Cell.* 1988 Nov 4;55(3):477-85.
- [Kuziora MA, McGinnis W.](#) Different transcripts of the *Drosophila* Abd-B gene correlate with distinct genetic sub-functions. *EMBO J.* 1988 Oct; 7 (10): 3233-44.
- [Kuzin B, Tillib S, Sedkov Y, Mizrokhi L, Mazo A.](#) The *Drosophila* trithorax gene encodes a chromosomal protein and directly regulates the region-specific homeotic gene fork head. *Genes Dev.* 1994 Oct 15;8 (20): 2478-90.
- [Kuzmichev A, Nishioka K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D.](#) Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev.* 2002 Nov 15;16(22):2893-905.
- [Kyba M, Brock HW.](#) The *Drosophila* polycomb group protein Psc contacts ph and Pc through specific conserved domains. *Mol Cell Biol.* 1998 May; 18 (5): 2712-20.
- [Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T.](#) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature.* 2001 Mar 1; 410 (6824): 116-20.
- [Laible G, Wolf A, Dorn R, Reuter G, Nislow C, Lebersorger A, Popkin D, Pillus L, Jenuwein T.](#) Mammalian homologues of the Polycomb-group gene Enhancer of zeste mediate gene silencing in *Drosophila* heterochromatin and at *S. cerevisiae* telomeres. *EMBO J.* 1997 Jun 2; 16 (11): 3219-32.
- [LaJeunesse D, Shearn A.](#) Trans-regulation of thoracic homeotic selector genes of the Antennapedia and bithorax complexes by the trithorax group genes: absent, small, and homeotic discs 1 and 2. *Mech Dev.* 1995 Sep; 53 (1): 123-39.
- [LaJeunesse D, Shearn A.](#) E(z): a polycomb group gene or a trithorax group gene? *Development.* 1996 Jul; 122 (7): 2189-97.
- [Larsson J, Zhang J, Rasmuson-Lestander A.](#) Mutations in the *Drosophila melanogaster* gene encoding S-adenosylmethionine synthetase suppress position-effect variegation. *Genetics.* 1996 Jun; 143(2): 887-96. Erratum in: *Genetics* 1996 Nov; 144(3): 1329.
- [Levine SS, Weiss A, Erdjument-Bromage H, Shao Z, Tempst P, Kingston RE.](#) The core of the polycomb repressive complex is compositionally and functionally conserved in flies and humans. *Mol Cell Biol.* 2002 Sep; 22(17): 6070-8.
- [Lewis EB.](#) A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature.* 1978 Dec 7; 276 (5688): 565-70.
- Lindsley, D. L. and Zimm, G. G. 1992 *The genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego.
- [Lonie A, D'Andrea R, Paro R, Saint R.](#) Molecular characterisation of the Polycomblike gene of *Drosophila melanogaster*, a trans-acting negative regulator of homeotic gene expression. *Development.* 1994 Sep; 120 (9): 2629-36.
- [Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ.](#) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature.* 1997 Sep 18; 389 (6648): 251-60.
- [Lukasova E, Kozubek S, Kozubek M, Falk M, Amrichova J.](#) The 3D structure of human chromosomes in cell nuclei. *Chromosome Res.* 2002; 10(7): 535-48.
- [Luo M, Bilodeau P, Koltunow A, Dennis ES, Peacock WJ, Chaudhury AM.](#) Genes controlling fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jan 5; 96(1): 296-301.

- [Luo M, Bilodeau P, Dennis ES, Peacock WJ, Chaudhury A.](#) Expression and parent-of-origin effects for FIS2, MEA, and FIE in the endosperm and embryo of developing Arabidopsis seeds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Sep 12; 97(19):10637-42.
- [Machado C, Andrew DJ.](#) D-Titin: a giant protein with dual roles in chromosomes and muscles. *J Cell Biol.* 2000 Oct 30; 151 (3): 639-52
- [Macias A, Casanova J, Morata G.](#) Expression and regulation of the abd-A gene of Drosophila. *Development.* 1990 Dec; 110 (4): 1197-207.
- [Mahadevan LC, Willis AC, Barratt MJ.](#) Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors. *Cell.* 1991 May 31; 65(5): 775-83.
- [Mahaffey JW, Kaufman TC.](#) Distribution of the Sex combs reduced gene products in Drosophila melanogaster. *Genetics.* 1987 Sep; 117(1): 51-60.
- [Mahy NL, Perry PE, Gilchrist S, Baldock RA, Bickmore WA.](#) Spatial organization of active and inactive genes and noncoding DNA within chromosome territories. *J Cell Biol.* 2002 May 13; 157 (4): 579-89.
- [Mann RS, Hogness DS.](#) Functional dissection of Ultrabithorax proteins in D. melanogaster. *Cell.* 1990 Feb 23; 60 (4): 597-610.
- [Manak JR, Mathies LD, Scott MP.](#) Regulation of a decapentaplegic midgut enhancer by homeotic proteins. *Development.* 1994 Dec; 120(12):3605-19.
- [Mak W, Baxter J, Silva J, Newall AE, Otte AP, Brockdorff N.](#) Mitotically stable association of polycomb group proteins eed and enx1 with the inactive x chromosome in trophoblast stem cells. *Curr Biol.* 2002 Jun 25;12(12):1016-20.
- [Martin EC, Adler PN.](#) The Polycomb group gene Posterior Sex Combs encodes a chromosomal protein. *Development.* 1993 Feb; 117 (2): 641-55.
- [Martin CH, Mayeda CA, Davis CA, Ericsson CL, Knafels JD, Mathog DR, Celniker SE, Lewis EB, Palazzolo MJ.](#) Complete sequence of the bithorax complex of Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Aug 29; 92 (18): 8398-402.
- [Mazo AM, Huang DH, Mozer BA, Dawid IB.](#) The trithorax gene, a trans-acting regulator of the bithorax complex in Drosophila, encodes a protein with zinc-binding domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Mar; 87 (6): 2112-6.
- [McCall K, Bender W.](#) Probes of chromatin accessibility in the Drosophila bithorax complex respond differently to Polycomb-mediated repression. *EMBO J.* 1996 Feb 1; 15 (3): 569-80
- [McCall K, O'Connor MB, Bender W.](#) Enhancer traps in the Drosophila bithorax complex mark parasegmental domains. *Genetics.* 1994 Oct; 138 (2): 387-99.
- [McGinnis W, Levine MS, Hafen E, Kuroiwa A, Gehring WJ.](#) A conserved DNA sequence in homoeotic genes of the Drosophila Antennapedia and bithorax complexes. *Nature.* 1984 Mar 29-Apr 4; 308 (5958):428-33.
- [McGinnis W, Garber RL, Wirz J, Kuroiwa A, Gehring WJ.](#) A homologous protein-coding sequence in Drosophila homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell.* 1984 Jun; 37(2): 403-8.
- [McGinnis W, Hart CP, Gehring WJ, Ruddle FH.](#) Molecular cloning and chromosome mapping of a mouse DNA sequence homologous to homeotic genes of Drosophila. *Cell.* 1984 Oct; 38 (3): 675-80.
- [McGinnis W, Krumlauf R.](#) Homeobox genes and axial patterning. *Cell.* 1992 Jan 24; 68 (2): 283-302. Review.
- [McKeon J, Slade E, Sinclair DA, Cheng N, Couling M, Brock HW.](#) Mutations in some Polycomb group genes of Drosophila interfere with regulation of segmentation genes. *Mol Gen Genet.* 1994 Sep 1; 244 (5): 474-83.

- [Messmer S, Franke A, Paro R.](#) Analysis of the functional role of the Polycomb chromo domain in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* 1992 Jul; 6(7): 1241-54.
- [Mihaly J, Hogga I, Gausz J, Gyurkovics H, Karch F.](#) In situ dissection of the Fab-7 region of the bithorax complex into a chromatin domain boundary and a Polycomb-response element. *Development.* 1997 May; 124(9): 1809-20.
- [Mishra RK, Mihaly J, Barges S, Spierer A, Karch F, Hagstrom K, Schweinsberg SE, Schedl P.](#) The iab-7 polycomb response element maps to a nucleosome-free region of chromatin and requires both GAGA and pleiohomeotic for silencing activity. *Mol Cell Biol.* 2001 Feb; 21(4): 1311-8.
- [Milne TA, Sinclair DA, Brock HW.](#) The Additional sex combs gene of *Drosophila* is required for activation and repression of homeotic loci, and interacts specifically with Polycomb and super sex combs. *Mol Gen Genet.* 1999 Jun; 261(4-5): 753-61.
- [Mizzen CA, Allis CD.](#) Linking histone acetylation to transcriptional regulation. *Cell Mol Life Sci.* 1998 Jan;54(1):6-20. Review.
- [Mlodzik M, Gibson G, Gehring WJ.](#) Effects of ectopic expression of caudal during *Drosophila* development. *Development.* 1990 Jun; 109(2): 271-7.
- [Moazed D, O'Farrell PH.](#) Maintenance of the engrailed expression pattern by Polycomb group genes in *Drosophila*. *Development.* 1992 Nov; 116(3): 805-10.
- [Muller J, Bienz M.](#) Long range repression conferring boundaries of Ultrabithorax expression in the *Drosophila* embryo. *EMBO J.* 1991 Nov; 10(11):3147-55.
- [Muller J, Bienz M.](#) Sharp anterior boundary of homeotic gene expression conferred by the fushi tarazu protein. *EMBO J.* 1992 Oct; 11(10): 3653-61
- [Muller M, Hagstrom K, Gyurkovics H, Pirrotta V, Schedl P.](#) The mcp element from the *Drosophila melanogaster* bithorax complex mediates long-distance regulatory interactions. *Genetics.* 1999 Nov; 153(3): 1333-56.
- [Muller J, Gaunt S, Lawrence PA.](#) Function of the Polycomb protein is conserved in mice and flies. *Development.* 1995 Sep; 121(9): 2847-52.
- [Muller J, Hart CM, Francis NJ, Vargas ML, Sengupta A, Wild B, Miller EL, O'Connor MB, Kingston RE, Simon JA.](#) Histone methyltransferase activity of a *Drosophila* Polycomb group repressor complex. *Cell.* 2002 Oct 18; 111(2): 197-208.
- [Murnion ME, Adams RR, Callister DM, Allis CD, Earnshaw WC, Swedlow JR.](#) Chromatin-associated protein phosphatase 1 regulates aurora-B and histone H3 phosphorylation. *J Biol Chem.* 2001 Jul 13; 276(28): 26656-65.
- [Nagele RG, Freeman T, McMorro L, Thomson Z, Kitson-Wind K, Lee H.](#) Chromosomes exhibit preferential positioning in nuclei of quiescent human cells. *J Cell Sci.* 1999 Feb; 112(Pt 4): 525-35.
- [Neugeborn L, Carlson M.](#) Genes affecting the regulation of SUC2 gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 1984 Dec; 108(4): 845-58.
- [Ng J, Hart CM, Morgan K, Simon JA.](#) A *Drosophila* ESC-E(Z) protein complex is distinct from other polycomb group complexes and contains covalently modified ESC. *Mol Cell Biol.* 2000 May;20(9):3069-78.
- [Ng HH, Feng Q, Wang H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Zhang Y, Struhl K.](#) Lysine methylation within the globular domain of histone H3 by Dot1 is important for telomeric silencing and Sir protein association. *Genes Dev.* 2002 Jun 15; 16(12): 1518-27.
- [Nislow C, Ray E, Pillus L.](#) ET1, a yeast member of the trithorax family, functions in transcriptional silencing and diverse cellular processes. *Mol Biol Cell.* 1997 Dec;8(12): 2421-36.

- [O'Connell S, Wang L, Robert S, Jones CA, Saint R, Jones RS.](#) Polycomblike PHD fingers mediate conserved interaction with enhancer of zeste protein. *J Biol Chem.* 2001 Nov 16; 276 (46): 43065-73.
- [O'Connor MB, Binari R, Perkins LA, Bender W.](#) Alternative RNA products from the Ultrabithorax domain of the bithorax complex. *EMBO J.* 1988 Feb; 7 (2): 435-45.
- [Orlando V, Jane EP, Chinwalla V, Harte PJ, Paro R.](#) Binding of trithorax and Polycomb proteins to the bithorax complex: dynamic changes during early Drosophila embryogenesis. *EMBO J.* 1998 Sep 1; 17 (17): 5141-50.
- [Papoulas O, Beek SJ, Moseley SL, McCallum CM, Sarte M, Shearn A, Tamkun JW.](#) The Drosophila trithorax group proteins BRM, ASH1 and ASH2 are subunits of distinct protein complexes. *Development.* 1998 Oct; 125 (20): 3955-66.
- [Paro R.](#) Imprinting a determined state into the chromatin of Drosophila. *Trends Genet.* 1990 Dec; 6 (12): 416-21. Review
- [Paro R.](#) Mechanisms of heritable gene repression during development of Drosophila. *Curr Opin Cell Biol.* 1993 Dec; 5 (6): 999-1005. Review.
- [Paro R, Hogness DS.](#) The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Jan 1; 88(1): 263-7.
- [Parthun MR, Widom J, Gottschling DE.](#) The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism. *Cell.* 1996 Oct 4; 87 (1): 85-94.
- [Paulson JR, Laemmli UK.](#) The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell.* 1977 Nov; 12 (3): 817-28.
- [Pelegri F, Lehmann R.](#) A role of polycomb group genes in the regulation of gap gene expression in Drosophila. *Genetics.* 1994 Apr; 136 (4): 1341-53.
- [Peterson AJ, Kyba M, Bornemann D, Morgan K, Brock HW, Simon J.](#) A domain shared by the Polycomb group proteins Scm and ph mediates heterotypic and homotypic interactions. *Mol Cell Biol.* 1997 Nov; 17 (11): 6683-92.
- [Petruk S, Sedkov Y, Smith S, Tillib S, Kraevski V, Nakamura T, Canaani E, Croce CM, Mazo A.](#) Trithorax and dCBP acting in a complex to maintain expression of a homeotic gene. *Science.* 2001 Nov 9; 294 (5545):1331-4.
- [Phelan ML, Sif S, Narlikar GJ, Kingston RE.](#) Reconstitution of a core chromatin remodeling complex from SWI/SNF subunits. *Mol Cell.* 1999 Feb; 3 (2): 247-53.
- [Phillips MD, Shearn A.](#) Mutations in polycomb, a Drosophila polycomb-group gene, cause a wide range of maternal and zygotic phenotypes. *Genetics.* 1990 May; 125 (1): 91-101.
- [Pirrotta V.](#) The genetics and molecular biology of zeste in Drosophila melanogaster. *Adv Genet.* 1991; 29: 301-48. Review
- [Pirrotta V.](#) Chromatin complexes regulating gene expression in Drosophila. *Curr Opin Genet Dev.* 1995 Aug; 5 (4): 466-72. Review.
- [Pirrotta V.](#) Chromatin-silencing mechanisms in Drosophila maintain patterns of gene expression. *Trends Genet.* 1997 Aug; 13(8): 314-8. Review.
- [Pirrotta V.](#) PcG complexes and chromatin silencing. *Curr Opin Genet Dev.* 1997 Apr; 7(2): 249-58. Review
- [Pirrotta V, Rastelli L.](#) White gene expression, repressive chromatin domains and homeotic gene regulation in Drosophila. *Bioessays.* 1994 Aug; 16 (8): 549-56. Review.
- [Poux S, Kostic C, Pirrotta V.](#) Hunchback-independent silencing of late Ubx enhancers by a Polycomb Group Response Element. *EMBO J.* 1996 Sep 2; 15 (17): 4713-22.

[Poux S, Melfi R, Pirrotta V.](#) Establishment of Polycomb silencing requires a transient interaction between PC and ESC. *Genes Dev.* 2001 Oct 1; 15 (19): 2509-14.

[Poux S, McCabe D, Pirrotta V.](#) Recruitment of components of Polycomb Group chromatin complexes in *Drosophila*. *Development.* 2001 Jan; 128 (1): 75-85.

[Pradel J, White RA.](#) From selectors to realizators. *Int J Dev Biol.* 1998;42(3 Spec No):417-21. Review

[Puro J, Nygren T.](#) Mode of action of a homoeotic gene in *Drosophila melanogaster*. Localization and dosage effects of Polycomb. *Hereditas.* 1975;81(2):237-48.

[Qian S, Capovilla M, Pirrotta V.](#) The bx region enhancer, a distant cis-control element of the *Drosophila* Ubx gene and its regulation by hunchback and other segmentation genes. *EMBO J.* 1991 Jun; 10 (6): 1415-25.

[Qian S, Capovilla M, Pirrotta V.](#) Molecular mechanisms of pattern formation by the BRE enhancer of the Ubx gene. *EMBO J.* 1993 Oct; 12 (10): 3865-77.

[Rastelli L, Chan CS, Pirrotta V.](#) Related chromosome binding sites for zeste, suppressors of zeste and Polycomb group proteins in *Drosophila* and their dependence on Enhancer of zeste function. *EMBO J.* 1993 Apr; 12 (4): 1513-22.

[Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jenuwein T.](#) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature.* 2000 Aug 10; 406 (6796): 593-9.

[Reuter G, Dorn R, Hoffmann HJ.](#) Butyrate sensitive suppressor of position-effect variegation mutations in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet.* 1982; 188 (3): 480-5.

[Reuter G, Gausz J, Gyurkovics H, Friede B, Bang R, Spierer A, Hall LM, Spierer P.](#) Modifiers of position-effect variegation in the region from 86C to 88B of the *Drosophila melanogaster* third chromosome. *Mol Gen Genet.* 1987 Dec;210(3):429-36.

[Reuter G, Spierer P.](#) Position effect variegation and chromatin proteins. *Bioessays.* 1992 Sep; 14 (9) :605-12. Review.

[Reuter G, Werner W, Hoffmann HJ.](#) Mutants affecting position-effect heterochromatinization in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma.* 1982; 85 (4): 539-51.

[Reuter G, Wolff I.](#) Isolation of dominant suppressor mutations for position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet.* 1981; 182 (3): 516-9.

[Rozenblatt-Rosen O, Rozovskaia T, Burakov D, Sedkov Y, Tillib S, Blechman J, Nakamura T, Croce CM, Mazo A, Canaani E.](#) The C-terminal SET domains of ALL-1 and TRITHORAX interact with the INI1 and SNR1 proteins, components of the SWI/SNF complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Apr 14; 95 (8): 4152-7.

[Rozovskaia T, Rozenblatt-Rosen O, Sedkov Y, Burakov D, Yano T, Nakamura T, Petruck S, Ben-Simchon L, Croce CM, Mazo A, Canaani E.](#) Self-association of the SET domains of human ALL-1 and of *Drosophila* TRITHORAX and ASH1 proteins. *Oncogene.* 2000 Jan 20; 19 (3): 351-7.

[Rozovskaia T, Tillib S, Smith S, Sedkov Y, Rozenblatt-Rosen O, Petruk S, Yano T, Nakamura T, Ben-Simchon L, Gildea J, Croce CM, Shearn A, Canaani E, Mazo A.](#) Trithorax and ASH1 interact directly and associate with the trithorax group-responsive bxd region of the Ultrathorax promoter. *Mol Cell Biol.* 1999 Sep; 19 (9): 6441-7.

[De Rubertis F, Kadosh D, Henchoz S, Pauli D, Reuter G, Struhl K, Spierer P.](#) The histone deacetylase RPD3 counteracts genomic silencing in *Drosophila* and yeast. *Nature.* 1996 Dec 12; 384(6609):589-91.

[Sanchez-Herrero E, Vernos I, Marco R, Morata G.](#) Genetic organization of *Drosophila* bithorax complex. *Nature.* 1985 Jan 10-18; 313 (5998): 108-13.

- [Sanchez-Herrero E.](#) Heads or tails? A homeotic gene for both. *Trends Genet.* 1988 May; 4(5): 119-20. Review
- [Sanchez-Herrero E.](#) Control of the expression of the bithorax complex genes abdominal-A and abdominal-B by cis-regulatory regions in *Drosophila* embryos. *Development.* 1991 Feb; 111(2): 437-49.
- [Sanchez-Herrero E, Akam M.](#) Spatially ordered transcription of regulatory DNA in the bithorax complex of *Drosophila*. *Development.* 1989 Oct;107 (2):321-9.
- [Santamaria P, Garcia-Bellido A.](#) Localization and growth pattern of the tergite Anlage of *Drosophila*. *J Embryol Exp Morphol.* 1972 Oct; 28 2): 397-417.
- [Saurin AJ, Shao Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Kingston RE.](#) A *Drosophila* Polycomb group complex includes Zeste and dTAFII proteins. *Nature.* 2001 Aug 9; 412 (6847): 655-60.
- [Scrittore L, Hans F, Angelov D, Charra M, Prigent C, Dimitrov S.](#) pEg2 aurora-A kinase, histone H3 phosphorylation, and chromosome assembly in *Xenopus* egg extract. *J Biol Chem.* 2001 Aug 10; 276 (32): 30002-10.
- [Schlossherr J, Eggert H, Paro R, Cremer S, Jack RS.](#) Gene inactivation in *Drosophila* mediated by the Polycomb gene product or by position-effect variegation does not involve major changes in the accessibility of the chromatin fibre. *Mol Gen Genet.* 1994 May 25; 243 (4): 453-62.
- [Schroder C, Tautz D, Seifert E, Jackle H.](#) Differential regulation of the two transcripts from the *Drosophila* gap segmentation gene hunchback. *EMBO J.* 1988 Sep; 7(9): 2881-7.
- [Shao Z, Raible F, Mollaaghababa R, Guyon JR, Wu CT, Bender W, Kingston RE.](#) Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex. *Cell.* 1999 Jul 9; 98 (1): 37-46.
- [Shearn A.](#) Complementation analysis of late lethal mutants of *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 1974 May; 77(1):115-25.
- Shearn, A., 1977 Mutational dissection of imaginal disc development in *Drosophila melanogaster*. *Am. Zool.* **17**: 585-594.
- [Shearn A, Hersperger G, Hersperger E.](#) Genetic analysis of two allelic temperature-sensitive mutants of *Drosophila melanogaster* both of which are zygotic and maternal-effect lethals. *Genetics.* 1978 Jun; 89(2):341-53.
- [Shearn A.](#) The ash-1, ash-2 and trithorax genes of *Drosophila melanogaster* are functionally related. *Genetics.* 1989 Mar; 121 (3): 517-25
- [Sheldon CC, Rouse DT, Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES.](#) The molecular basis of vernalization: the central role of FLOWERING LOCUS C (FLC). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Mar 28; 97 (7): 3753-8.
- [Shimell MJ, Simon J, Bender W, O'Connor MB.](#) Enhancer point mutation results in a homeotic transformation in *Drosophila*. *Science.* 1994 May 13; 264 (5161): 968-71.
- [Shimell MJ, Peterson AJ, Burr J, Simon JA, O'Connor MB.](#) Functional analysis of repressor binding sites in the iab-2 regulatory region of the abdominal-A homeotic gene. *Dev Biol.* 2000 Feb 1; 218 (1): 38-52.
- [Showell C, Cunliffe VT.](#) Identification of putative interaction partners for the *Xenopus* Polycomb-group protein Xeed. *Gene.* 2002 May 29; 291 (1-2): 95-104.
- [Sigrist CJ, Pirrotta V.](#) Chromatin insulator elements block the silencing of a target gene by the *Drosophila* polycomb response element (PRE) but allow trans interactions between PREs on different chromosomes. *Genetics.* 1997 Sep; 147 (1): 209-21.
- [Simon J.](#) Locking in stable states of gene expression: transcriptional control during *Drosophila* development. *Curr Opin Cell Biol.* 1995 Jun; 7(3): 376-85. Review.

[Simon J, Peifer M, Bender W, O'Connor M.](#) Regulatory elements of the bithorax complex that control expression along the anterior-posterior axis. *EMBO J.* 1990 Dec; 9(12): 3945-56.

[Simon J, Chiang A, Bender W.](#) Ten different Polycomb group genes are required for spatial control of the abdA and AbdB homeotic products. *Development.* 1992 Feb; 114 (2): 493-505.

[Simon J, Chiang A, Bender W, Shimell MJ, O'Connor M.](#) Elements of the Drosophila bithorax complex that mediate repression by Polycomb group products. *Dev Biol.* 1993 Jul; 158(1): 131-44.

[Sinclair DA, Campbell RB, Nicholls F, Slade E, Brock HW.](#) Genetic analysis of the additional sex combs locus of Drosophila melanogaster. *Genetics.* 1992 Apr; 130 (4): 817-25.

[Sinclair DA, Clegg NJ, Antonchuk J, Milne TA, Stankunas K, Ruse C, Grigliatti TA, Kassis JA, Brock HW.](#) Enhancer of Polycomb is a suppressor of position-effect variegation in Drosophila melanogaster. *Genetics.* 1998 Jan; 148 (1): 211-20.

[Sinclair DA, Milne TA, Hodgson JW, Shellard J, Salinas CA, Kyba M, Randazzo F, Brock HW.](#) The Additional sex combs gene of Drosophila encodes a chromatin protein that binds to shared and unique Polycomb group sites on polytene chromosomes. *Development.* 1998 Apr; 125 (7): 1207-16.

[Sipos L, Mihaly J, Karch F, Schedl P, Gausz J, Gyurkovics H.](#) Transvection in the Drosophila Abd-B domain: extensive upstream sequences are involved in anchoring distant cis-regulatory regions to the promoter. *Genetics.* 1998 Jun; 149 (2): 1031-50.

[Small S, Kraut R, Hoey T, Warrior R, Levine M.](#) Transcriptional regulation of a pair-rule stripe in Drosophila. *Genes Dev.* 1991 May; 5 (5): 827-39.

[Smith ER, Allis CD, Lucchesi JC.](#) Linking global histone acetylation to the transcription enhancement of X-chromosomal genes in Drosophila males. *J Biol Chem.* 2001 Aug 24; 276(34): 31483-6.

[Soeller WC, Oh CE, Kornberg TB.](#) Isolation of cDNAs encoding the Drosophila GAGA transcription factor. *Mol Cell Biol.* 1993 Dec; 13 (12): 7961-70.

[Soto MC, Chou TB, Bender W.](#) Comparison of germline mosaics of genes in the Polycomb group of Drosophila melanogaster. *Genetics.* 1995 May; 140 (1): 231-43

[Spofford JB.](#) Single-locus modification of position-effect variegation in Drosophila melanogaster. I. White variegation. *Genetics.* 1967 Dec; 57 (4): 751-66.

[Springer NM, Danilevskaya ON, Hermon P, Helentjaris TG, Phillips RL, Kaeppler HF, Kaeppler SM.](#) Sequence relationships, conserved domains, and expression patterns for maize homologs of the polycomb group genes E(z), esc, and E(Pc). *Plant Physiol.* 2002 Apr; 128 (4): 1332-45.

[Sudarsanam P, Iyer VR, Brown PO, Winston F.](#) Whole-genome expression analysis of snf/swi mutants of Saccharomyces cerevisiae. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Mar 28; 97 (7): 3364-9.

[Strahl BD, Ohba R, Cook RG, Allis CD.](#) Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in Tetrahymena. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Dec 21; 96 (26): 14967-72.

[Stankunas K, Berger J, Ruse C, Sinclair DA, Randazzo F, Brock HW.](#) The enhancer of polycomb gene of Drosophila encodes a chromatin protein conserved in yeast and mammals. *Development.* 1998 Oct; 125 (20): 4055-66.

[Stassen MJ, Bailey D, Nelson S, Chinwalla V, Harte PJ.](#) The Drosophila trithorax proteins contain a novel variant of the nuclear receptor type DNA binding domain and an ancient conserved motif found in other chromosomal proteins. *Mech Dev.* 1995 Aug; 52(2-3): 209-23.

[Stein A, Bina M.](#) A signal encoded in vertebrate DNA that influences nucleosome positioning and alignment. *Nucleic Acids Res.* 1999 Feb 1; 27 (3): 848-53.

- [Strouboulis J, Wolffe AP.](#) Functional compartmentalization of the nucleus. *J Cell Sci.* 1996 Aug; 109 (Pt 8): 1991-2000. Review.
- [Struhl G.](#) A gene product required for correct initiation of segmental determination in *Drosophila*. *Nature.* 1981 Sep 3; 293 (5827): 36-41.
- [Struhl G, Akam M.](#) Altered distributions of Ultrabithorax transcripts in extra sex combs mutant embryos of *Drosophila*. *EMBO J.* 1985 Dec 14 (12): 3259-64.
- [Struhl G, White RA.](#) Regulation of the Ultrabithorax gene of *Drosophila* by other bithorax complex genes. *Cell.* 1985 Dec; 43 (2 Pt 1): 507-19.
- [Strutt H, Cavalli G, Paro R.](#) Co-localization of Polycomb protein and GAGA factor on regulatory elements responsible for the maintenance of homeotic gene expression. *EMBO J.* 1997 Jun; 16 (12): 3621-32.
- [Strutt H, Paro R.](#) The polycomb group protein complex of *Drosophila melanogaster* has different compositions at different target genes. *Mol Cell Biol.* 1997 Dec; 17 (12): 6773-83.
- [Sugiyama K, Sugiura K, Hara T, Sugimoto K, Shima H, Honda K, Furukawa K, Yamashita S, Urano T.](#) Aurora-B associated protein phosphatases as negative regulators of kinase activation. *Oncogene.* 2002 May 9; 21 (20): 3103-11.
- [Tamkun JW.](#) The role of brahma and related proteins in transcription and development. *Curr Opin Genet Dev.* 1995 Aug; 5 (4): 473-7. Review.
- [Tanabe H, Habermann FA, Solovei I, Cremer M, Cremer T.](#) Non-random radial arrangements of interphase chromosome territories: evolutionary considerations and functional implications. *Mutat Res.* 2002 Jul 25; 504(1-2): 37-45.
- [Tautz D.](#) Regulation of the *Drosophila* segmentation gene hunchback by two maternal morphogenetic centres. *Nature.* 1988 Mar 17; 332 (6161): 281-4.
- [Teng Y, Yu S, Waters R.](#) The mapping of nucleosomes and regulatory protein binding sites at the *Saccharomyces cerevisiae* MFA2 gene: a high resolution approach. *Nucleic Acids Res.* 2001 Jul 1; 29 (13):E64-4.
- [Tian M, Martin GS.](#) Reduced phosphotyrosine binding by the v-Src SH2 domain is compatible with wild-type transformation. *Oncogene.* 1996 Feb 15; 12 (4): 727-34.
- [Tie F, Furuyama T, Harte PJ.](#) up proteins ESC and E(Z) bind directly to each other and co-localize at multiple chromosomal sites. *Development.* 1998 Sep; 125(17):3483-96.
- [Tie F, Furuyama T, Prasad-Sinha J, Jane E, Harte PJ.](#) The *Drosophila* Polycomb Group proteins ESC and E(Z) are present in a complex containing the histone-binding protein p55 and the histone deacetylase RPD3. *Development.* 2001 Jan; 128(2): 275-86.
- [Tillib S, Petruk S, Sedkov Y, Kuzin A, Fujioka M, Goto T, Mazo A.](#) Trithorax- and Polycomb-group response elements within an Ultrabithorax transcription maintenance unit consist of closely situated but separable sequences. *Mol Cell Biol.* 1999 Jul; 19 (7): 5189-202.
- [Tiong S, Bone LM, Whittle JR.](#) Recessive lethal mutations within the bithorax-complex in *Drosophila*. *Mol Gen Genet.* 1985; 200 (2) 335-42.
- [Tomotsune D, Takihara Y, Berger J, Duhl D, Joo S, Kyba M, Shirai M, Ohta H, Matsuda Y, Honda BM, Simon J, Shimada K, Brock HW, Randazzo F.](#) A novel member of murine Polycomb-group proteins, Sex comb on midleg homolog protein, is highly conserved, and interacts with RAE28/mph1 in vitro. *Differentiation.* 1999 Dec; 65 (4): 229-39.

- [Travers AA, Klug A.](#) The bending of DNA in nucleosomes and its wider implications. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1987 Dec 15; 317 (1187): 537-61. Review.
- [Tripoulas N, LaJeunesse D, Gildea J, Shearn A.](#) The *Drosophila ash1* gene product, which is localized at specific sites on polytene chromosomes, contains a SET domain and a PHD finger. *Genetics.* 1996 Jun; 143 (2): 913-28.
- [Tschiersch B, Hofmann A, Krauss V, Dorn R, Korge G, Reuter G.](#) The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene *Su(var)3-9* combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *EMBO J.* 1994 Aug 15; 13 (16): 3822-31.
- [Tsukiyama T, Becker PB, Wu C.](#) ATP-dependent nucleosome disruption at a heat-shock promoter mediated by binding of GAGA transcription factor. *Nature.* 1994 Feb 10; 367 (6463): 525-32.
- [Tsukiyama T, Daniel C, Tamkun J, Wu C.](#) ISWI, a member of the SWI2/SNF2 ATPase family, encodes the 140 kDa subunit of the nucleosome remodeling factor. *Cell.* 1995 Dec 15; 83(6): 1021-6.
- [Turner BM.](#) Histone acetylation as an epigenetic determinant of long-term transcriptional competence. *Cell Mol Life Sci.* 1998 Jan; 54 (1): 21-31. Review.
- [van Leeuwen F, Gafken PR, Gottschling DE.](#) Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core. *Cell.* 2002 Jun 14; 109 (6): 745-56.
- [van Lohuizen M, Tijms M, Voncken JW, Schumacher A, Magnuson T, Wientjens E.](#) Interaction of mouse polycomb-group (Pc-G) proteins Enx1 and Enx2 with Eed: indication for separate Pc-G complexes. *Mol Cell Biol.* 1998 Jun; 18(6):3572-9.
- [Varga-Weisz PD, Wilm M, Bonte E, Dumas K, Mann M, Becker PB.](#) Chromatin-remodelling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II. *Nature.* 1997 Aug 7; 388 (6642): 598-602. Erratum in: *Nature* 1997 Oct 30; 389 (6654): 1003
- [Varga-Weisz PD, Dalgaard JZ.](#) A mark in the core: silence no more! *Mol Cell.* 2002 Jun; 9 (6): 1154-6.
- [Verreault A, Kaufman PD, Kobayashi R, Stillman B.](#) Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4. *Cell.* 1996 Oct 4; 87 (1): 95-104.
- [Visser AE, Jaunin F, Fakan S, Aten JA.](#) High resolution analysis of interphase chromosome domains. *J Cell Sci.* 2000 Jul; 113 (Pt 14): 2585-93.
- [Wade PA, Jones PL, Vermaak D, Wolffe AP.](#) A multiple subunit Mi-2 histone deacetylase from *Xenopus laevis* cofractionates with an associated Snf2 superfamily ATPase. *Curr Biol.* 1998 Jul 2; 8(14): 843-6.
- [Wallrath LL, Elgin SC.](#) Position effect variegation in *Drosophila* is associated with an altered chromatin structure. *Genes Dev.* 1995 May 15; 9 (10): 1263-77.
- [Wang J, Mager J, Chen Y, Schneider E, Cross JC, Nagy A, Magnuson T.](#) Imprinted X inactivation maintained by mouse Polycomb group gene. *Nat Genet.* 2001 Aug; 28 (4): 371-5.
- [Wasylyk B, Oudet P, Chambon P.](#) Preferential in vitro assembly of nucleosome cores on some AT-rich regions of SV40 DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979 Oct 10; 7 (3): 705-13.
- [White RA, Lehmann R.](#) A gap gene, hunchback, regulates the spatial expression of Ultrabithorax. *Cell.* 1986 Oct 4; 7 2): 311-21.
- [White RA, Wilcox M.](#) Protein products of the bithorax complex in *Drosophila*. *Cell.* 1984 Nov; 39 (1): 163-71.
- [Wieschaus E, Szabad J.](#) The development and function of the female germ line in *Drosophila melanogaster*: a cell lineage study. *Dev Biol.* 1979 Jan; 68(1): 29-46.
- [Wolberger C.](#) Homeodomain interactions *Curr Opin Struct Biol.* 1996 Feb; 6(1):62-8. Review.

- [Wu CT, Howe M.](#) A genetic analysis of the Suppressor 2 of zeste complex of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 1995 May; 140(1): 139-81
- [Wu CT, Jones RS, Lasko PF, Gelbart WM.](#) Homeosis and the interaction of zeste and white in *Drosophila*. *Mol Gen Genet*. 1989 Sep; 218(3): 559-64.
- [Yabuki H, Dattagupta N, Crothers DM.](#) Orientation of nucleosomes in the thirty-nanometer chromatin fiber. *Biochemistry*. 1982 Sep 28; 21(20): 5015-20.
- [Yanofsky MF, Ma H, Bowman JL, Drews GN, Feldmann KA, Meyerowitz EM.](#) The protein encoded by the Arabidopsis homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature*. 1990 Jul 5; 346(6279): 35-9.
- [Yoshida N, Yanai Y, Chen L, Kato Y, Hiratsuka J, Miwa T, Sung ZR, Takahashi S.](#) EMBRYONIC FLOWER2, a novel polycomb group protein homolog, mediates shoot development and flowering in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2001 Nov; 13 (11): 2471-81.
- [Zavortink M, Sakonju S.](#) The morphogenetic and regulatory functions of the *Drosophila* Abdominal-B gene are encoded in overlapping RNAs transcribed from separate promoters. *Genes Dev*. 1989 Dec; 3 (12A): 1969-81
- [Zheng Q, Simel EJ, Klein PE, Royer MT, Houtz RL.](#) Expression, purification, and characterization of recombinant ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit neptilon-methyltransferase. *Protein Expr Purif*. 1998 Oct; 14 (1): 104-12.
- [Zhang CC, Bienz M.](#) Segmental determination in *Drosophila* conferred by hunchback (hb), a repressor of the homeotic gene *Ultrabithorax* (Ubx). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Aug 15; 89(16): 7511-5.
- [Zhang Y, LeRoy G, Seelig HP, Lane WS, Reinberg D.](#) The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. *Cell*. 1998 Oct 16; 95 (2): 279-89.
- [Zink B, Engstrom Y, Gehring WJ, Paro R.](#) Direct interaction of the Polycomb protein with Antennapedia regulatory sequences in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J*. 1991 Jan; 10 (1): 153-62.
- [Zink B, Paro R.](#) In vivo binding pattern of a trans-regulator of homeotic genes in *Drosophila melanogaster*. *Nature*. 1989 Feb 2; 337 (6206): 468-71.
- [Zink D, Paro R.](#) *Drosophila* Polycomb-group regulated chromatin inhibits the accessibility of a trans-activator to its target DNA. *EMBO J*. 1995 Nov 15; 14 (22): 5660-71.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

abd-A	<i>abdominal-A Drosophila m.</i> homeotikus gén
Abd-B	<i>Abdominal-B Drosophila m.</i> homeotikus gén
	<u>A</u> TP-dependent <u>C</u> hromatin- <u>A</u> ssembly and - <u>r</u> emodeling <u>F</u> actor, a nukleoszómák mozgására képes ISWI fehérjét tartalmazó fehérjekomplex
<i>ash1</i>	<i>absent, small, or homeotic discs1</i>
<i>ash2</i>	<i>absent, small, or homeotic discs2</i>
<i>Asx</i>	<i>Additional sex combs</i>
AT horog	TPKRPRGRPKK-szerű szekvenciát tartalmazó DNS-kötő motívum
<i>brm</i>	<i>brahma</i>
BX-C	<i>bithorax-complex Drosophila m.</i> homeotikus génkomplex
CAF1	<u>C</u> hromatin <u>A</u> ssembly <u>F</u> actor 1 alegység, másnéven NURF55, a PRC2 komplex tagja, hiszton specifikus saperon
chromo-domain	Chromatin Organisation Modifier Domén
<i>corto</i>	<i>corto</i>
<i>crm</i>	<i>cramped</i>
CHRAC	<u>C</u> hromatin <u>A</u> ccessibility <u>C</u> omplex, a nukleoszómák mozgására képes ISWI fehérjét tartalmazó fehérjekomplex
<i>Df(3R)red-P93</i>	a <i>trx</i> gént eltávolító deléción
<i>E(Pc)</i>	<i>Enhancer of Polycomb</i>
<i>E(z)</i>	<i>Enhancer of zeste</i>
<i>esc</i>	<i>extra sex combs</i>
<i>eve</i>	<i>even skipped pair-rule</i> gén
<i>Fab-7¹</i>	<i>Frontabdominal-1</i> funkcionyeréses <i>BX-C</i> mutáció
<i>fs(1)h</i>	<i>female sterile (1) homoeotic</i>
<i>ftz</i>	<i>fushi tarazu</i>
GAL-4	GAL-4 DNS-kötő transzkripció aktivátor
<i>grh</i>	<i>grainy head</i>
<i>gt</i>	<i>giant</i>
<i>HDAC1</i>	<i>HISZTON-DEACETILÁZ 1</i> az <i>Rpd3</i> gén terméke
<i>hb</i>	<i>hunchback</i>
<i>Iswi</i>	<i>imitation SWI</i>
<i>kis</i>	<i>kismet</i>
<i>kni</i>	<i>knirps Drosophila m.</i> gap gén
<i>Kr</i>	<i>Krüppel Drosophila m.</i> gap gén
<i>kto</i>	<i>kohtalo</i>
<i>lid</i>	<i>little imaginal discs</i>
<i>lac-Z</i>	β -galaktozidáz riportergén
MAR	<u>M</u> atrix <u>A</u> ttachment <u>R</u> egion, a kromatin mátrixhoz asszociált DNS régiók
<i>mdg4</i>	<i>modifier of mdg4</i>
<i>mor</i>	<i>moira</i>
<i>mx</i>	<i>multi sex combs</i>
<i>nej</i>	<i>nejire</i>
<i>nos</i>	<i>nanos Drosophila m.</i> maternális gén
NURF	<u>N</u> ucleosome <u>R</u> emodeling <u>F</u> actor, a nukleoszómák mozgására képes ISWI fehérjét tartalmazó fehérjekomplex

<i>osa</i>	<i>osa</i>
PEV	<u>P</u> ozíció <u>E</u> ffektus <u>V</u> ariegáció
<i>pho</i>	pleiohomeotic
<i>Pc</i>	<i>Polycomb</i>
<i>Pc-G</i>	<i>Polycomb</i> -csoport epigenetikus represszor fehérjét kódoló gének csoportja
<i>Pcl</i>	<i>Polycomblike</i>
<i>ph-d</i>	<i>polyhomeotic distal</i>
<i>ph-p</i>	<i>polyhomeotic proximal</i>
PHD ujj	Plant Homeodomain (PHD) C4HC3 zinc-ujj-szerű motívum
PRMT	<u>P</u> rotein- <u>M</u> etil <u>T</u> ranszferáz, fehérjék metilációjára képes fehérje
<i>Pp1-87B</i>	<i>87B Protein phosphatase 1</i>
PRC1	<u>P</u> OLYCOMB <u>R</u> EPRESSIVE <u>C</u> OMPLEX 1
PRC2	<u>P</u> OLYCOMB <u>R</u> EPRESSIVE <u>C</u> OMPLEX 2
PRE	<u>P</u> olycomb <u>R</u> esponse <u>E</u> lement <u>P</u> OLYCOMB-fehérjék epigenetiku represszáló hatását mediáló DNS-szakasz
Pre-SET	9 konzervált ciszteint tartalmazó zink-kötő motívum, más néven SAC-domén, vagy cisztein gazdag domén
<i>Psc</i>	<i>Posterior sex combs</i>
<i>psq</i>	<i>pipsquek</i>
<i>Rpd3</i>	<i>Rpd3</i>
SAR	<u>S</u> caffold <u>A</u> ttachment <u>R</u> egions, közvetlenül a kromatin vázhoz kapcsolódó DNS régiók
SANT domént	<i>YAAC(G/T)G szekvenciát felismerő DNS-kötő fehérje domén</i>
SET-domén	<u>S</u> U(VAR)3-9, <u>E</u> NHANCER OF ZESTE, <u>T</u> HRITHORAX fehérjékben konzervált 130 aminosav hosszúságú konzervált domén
SNF5	<i>Kulcsszerepet betöltő SWI/SNF fehérje</i>
<i>Sce</i>	<i>Sex combs extra</i>
<i>Scm</i>	<i>Sex combs on midleg</i>
<i>sls</i>	<i>sallimus</i>
<i>skd</i>	<i>skuld</i>
<i>Snr1</i>	<i>Snf5-related1</i>
<i>Su(Pc)37D</i>	<i>Suppressor of Polycomb at 37D</i>
<i>Su(z)2</i>	<i>Suppressor of zeste 2</i>
<i>Su(z)2D</i>	<i>Suppressor of zeste 2 distal</i>
<i>Su(z)12</i>	<i>Suppressor of zeste 12</i>
<i>sxc</i>	<i>super sex combs</i>
SWI/SNF	Nukleoszómák mozgására képes élesztőben azonosított fehérjekomplex
T7	kisméretű virális DNS-polimeráz
TAC1	<u>T</u> rithorax <u>A</u> cetylation <u>C</u> omplex: a TRX , a NEJ (dCBP), és a SBF fehérjéket tartalmazó hiszton acetil-transzferáz aktivitású fehérjekomplex
<i>tara</i>	<i>taranis</i>
TRE	<u>T</u> rithorax <u>R</u> esponse <u>E</u> lement <u>T</u> RITHORAX-fehérjék epigenetiku aktiváló hatását mediáló DNS-szakasz
<i>Trl</i>	<i>Trithorax-like, GAGA-faktor</i>
<i>trr</i>	<i>trithorax-related</i>
<i>trx</i>	<i>trithorax</i>

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

***trx*-csoport**

UAS

Ubx

urd

X-ChIP

vtd

w

z

trithorax-csoport

GAL-4 transzkripció faktor kötőhelye

Ultrabithorax Drosophila m. homeotikus gén

urdur

kémiaiilag, illetve UV-besugárzás segítségével keresztkötött
kromatin immunoprecipitációja

verthandi

white

zeste

KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK:

[Bristow DR, Banford PC, Bajusz I, Vedat A, Young JM.](#) : Desensitization of histamine H1 receptor-mediated inositol phosphate accumulation in guinea pig cerebral cortex slices. *Br J Pharmacol.* 1993 Sep; 110 (1): 269-74. [Related Articles](#), [Links](#)

[Bajusz I, Sipos L, Gyorgypal Z, Carrington EA, Jones RS, Gausz J, Gyurkovics H.](#) : The *Trithorax-mimic* allele of *Enhancer of zeste* renders active domains of target genes accessible to *Polycomb*-group-dependent silencing in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 2001 Nov; 159 (3): 1135-50 [Related Articles](#), [Links](#)

ELŐKÉSZÜLETBEN:

Bajusz I., Sauer F., Gyurkovics H. : The ENHANCER OF ZESTE protein is capable of stabilizing the inactive state of chromatin domains by histone methylation

Bajusz I., Sipos L., Pintér L., Gyurkovics H.: The role of the POLYCOMB-group proteins in the active chromatin domains

Honti V., Blastyák A., Pintér L., Bajusz I., Gausz J., Gyurkovics H.: Mapping of the *iab-7* TRE in *Drosophila melanogaster*

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Doktori dolgozatom befejezésekor hálásan mondok köszönetet mindazoknak, akik megteremtették azokat a feltételeket, hogy elvégezhessem ezt a munkát, segítettek, bátorítottak és bíztak bennem.

Köszönöm családom minden tagjának, nagynénéimnek és hugaimnak, hogy megértették mennyire fontos nekem ez a munka, és mindig mindenben támogattak. Külön köszönöm két fiamnak Péternek és Máténak megértésüket, szeretetüket és türelmüket. Köszönöm barátaim segítségét.

Köszönöm tanárainak, elsősorban Dr. Maróy Péternek és Dr. Gausz Jánosnak, hogy megismertették és megszerettették velem a genetikát. Köszönöm Dr. Gausz Jánosnak és Dr. Gyurkovics Henriknek, hogy kiválasztottak a csoportjukba, és Dr. Raskó Istvánnak, hogy megtartott az SZBK Genetikai Intézetében.

Köszönöm volt és jelenlegi labortársaimnak, és minden hatodik emeleti rovarosnak, hogy tanítottak, tanácsaikkal, ötleteikkel, tapasztalataikkal és eszközeikkel segítettek ennek a dolgozatnak az elkészültét.

Örökké adósa maradok Gyurkovics Henriknek a hosszú évek alatt kialakított szemléletért, az elmondhatatlanul sok átadott tudásért, amit az együtt töltött közel egy évtizedben kaptam tőle. Köszönöm Dr. Sipos Lászlónak, a *Trm* mutáns izolálójának, hogy bevont a munkába, és köszönöm a genetikai kísérletek során adott minden ötletét, tanácsát és segítségét. Köszönöm Tony Greenbergnek, hogy rendelkezésemre bocsátotta az általa izolált *Trm* fenotípusú *E(z)* allélt. Köszönöm asszisztenseinknek: Dongóné Gyányi Editnek és Kiss Anitának mindig pontos és megbízható munkáját, figyelmét és türelmét. Köszönetet mondok

Martonosi Györgynének és Magyaré Gyöngyinek a kifogástalan táptalaj biztosításával és a törzsek fenntartásával biztosított technikai segítségéért.

Köszönöm Dr. Frank Sauernek, hogy laboratóriumában Heidelbergben és Los Angelesben lehetőséget biztosított olyan kísérletek elvégzésére, amelyekre Magyarországon nem volt lehetőségem. Köszönöm a külföldi laborok minden tagjának, de különösen Dr. Christian Beiselnek, és Jamie Greennek a biokémiai kísérletekhez nyújtott segítségét.

Köszönöm Blastyák Andrásnak, Honti Viktornak és Pintér Lajosnak a végtelenbe nyúló élvezetes vitákat, az ötleteket és megbeszéléseket és hogy mindig újra lelket öntöttek belém, amikor elkeseredtem. Kiss Anitával és Magyaré Gyöngyivel együtt nagyban hozzájárultak ahhoz, hogy mindig örömmel lépjek be a laborba. Külön köszönet illeti Honti Viktort és Pintér Lajost a dolgozat javításában és a számítógépes problémák megoldásában nyújtott segítségükért. Köszönöm a fotolabor és a nyomda munkatársainak és különösen Tóth Sándorné Marikának a dolgozat nyomtatásában és sokszorosításában nyújtott segítségét.

Köszönöm opponenseimnek Dr. Kis Istvánnak és Dr. Török Tibornak áldozatos munkáját a dolgozat első verziójának javítását és segítő észrevételeit.

Köszönettel tartozom az MTA három éves Fiatal Kutatói és az European Molecular Biology Organisation (EMBO) alapítvány három hónapos ösztöndíjáért.