

## **Abstract**

Acetylation of histone protein in nucleosomes is one of the various known mechanisms altering the accessibility of the chromatin template. The Gcn5-containing histone acetyltransferase (HAT) complexes harbor ADA-type adaptor proteins, which regulate the template recognition and lysine specificity of Gcn5. The dADA2b adaptor subunit of the acetylation module of dSAGA, one of the two different *Drosophila* Gcn5-containing HAT complexes, contributes to the determination of the histone H3 lysine 9 and 14 specific acetylation activity of the complex. Diverse and essential functions of ADA2 adaptors are suggested by the fact *dAda2b* gene produces two mRNAs and protein forms.

Transcriptome analysis of *dAda2b* mutants revealed only a small subset of genes (5 %) were regulated by dSAGA complex. Despite the supposed role of histone acetylation in transcription activation, more than half of the dSAGA-dependent genes showed increased transcription levels in the absence of dSAGA specific acetylation. We demonstrated that the dADA2b short isoform alone can partially provide the *dAda2b* function both in development, in acetylation activity and in regulation of transcription. According to the binding pattern of dADA2b on up- and downregulated genes, the dSAGA function could be directly responsible for either expression changes. Based on the examination of dSAGA specific H3K9 acetylation level we concluded that the presence of the dSAGA specific acetylation on promoters is essential in the transcription regulation of several genes but it can contribute not only to gene activation but also to gene repression.

Our results revealed that the dSAGA HAT activity can be responsible for the establishment of a global H3K9 acetylation pattern of euchromatic regions and through the maintenance of an acetylated, accessible chromatin structure, dSAGA can also contribute to the regulation of transcription.

## **Bevezetés**

Az eukarióta sejtek működéséhez nélkülözhetetlen a genom nagymértékű, ugyanakkor dinamikus összetömörítése. Ezt a különböző fehérje faktorok közreműködésével létrejövő kromatin szerkezet biztosítja, amely alapegységeit a hiszton (H2A, H2B, H3, H4) fehérjékre feltekeredő 147 bázispárnyi DNS-ből felépülő nukleosómák alkotják (Kornberg, 1974). A tömörítés különböző szintjei eltérő mértékű hozzáférhetést biztosítanak a DNS szálon lezajló folyamatokat (transzkripció, DNS replikáció és hibajavítás) végző faktorok számára (Cockerill, 2011). Így a kromatin szerkezet tömörsége, illetve annak dinamikus átalakítását végző mechanizmusok fontos szabályozó szerepet töltenek be a transzkripció folyamata során. A kromatin szerkezet dinamikus átalakításáért felelős mechanizmusok egyike a nukleosómális hiszton fehérjéken megjelenő poszttranszlációs módosítások (Peterson and Laniel, 2004). Az egyik, intenzíven tanulmányozott ilyen módosítás a hiszton fehérjék acetilációja (Kouzarides, 2007). A nukleosómák hiperacetilált állapota egy nyitottabb, míg a hipoacetilált nukleosómák egy tömörebb kromatin szerkezettel hozhatók összefüggésbe (Mutskov *et al.*, 1998). Számos megfigyelés alapján az aktív transzkripció folyamatához egy hiperacetilált, nyitott kromatin szerkezet köthető, viszont az acetiláció szabályozó szerepének pontos részletei még kevésbé ismertek.

A hiszton acetiláció funkciójáról rendelkezésünkre álló ismeretanyag létrehozásához nagymértékben hozzájárulnak a hiszton acetiltranszferáz (HAT) enzimek vizsgálata során nyert információk (Brownell *et al.*, 1996). Az egyik legjobban jellemzett HAT aktivitású fehérje a Gcn5, amely több alegységes fehérje komplex tagjaként látja el acetilációs funkcióját (Roth *et al.*, 2001). A Gcn5-tartalmú HAT komplexek ADA-típusú adaptor fehérjéket is tartalmaznak, amelyek a Gcn5 fehérje aktivitásának és specifikitásának meghatározásában játszanak szerepet

(Balasubramanian *et al.*, 2002). A *Drosophila melanogaster*-ben előforduló egyik Gcn5-tartalmú HAT komplex, a dSAGA acetilációs moduljának egyik alegysége a dADA2b fehérje, amely szükséges a komplex H3 hiszton 9-es és 14-es lizinjére specifikus acetilációs aktivitásához (Muratoglu *et al.*, 2003; Pankotai *et al.*, 2005). Az ADA2 fehérjék sokszínű funkciójára utal, hogy a *Drosophila Ada2b* génről több mRNS és fehérje izoforma termelődik. A két dADA2b fehérje izoforma N-terminális régiója azonos, mindkettő tartalmaz egy-egy, az ADA2 fehérjékre jellemző ZZ cink-ujj és SANT domént, viszont a C-terminális régió eltérő. Itt, az ADA2 fehérjékre specifikus ADA motívumból a rövidebb izoformában (dADA2bS) csak kettő, míg a hosszabb izoformában (dADA2bL) három darab található meg (Pankotai *et al.*, 2013). Mivel ezeknek az ADA motívumoknak feltételezhetően az ADA2 fehérjék más komplex alegységekkel kialakított kölcsönhatásaik létrejöttében fontos szerepe lehet, az eltérő számú ADA motívumot tartalmazó dADA2b izoformák más-más folyamatok szabályozásában vehetnek részt.

### Célkitűzések

Munkám során a teljes dADA2b funkciót eltávolító (*dAda2b<sup>842</sup>*) deléció, valamint a rövid dADA2bS izoformát kifejező transzgenikus törzsek alkalmazásával megvizsgáltam, hogy a dADA2b fehérjéken keresztül a dSAGA acetilációs aktivitása hogyan járul hozzá a génműködés szabályozásához. Ennek keretében a következő kérdéseket tekintettem át:

1. **Késői L3 lárva és korai báb állapotban mely gének expresszióját szabályozza a dSAGA specifikus acetiláció?**
2. **A dSAGA komplexre specifikus dADA2b alegység két izoformája hogyan járul hozzá a dSAGA génműködés szabályozásában betöltött funkciójához?**
3. **A dSAGA komplex és az általa létrehozott H3K9 acetiláció közvetlenül befolyásolja-e a dSAGA-függő transzkripciót mutató gének expresszióját?**

### Eredmények

#### 1. A dSAGA acetiltranszferáz komplex szabályozása alatt álló gének azonosítása

A hiperacetilált nukleoszómákat már régóta egy nyitottabb kromatin szerkezettel és aktív transzkripcióval hozták összefüggésbe, míg a deacetiláció folyamata represszált génműködéshez köthető. Korábban csirke vörösvérsejtekben expresszálandó, és így nagyfokú DNáz érzékenységet mutató globin gén területén kromatin immunprecipitációs (ChIP) kísérletekben acetilált hiszton fehérjék jelenlétét mutatták ki (Hebbes *et al.*, 1994), valamint élesztőben a transzkripcióban inaktív genomikus területeken alacsony mértékű hiszton acetilációt figyeltek meg (Braunstein *et al.*, 1993). *S. cerevisiae*-ből és emlős sejtekből származó adatok is azt igazolják, hogy az aktívan átíródó gének promótereinek területén magas szintű H3K9 és H3K14 acetiláció mutatható ki (Pokholok *et al.*, 2005). Ezekből az adatokból kiindulva megvizsgáltuk, hogy vajon a dSAGA által létrehozott H3K9 és K14 acetiláció is egy, a transzkripció aktiválásával összefüggésbe hozható hiszton módosítás-e, illetve hogy a dSAGA komplex milyen gének működésének a szabályozásában vesz részt.

Munkacsoportunkban először meghatároztuk, hogy adott fejlődési állapotokban mely gének expresszióját szabályozza a dSAGA specifikus acetiláció. Ehhez vad típusú és *dAda2b* mutáns egyedeken két fejlődési állapotban (késői L3 lárva és korai báb állapot) teljes transzkriptum analízist végeztünk. Összehasonlítva a génexpressziós profilokat mindkét fejlődési állapotban meghatároztuk, hogy a dADA2b fehérje hiányában mely gének expressziója tér el a vad típusétól (Zsindely *et al.*, 2009). A dSAGA komplex mindkét fejlődési állapotban a gének csak egy kis részének (kb. 5 %) a szabályozásában vesz részt. Az acetiláció funkciójáról eddig rendelkezésünkre álló adatoktól eltérően ezen dSAGA-függő géneknek több mint a fele nem csökkent, hanem emelkedett mértékű expressziót mutatott a dSAGA specifikus acetiláció hiányában. Mind a két vizsgált fejlődési állapotban hasonló funkcióval rendelkező gének mutattak dADA2b-függő expressziót. Mindkét fejlődési állapotban hasonló funkcióval rendelkező gének mutattak dADA2b-függő expressziót. A biológiai folyamatoknak megfelelő génontológiai csoportosítás során a csökkent expressziót mutató gének között mindkét

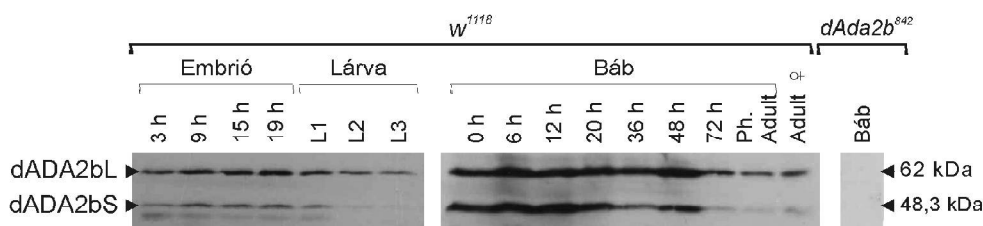
stádiumban biokémiai metabolikus folyamatokban szerepet játszó gének mutattak szignifikáns felhalmozódást. Főként a báb állapotban az emelkedett expressziót mutató gének között jelentősen felülreprezentáltak a különböző immunvédekezési folyamatoknak megfelelő géntológiai csoportokba tartozó gének. Ezek az adatok a dADA2b fehérje stressz válaszban betöltött funkciójára utalhatnak, amelyet már más organizmusban is leírtak (Zsindely *et al.*, 2009).

## 2. A dSAGA komplexre specifikus dADA2b alegység rövid izoformájának szerepe a dSAGA működésében

Az acetiláció szerepéről eddig kialakított képtől eltérően a transzkriptum analízis során a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció hiányában nemcsak csökkent, hanem emelkedett transzkripciót mutató géneket is azonosítottunk (Zsindely *et al.*, 2009). Felvetődött a kérdés, hogy a kapott, ellentétes irányú transzkripció változások hátterében esetleg a dSAGA komplex heterogenitása áll-e, vagyis hogy a dSAGA komplex esetleg többféle dADA2b alegység összetétellel is előfordulhat, amelyek más-más folyamatok szabályozásában vehetnek részt. Ennek alapja, hogy előzetes kísérleti adatok azt mutatták, hogy a *dAda2b* génről kétféle mRNS és fehérje – a rövidebb dADA2bS és a hosszabb dADA2bL – izoforma képződik.

### 2.1 A dADA2b izoformák expressziójának vizsgálata

Először megvizsgáltuk, hogy ezek a különböző dADA2b izoformák az egyedfejlődés különböző szakaszaiban milyen mennyiségben termelődnek, valamint hogy milyen sejten belüli elhelyezkedést mutatnak. Ehhez a dADA2b fehérjék közös, N-terminális régiója ellen termeltetett anti-dADA2b ellenanyag segítségével *w<sup>1118</sup>* genotípusú, különböző egyedfejlődési állapotú állatokon western blot analízissel megvizsgáltuk a két fehérje expressziós mintázatát. Részletes felbontásban meghatároztuk az embrionális állapotban, a három (L1, L2, korai L3) lárva stádiumban, majd a báb állapot során – különös tekintettel a korai báb állapotra – valamint közvetlenül a bábból való kikelés előtt álló és kifejlett egyedekben is a dADA2b fehérjék szintjét (1. ábra). Ennek során azt tapasztaltuk, hogy mindkét dADA2b izoforma az egyedfejlődés minden vizsgált szakaszában jelen van, legnagyobb mennyiségben a korai báb állapotban, valamint az embrionális élet során fejeződnek ki. A dADA2bS fehérje szintje az L2, korai L3 stádiumban és a kifejlett egyedekben a dADA2bL-hez viszonyítva rendkívül alacsony, így a rövid izoforma mennyisége az egyedfejlődés során egy sokkal nagyobb mértékű ingadozást mutat, mint amit a dADA2bL esetében láthatunk.

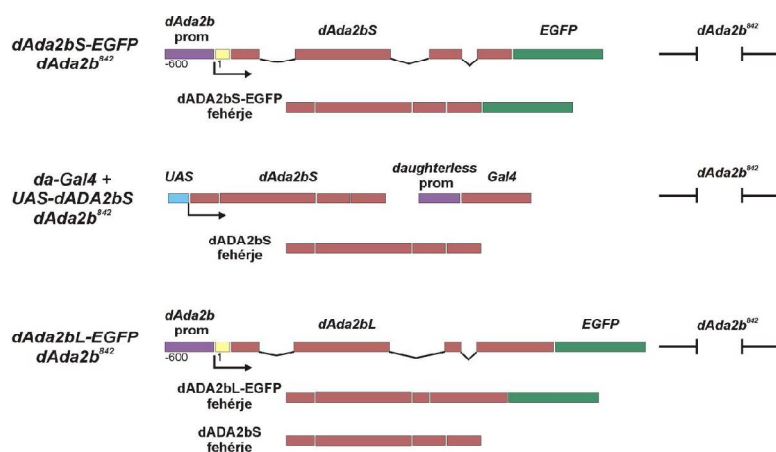


**1. ábra:** Az ADA2bS és ADA2bL fehérjék expressziója az egyedfejlődés során az embrionális élet végén és a báb állapot kezdetén a legerősebb.

Az ábrán a jelölt fejlődési állapotban vad típusú (*w<sup>1118</sup>*) egyedeken dADA2b specifikus ellenanyaggal elvégzett western blot analízis eredménye látható.

A dADA2b izoformák sejten belüli elhelyezkedésére és funkcionális vizsgálatukhoz a laborunkban előállított transzgenikus *Drosophila* törzseket használtuk (Pankotai *et al.*, 2005; Zsindely *et al.*, 2009; Pankotai *et al.*, 2013). A dADA2bS izoforma esetén kétféle törzset használtunk (2. ábra). Az egyik a *dAda2bS-EGFP dAda2b<sup>842</sup>* törzs, amely a rövid izoformának megfelelő genomikus szekvenciát az EGFP-vel C-terminális fúzióban termelő transzgén tartalmazza. Ez a transzgén *dAda2b* deléciós háttéren, egy 600 bp hosszúságú *dAda2b* promóter szabályozása alatt működik. Ezt a 600 bp-os szakaszt egy teljes értékű *dAda2b* promoternak tekinthetjük, mivel korábbi kísérletekben ezen régió irányítása alatt kifejeződik *dAda2b* genomi

transzgén a *dAda2b* deléciós egyedekre jellemző bábletális fenotípust teljes mértékben menekítette (Pankotai *et al.*, 2005). A másik az UAS-Gal4 rendszer segítségével a rövid izoforma túltermelését biztosító törzs, amely, a rövid izoformát kódoló cDNS-t tartalmazó *UAS-dAda2bS* transzgént *dAda2b<sup>842</sup>* deléciós háttéren hordozza. Ezen konstrukció kifejeztetéséhez az általános expressziót biztosító *daughterless(da)-Gal4* driver törzset alkalmaztuk. A dADA2bL izoforma vizsgálatához a *dAda2bL-EGFP dAda2b<sup>842</sup>* konstrukciót tartalmazó törzset használtuk. Mivel ez a transzgén C-terminális EGFP fúzióval a hosszú izoformának megfelelő genomikus szekvenciát tartalmazza, az EGFP fehérjével jelölt dADA2bL izoforma mellett alternatív splicing útján a dADA2bS izoforma kifejeződését is biztosítja. Ez a transzgén *dAda2b* deléciós háttéren, a 600 bp hosszúságú *dAda2b* promóter szabályozása alatt expresszálódik. A dADA2b fehérjére specifikus ellenanyaggal elvégzett western blot analízissel leellenőriztük, hogy ezekben a törzsekben a transzgénekről történő fehérjetermelés mértéke összemérhető-e a vad típusban jelen lévő dADA2b fehérjék mennyiségével. Mind az endogén expressziót, mind a túltermelését biztosító konstrukciók esetében a dADA2b fehérjék kifejeződésének mértéke a vad típuséhoz hasonló. Ezek alapján úgy ítéltük meg, hogy ezek a transzgenikus törzsek alkalmas eszközként szolgálhatnak a dADA2bS fehérje funkcionális vizsgálatára.

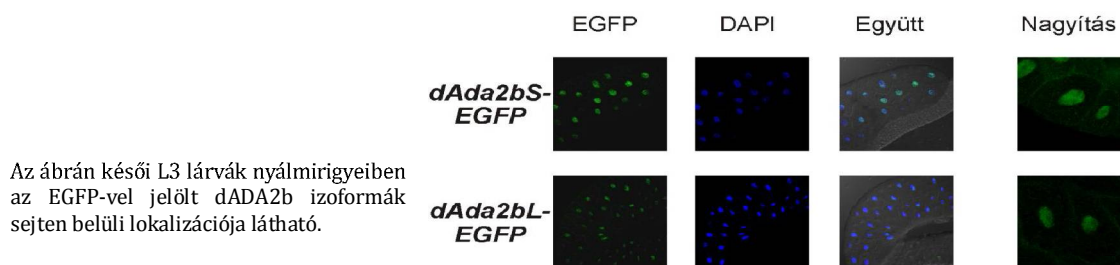


**2. ábra:** A dADA2b izoformák vizsgálatára használt transzgenikus törzsek jellemzése.

Az ábra a használt *Drosophila* törzsek által hordozott transzgének felépítését valamint az azokról termelődő fehérjék szerkezetét mutatja.

A dADA2b fehérjék szöveti expressziójának, illetve sejten belüli elhelyezkedésének *in vivo* vizsgálatához a zöld fluoreszcens (EGFP) fehérjével jelölt dADA2bS, illetve dADA2bL izoformát a *dAda2b* promóter irányítása alatt termelő transzgenikus *Drosophila* törzsetek használtuk (*dAda2bS-EGFP* és *dAda2bL-EGFP*). Fluoreszcens mikroszkópiával késői L3 lárvák nyálmirigyeiben megvizsgálva az izoformák sejten belüli lokalizációját megállapítottuk, hogy mindkét dADA2b fehérje a sejtanyagban található (3. ábra).

**3. ábra:** A dADA2bS-EGFP és dADA2bL-EGFP fehérjék expressziója.



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

## 2.2 A dADA2b rövid izoforma funkcionális vizsgálata

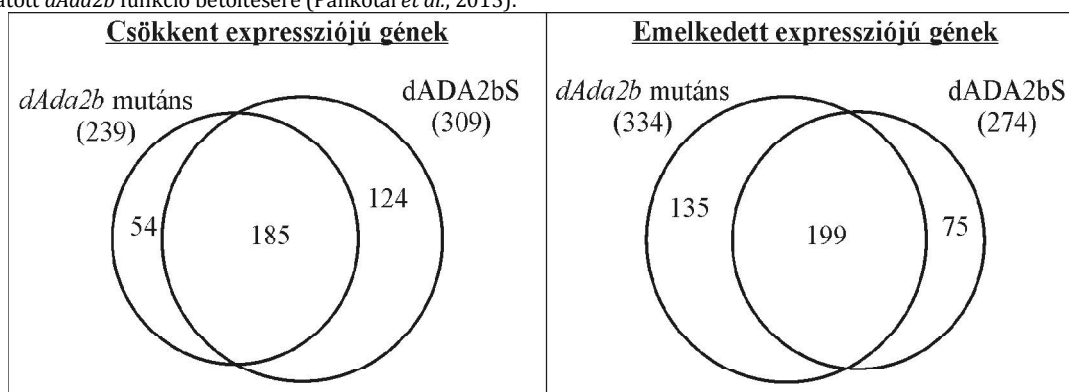
Korábbi kísérletek azt mutatták, hogy a *dAda2b<sup>842</sup>* deléció hatását a teljes *dAda2b* gén visszajuttatása képes komplementálni (Pankotai *et al.*, 2005). Mivel erről a genomi régióról mindkét dADA2b izoforma termelődik, felvetődött az a kérdés, vajon a harmadik ADA

motívumot nem tartalmazó, rövidebb dADA2b izoforma önmagában képes-e ellátni a teljes dADA2b funkciót. A *dAda2b<sup>B42</sup>* mutáns fenotípus komplementációján alapuló kísérletekkel megvizsgáltuk, hogy ha *dAda2b<sup>B42</sup>* mutáns háttéren egyedül a rövid izoformát expresszáltatjuk, akkor az önmagában képes-e menekíteni a mutáció okozta fenotípusokat. Ennek során megállapítottuk, hogy a rövid dADA2bS fehérje mind az egyedfejlődés, mind az acetilációs aktivitás tekintetében csak részlegesen tudta pótolni a dADA2b funkciót (Pankotai *et al.*, 2013).

### 2.3 A dADA2bS izoforma transzkripció szabályozására kifejtett hatásának vizsgálata

A dADA2bS esetében tapasztalt részleges funkció háttérében azt is feltételezhettük, hogy a rövid izoforma jelenlétében létrejövő dSAGA komplex csak az egyik irányú génexpressziós változások szabályozásában képes részt venni. Ezért részletesen megvizsgáltuk, hogy a dSAGA komplexre specifikus dADA2b alegység rövidebb izoformája hogyan járulhat hozzá a dSAGA génműködés szabályozásában betöltött funkciójához. Ehhez a dADA2bS izoformát kifejező, egyébként *dAda2b* mutáns lárvákon transzkriptum analízist végeztünk, amely során megállapítottuk, a dADA2bS fehérje jelenlétében létrejövő dSAGA komplex mind az emelkedett, mind a csökkent expressziójú gének szabályozásában részt vesz (4. ábra) (Pankotai *et al.*, 2013). A *dAda2b* deléción hatására már láthattuk, hogy 239 gén expressziója lecsökkent a vad típushoz képest, amiket dADA2b-függő géneknek tekinthetünk. Meglepő módon a dADA2bS izoforma termelődése esetén ennél több, 309 gén mutatott csökkent expressziót. Ennek háttérében állhatnak másodlagos szabályozó hatások, például ha a dADA2bS izoforma represszor aktivitású fehérjék transzkripcióját is szabályozza. A két gencsoport között nagy az átfedés, a dADA2b-függő gének 77%-a a dADA2bS izoforma jelenlétében is a vad típustól eltérő expressziót mutatott, míg a dADA2b-függő gének 22%-ának (54 gén) kifejeződéséhez a rövid dADA2b izoforma jelenléte is elegendő volt. A teljes *dAda2b* funkció hiányában tapasztaltakhoz hasonlóan, a dADA2bS fehérje jelenlétében is találtunk számos olyan gént (274 gén), amelynek az expressziója a vad típusban mérthez képest megemelkedett. Az emelkedett expressziót mutató gének 40%-ának az expresszióját visszaállította a vad típusban mért szintre, tehát megállapíthatjuk, hogy a rövid izoforma hatékonyabbnak bizonyult a represszió közvetítésében, viszont a teljes *dAda2b* funkciót itt sem volt képes betölteni. A dADA2b-függő gének több, mint felének szabályozásához a rövid izoforma önmagában nem volt elegendő, ezen gének megfelelő átírásához valószínűleg a dADA2bL fehérjére, vagy mindkét izoforma egyidejű jelenlétére szükség lehet. Tehát elképzelhető, hogy a dSAGA komplex a dADA2b izoformák segítségével valósít meg egy génspecifikus transzkripciós szabályozást, de ez nem olyan formában történik, hogy a rövid izoforma jelenlétében a dSAGA komplex kizárólag aktiváló, vagy represszálo hatást lenne képes kifejteni.

4. ábra: A dADA2bS izoforma önmagában a *dAda2b*-függő gének 20-40%-ánál képes a génexpresszió szabályozásban látott *dAda2b* funkciót betölteni (Pankotai *et al.*, 2013).



Az ábrán látható a *dAda2b* null mutáció, valamint a dADA2bS fehérje jelenlétében a vad típustól eltérő expressziót mutató gének száma.

### 3. A dSAGA komplex és az általa létrehozott H3K9 acetiláció szerepe a dSAGA-függő transzkripciót mutató gének szabályozásában

Mivel a dADA2b fehérje a dSAGA komplex hiszton acetilációt létrehozó moduljának egyik felépítő eleme, ezért megvizsgáltuk, hogy a dADA2b fehérjék hiányában megfigyelt expressziós változások a dADA2b acetilációt befolyásoló hatásához köthető-e. Annak eldöntésére, hogy a dSAGA funkció közvetlen hatását láthatjuk-e mindkét irányú transzkripció változás során, kromatin immunprecipitációs (ChIP) analízis során *w<sup>1118</sup>* és *dAda2b<sup>842</sup>* mutáns SpEv L3 lárvákban adott gének esetén meghatároztuk a H3K9 acetiláció szintjét valamint a dADA2b fehérje kötődését (Zsindely *et al.*, 2009).

A microarray kísérletben kapott expressziós változások alapján három kategóriába soroltuk a géneket, ezek a dADA2b hiányában csökkent illetve megemelkedett expressziót, valamint expressziós változást nem mutató gének voltak. A kromatin immunprecipitációs analízis során mind a három kategóriából vizsgáltunk géneket, a csökkent expressziót mutatók közül a *sugarbabe (sug)*, a *cap and collar (cnc)*, a *cyclin B (CycB)*, az emelkedett expressziót mutatók közül a *Frost (Fst)*, *Hus1-like (Hus1)*, valamint az *Attacin-D (AttD)* promóter régióit, míg kontrollként a az L32 és S23 riboszómális fehérjék génjeit (*Ribosomal protein L32-RpL32*, *Ribosomal protein S23-RpS23*) vizsgáltuk.

A dADA2b fehérje kötődése alapján több dSAGA-függő expressziót mutató gént (*sug*, *cnc*, *CycB*, *Hus1*) is direkt dSAGA célként sikerült azonosítanunk. A transzkripció adatok alapján dSAGA-független géneknek tekintett *RpS23* és *RpL32* gének promóter régióin is kimutatható volt a dADA2b jelenléte. A dADA2b fehérje jelenléte nemcsak a gének promóterhez közeli részén, hanem a 3' végi régiójában is kimutatható volt (Zsindely *et al.*, 2009).

A dADA2b fehérje kötődése alapján dSAGA célként tekintett régiókon megvizsgáltuk, hogy a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció közvetlen szerepet tölt-e be a génextpresszió szabályozásában, vagyis hogy az eltérő irányú transzkripció változást mutató géneken hogyan alakul a H3K9 acetiláció szintje. Ehhez *w<sup>1118</sup>* és *dAda2b<sup>842</sup>* mutáns SpEv lárvákban dSAGA-függő és dSAGA-független transzkripciót mutató gének, valamint intergenikus kontroll régiók területén K9 acetilált H3 hiszton elleni ellenanyaggal ChIP kísérletet végeztünk. Ennek során láthattuk, hogy a magas expressziójú riboszómális fehérjék génjeinek (*RpS23*, *RpL32*) promóter régiójában található nukleoszómák nagymértékben acetiláltak, és ez a H3K9 acetiláció a dSAGA hiányában is fennmaradt. Az alacsonyabb mértékben kifejeződő, dSAGA-függő expressziót mutató géneket vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy mind a csökkent (*sug*, *cnc*, *CycB*), mind az emelkedett (*Fst*, *Hus1*, *AttD*) expressziójú gének területén megjelent a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció (Zsindely *et al.*, 2009). Ezen adatok alapján megállapíthatjuk, hogy a promóterhez közeli régióban a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció jelenléte számos gén szabályozása során esszenciális, viszont a transzkripció folyamata során nem csak aktiváló, hanem represszálo hatás kialakításához is közvetlenül hozzájárulhat.

#### Összegzés

##### A dSAGA specifikus hiszton acetiláció feltételezett funkciója a génműködés szabályozásában

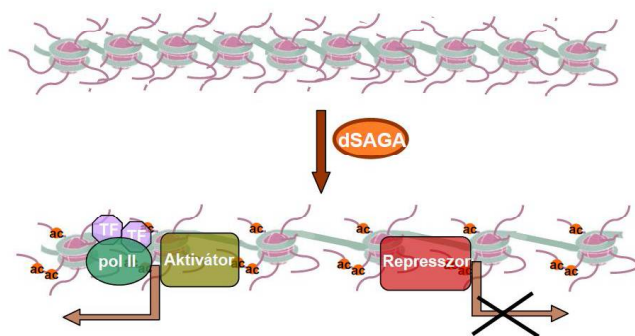
Teljes transzkriptum analízist végeztünk vad típusú és *dAda2b* mutáns egyedeken és meghatároztuk, hogy két egyedfejlődési stádiumban mely gének expresszióját szabályozhatja a dSAGA specifikus acetiláció. Mindkét fejlődési állapotban kevés (5%) viszont hasonló funkcióval rendelkező gének mutattak dADA2b-függő génextpresszió-változást. Ezen dADA2b-függő géneknek több mint a fele nem csökkent, hanem emelkedett mértékű expressziót mutatott a dSAGA-specifikus acetiláció hiányában (Zsindely *et al.*, 2009).

A dADA2b fehérje izoformák részletes analízise során sikerült kimutatnunk, hogy mindkét dADA2b izoforma termelődik *Drosophilá*-ban, valamint az intracelluláris eloszlásukat vizsgálva mindkettő sejtmagi lokalizációt mutat. Expressziójuk vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy változó mennyiségben ugyan, de az egyedfejlődés minden szakaszában jelen volt mindkét

izoforma, legnagyobb mennyiségben az embrionális valamint a báb állapot során. Két eltérő módszerrel is azt az eredményt kaptuk, hogy a dADA2b fehérjék expressziója a metamorfózis kezdetén a legmagasabb, ami összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy a *dAda2b* gén működését megszüntető mutáció (*dAda2b<sup>942</sup>*) is a báb fejlődésének korai szakaszában, 12 órával az előbáb kialakulása után okoz letalitást (Pankotai *et al.*, 2005). Funkcionális vizsgálatok során a rövid dADA2bS fehérje mind az egyedfejlődés, mind az acetilációs aktivitás tekintetében csak részlegesen tudta pótolni a *dAda2b* funkciót (Pankotai *et al.*, 2013). Összességében megállapíthatjuk, hogy a két dADA2b izoforma csak a C-terminális régiójában különbözik egymástól, funkcionálisan mégsem ekvivalensek. Az elvégzett transzkriptum analízis alátámasztotta, hogy a dADA2bS izoforma önmagában a génexpresszió szabályozásában is csak egy részleges *dAda2b* funkciót képes betölteni (Pankotai *et al.*, 2013). Bár a dADA2bS fehérje jelenlétében létrejövő dSAGA komplex alapvetően mindkét irányú génexpressziós szabályozásában szerepet játszik, a transzkripciót gátló folyamatok közvetítésében – akár elsődleges akár másodlagos hatásokon keresztül – mégis hatékonyabbnak bizonyul.

Kromatin immunprecipitációs analízisben megvizsgáltuk, hogy a dADA2b fehérjék hiányában megfigyelt expressziós változások közül mind a csökkent, mind pedig az emelkedett mértékű génexpresszió is a dSAGA acetilációs aktivitásához köthető-e. Mivel mind a csökkent, mind az emelkedett expressziót mutató gének esetében is sikerült dADA2b kötődést kimutatnunk, mindkét irányú expressziós változás hátterében a dSAGA komplex közvetlen működését feltételezhetjük (Zsindely *et al.*, 2009). Az általunk kimutatott dADA2b kötődési mintázat utalhat arra, hogy a dSAGA komplex nem csak a transzkripció iniciációs, hanem elongációs lépését is szabályozhatja, és ezért a gének teljes átírt régióján jelen van a dSAGA komplex. Megvizsgálva a dSAGA-függő expressziót mutató gének H3K9 acetilációs szintjét azt tapasztaltuk, hogy mind a csökkent (*sug*, *cnc*, *CycB*), mind az emelkedett (*Fst*, *Hus1*, *AttD*) expressziójú gének 5' és 3' régióiban is kimutatható a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció jelenléte. A dSAGA-független (*RpS23*, *RpL32*), erősen expresszáldó géneken jelen lévő nagymértékű H3K9 acetiláció a dADA2b fehérje jelenlététől függetlenül is fennmaradt (Zsindely *et al.*, 2009). Ezen adatok alapján megállapíthatjuk, hogy a promóterhez közeli régióban a dSAGA specifikus H3K9 acetiláció jelenléte számos gén szabályozása során esszenciális, viszont a transzkripció folyamata során nem csak aktiváló, hanem represszáló hatás kialakításához is hozzájárulhat.

Az előbbieken részletezett eredmények is rámutatnak arra, hogy a dSAGA HAT komplex rendkívül összetett módon járulhat hozzá a génműködés szabályozásához. Az elvégzett kromatin immunprecipitációs kísérlet alapján feltételezhetjük, hogy a dSAGA elégtelen működése



következtében sérül az eukromatikus részek általános H3K9 acetilációs mintázata (Zsindely *et al.*, 2009). Elképzelhető, hogy ennél az alacsonyabb acetilátságu kromatin szerkezetnél gyengül a szabályozó fehérjék kromatinhoz való kötődési képessége, és ezáltal – attól függően, hogy aktivátor vagy represszor hatású fehérjéről van szó – módosul az általuk szabályozott gének működése (5.

ábra).

**5. ábra:** A modell a dSAGA specifikus acetilációs alapmintázat – egy transzkripciót megengedő kromatin szerkezet fenntartásán keresztül – a génműködés szabályozására kifejtett hatását mutatja be



Részenben ez magyarázhatja, hogy a dSAGA specifikus acetiláció hiányában nem csak csökkent, hanem emelkedett expressziójú géneket is azonosítottunk. Ezenfelül ez az általánosan megjelenő, dinamikusan változó acetilációs mintázat hozzájárulhat a génszabályozás megfelelő kinetikájához is, így elképzelhető, hogy a dSAGA specifikus általános H3K9 acetilációs mintázat hiányában bizonyos gének aktivációja nem a megfelelő időben történik meg, és ezáltal teljesen felborulhat a sejtre jellemző koordinált génexpressziós mintázat. Tehát a dSAGA komplex acetilációs aktivitása közvetett módon is, egy transzkripciót megengedő kromatin szerkezet fenntartásán keresztül is hozzájárul a génműködés szabályozásához.

Az elvégzett kísérletek fontos adatokkal szolgálnak a kromatin szerkezetet módosító faktorok funkcióinak alaposabb megismeréséhez, amelyek megváltozott működése számos betegség (pl. rákos elváltozások, neurodegeneratív megbetegedések) velejárója. Így a kromatin módosító komplexek és az általuk létrehozott módosítások szabályozó szerepének részletesebb megértése nagymértékben hozzájárulhat az ilyen jellegű betegségek kezelésében alkalmazható újabb és hatékonyabb terápiák kifejlesztéséhez.

### Támogatás

A monográfia megírása valamint a kutatás egy része a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

### Irodalomjegyzék

1. Balasubramanian, R., Pray-Grant, M.G., Selleck, W., Grant, P.A., and Tan, S. (2002). **Role of the Ada2 and Ada3 transcriptional coactivators in histone acetylation.** *J. Biol. Chem.* 277, 7989–7995.
2. Braunstein, M., Rose, A.B., Holmes, S.G., Allis, C.D., and Broach, J.R. (1993). **Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation.** *Genes Dev.* 7, 592–604.
3. Brownell, J.E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D.G., Roth, S.Y., and Allis, C.D. (1996). **Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation.** *Cell* 84, 843–851.
4. Cockerill, P.N. (2011). **Structure and function of active chromatin and DNase I hypersensitive sites.** *FEBS J.* 278, 2182–2210.
5. Hebbes, T.R., Clayton, A.L., Thorne, A.W., and Crane-Robinson, C. (1994). **Core histone hyperacetylation co-maps with generalized DNase I sensitivity in the chicken beta-globin chromosomal domain.** *EMBO J.* 13, 1823–1830.
6. Kornberg, R.D. (1974). **Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA.** *Science* 184, 868–871.
7. Kouzarides, T. (2007). **Chromatin modifications and their function.** *Cell* 128, 693–705.
8. Muratoglu, S., Georgieva, S., Pápai, G., Scheer, E., Enünlü, I., Komonyi, O., Cserpán, I., Lebedeva, L., Nabirochkina, E., Udvardy, A., et al. (2003). **Two different Drosophila ADA2 homologues are present in distinct GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes.** *Mol. Cell. Biol.* 23, 306–321.
9. Mutskov, V., Gerber, D., Angelov, D., Ausio, J., Workman, J., and Dimitrov, S. (1998). **Persistent interactions of core histone tails with nucleosomal DNA following acetylation and transcription factor binding.** *Mol. Cell. Biol.* 18, 6293–6304.
10. Pankotai, T., Komonyi, O., Bodai, L., Ujfaludi, Z., Muratoglu, S., Ciurciu, A., Tora, L., Szabad, J., and Boros, I. (2005). **The homologous Drosophila transcriptional adaptors ADA2a and ADA2b are both required for normal development but have different functions.** *Mol. Cell. Biol.* 25, 8215–8227.
11. Pankotai, T., Zsindely, N., Vamos, E.E., Komonyi, O., Bodai, L., and Boros, I.M. (2013). **Functional characterization and gene expression profiling of Drosophila**



- melanogaster short dADA2b isoform-containing dSAGA complexes.** *BMC Genomics* 14, 44.
12. Peterson, C.L., and Laniel, M.-A. (2004). **Histones and histone modifications.** *Curr. Biol.* 14, R546–551.
  13. Pokholok, D.K., Harbison, C.T., Levine, S., Cole, M., Hannett, N.M., Lee, T.I., Bell, G.W., Walker, K., Rolfe, P.A., Herbolsheimer, E., et al. (2005). **Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast.** *Cell* 122, 517–527.
  14. Roth, S.Y., Denu, J.M., and Allis, C.D. (2001). **Histone acetyltransferases.** *Annu. Rev. Biochem.* 70, 81–120.
  15. Zsindely, N., Pankotai, T., Ujfaludi, Z., Lakatos, D., Komonyi, O., Bodai, L., Tora, L., and Boros, I.M. (2009). **The loss of histone H3 lysine 9 acetylation due to dSAGA-specific dAda2b mutation influences the expression of only a small subset of genes.** *Nucleic Acids Res.* 37, 6665–6680.