

A támogatással végzett munka korábbi OKTA projekt (T046414) eredményein alapuló kutatás volt, amelyben az általunk azonosított és részben jellemzett hiszton acetiltransferáz (HAT) komplexek működéséről kívántunk új adatokat nyerni. 2008-ban olyan kísérleteket terveztünk, “amelyekkel választ nyerhetünk arra, hogy (1) mely gének elsődleges célpontjai a SAGA és ATAC közreműködésével megvalósuló transzkripció szabályozásnak, (2) vannak-e és ha igen, mik a közös jellemzői a SAGA és az ATAC komplexekkel szabályozott géneknek, (3) az ADA2 adaptor fehérjék milyen módon határozzák meg a komplexek specifikus hatását és (4) az ADA2b fehérje általunk azonosított különböző izoformái mi módon járulnak hozzá a GCN5-öt tartalmazó HAT komplexek működési sokoldalúságához?” A projekt négy éve során valamennyi feltett kérdésre választ adtunk. A munkatervben megfogalmazott kérdéseket közvetlenül érintő eredményeinket négy, nemzetközi szaklapokban megjelent dolgozatban közzeltük, egy összefoglaló közleményt a témában felkérésre készült. Az elért eredmények részét képezik további nyolc már megjelent és egy megjelenés alatt lévő közleménynek, amelyekben a vizsgált HAT komplexek és a transzkripcióban résztvevő egyéb faktorok kölcsönhatását és a hiszton acetiláció daganatokban és drogrezisztencia kialakulásában játszott szerepét vizsgáltuk. Az eredményeken alapulva megvalósult két PhD fokozat szerzés, egy további pedig részben alapult a támogatással végzett munkán. Az eredmények további része az elkövetkező időszakban fog további közlemények és doktori disszertációk elkészítéséhez hozzájárulni.

Legfontosabb, már közlésre került eredmények:

DNS microarray hibridizációs technikát alkalmazva összehasonlítottuk vad típusú és Ada2 mutáns *Drosophila* törzsek teljes RNS tartalmát. Megállapítottuk, hogy az ADA2b hiányában a SAGA hiszton acetiltransferáz komplex kevésbé hatékonyan működik, amit a hiszton3 9. és 14. lizin (H3K9 és K14) acetiláció szintjének csökkenése jelez. A csökkent szintű SAGA működés normál növekedési feltételek mellett viszonylag kevés gén transzkripció szintjét befolyásolja. A SAGA működésének hiánya összesen 400-500 gén mRNS szintjében okoz legalább kétszeres emelkedését, vagy csökkenését. Legnagyobb számban a stressz válasz kialakításában szerepet játszó gének, legfőképpen pedig a mikrobiális fertőzések hatására bekövetkező védekezési

reakciókban szerepet játszó gének transzkripció szintjében figyelhető meg változás. A SAGA közvetlen hatását az Ada2b mutánsokban fokozott, vagy csökkent működést mutató egyes géneken kromatin immunoprecipitáció (ChIP) kísérletekkel mutattuk ki. A ChIP kísérletekben SAGA-specifikus hiszton modifikációt (H3K14ac és H3K9ac), valamint ADA2b és RNS polimeráz kötődést vizsgáltunk a kiválasztott gének szabályozó régióiban. Kísérleti eredményeink arra utalnak, hogy a SAGA közvetítette hiszton acetiláció relatív változása arányban áll a mutáció hatására bekövetkező transzkripció változás mértékével. Az eredmények alapján az a következtetésünk, hogy az acetiláció jobban hozzáférhetővé teszi a géneket szabályozó faktorok számára. A szabályozó faktor természetétől függően, ennek hatása lehet pozitív, vagy negatív is. Az alapállapotban is intenzíven átírt gének transzkripciójára SAGA hatása gyakorlatilag elhanyagolható. Olyan gének esetében, amelyek működése csak speciális viszonyok mellett szükséges, a SAGA okozta hiszton módosítás jelentős transzkripció változást eredményez (Zsindely et al. 2009). A SAGA működésére tett megállapításaink jól összhangban állnak más laboratóriumok élesztő és emlős sejtekben vizsgálatával tett megállapításaival a komplex működéséről. Összhangban adatainkkal, a SAGA komplex más rendszerekben is elsődlegesen a sejtekben bekövetkező, vagy azt érő stresszre adott transzkripciós válasz létrejöttében játszik moduláló szerepet.

Ellentétben a viszonylag kevés gént szabályozó SAGA komplex-el, az ATAC több ezer gén transzkripciójának szabályozásában játszik szerepet. E komplex szerepére az ATAC-specifikus ADA2a alegységben mutáns állatok transzkriptomjának analízisével nyertünk adatokat. Jellegzetes ATAC által szabályozott géncsoportot alkotnak a szteroid hormon bioszintézis lépéseit katalizáló citokróm fehérjéket kódoló gének. E citokróm enzimek génjei - ellentétben más citokrómokkal - ATAC mutánsokban a normálistól sokkal alacsonyabb szinten működnek. A citokróm gének alacsony szintű expressziója a rovar egyedfejlődését szabályozó ecdizon hormont termelő mirigy sejtekben csökkent hormon szintet eredményez, ami a fejlődés megrekedését és az állatok pusztulását okozza. E következtetés helyességét egyértelműen bizonyítja, hogy az ATAC funkció helyreállítása a hormont termelő mirigysejtekben megszünteti a fejlődési rendellenességet. Ez egyik első bemutatása a szakirodalomban annak, hogy egy hiszton módosító komplex koordináltan szabályozza egy biológiai folyamatban együttműködő gének csoportjának transzkripcióját (Pankotai et al. 2010).

Az ATAC és SAGA komplexek eltérő funkciója részben, vagy egészben annak az eredménye, hogy eltérő a hisztonok iránti affinitásuk. Mint korábbi munkánkban kimutattuk, a SAGA hiszton3, az ATAC pedig hiszton4 lizin oldalláncokat acetilál. Ez a megfigyelés különösen érdekes, mert az ADA2a és ADA2b alegységektől eltekintve az acetilációs modult mindkét komplexben ugyanolyan alegységek alkotják. Annak kiderítésére, hogy mi határozza meg az ADA2 fehérjék az egyik, vagy másik komplexbe épülését hibrid fehérjék termelő *Drosophila* vonalakat hoztunk létre. Ezek részletes analízisével megállapítottuk, hogy az ADA2a és ADA2b fehérjék részeinek felcserélésével létrehozott hibridek attól függően képesek Ada2 mutánsokban a SAGA vagy ATAC hiányos működése okozta fenotípus jegyeket megszüntetni, hogy melyik fehérje C-terminális részét tartalmazzák. Azaz, az ADA2 C-terminális rész meghatározó szerepet játszi a fehérje komplexbe épülésében és az ott kialakított kölcsönhatásokkal a komplex hisztonok iránti affinitásában (Vámos és Boros, 2012).

Különböző élőlények SAGA és ATAC komplexeinek összehasonlítása arra a következtetésre vezet, hogy az evolúció során e hiszton acetiltranszferáz komplexek szerkezeti és működési sokfélesége egyaránt bővült. Ennek egyik bizonyítékát szolgáltatják eredményeink a különböző ADA2b izoformát tartalmazó komplexek működésének összehasonlításáról. Teljes transzkriptom analízist végezve az ADA2b rövid és hosszú izoformát kifejező állatokon megállapítottuk, hogy specifikus gének transzkripcióját a két izoforma eltérő mértékben változtatja meg. Röviden tehát adataink példát szolgáltatnak arra, hogy az eltérő adapter fehérjék használata hozzájárul a HAT komplexek működési sokféleségéhez (Pankotai et al. 2013).

A hiszton módosítások és génműködés változások közötti kapcsolat leírására jól jellemzett rovar gének aktivitás változásainak és a szabályozó régiókban lezajló hiszton módosítás változások összefüggését jellemeztük. Megállapítottuk, hogy a hiszton H3 lizin 23 oldallánc acetilációs állapota szoros összefüggést mutat az ekdizon hormon okozta génaktivációval, míg, a hiszton H3 lizin 9 és hiszton H4 lizin 8, 12, 16 oldalláncok acetilációs állapota csak kismértékben változik a transzkripció intenzitásának változásával. Ez összhangban van a SAGA és ATAC komplexek fõntiekben összefoglalt moduláló szerepével. Eredményeink arra utalnak, hogy a hiszton módosítások jelentős része velejárója, de nem okozója a megnövekedett transzkripció aktivitásnak. A módosítások a transzkripcióhoz szükséges nyitott kromatin állapot fenntartásában játszanak szerepet.

A hiszton módosításokra vonatkozó eredményeinkről számos hazai és nemzetközi konferencián előadás és poszter formájában beszámoltunk és felkérésre összefoglaló közleményt készítettünk (Boros, 2012)

A transzkripció szabályozás egyéb faktorainak analízise tekintetében érdekes megállapításokat tettünk az ADA2a fehérjével egy transzkripciós egységről szintetizálódó RNS polimeráz II (Pol II) alegység (RPB4) működéséről. Kimutattuk, hogy ez a Pol II alegység a *Drosophila* sejtekben életfontosságú szerepet játszik és kapcsolódása a kromatinhoz nem kizárólagosan csak az aktív RNS polimeráz komplexekkel együtt történik. Egy másik kísérlet sorozatban az RNS polimeráz módosításra specifikus FCP1 foszfátáz szerepét vizsgáltuk és jellemeztük. Először hoztunk létre olyan kísérleti rendszert, amelyben a foszfátáz szerepe genetikai eszközökkel is vizsgálható. A rendszer alkalmazásával kimutattuk, hogy az FCP1 foszfátáz működése biztosítja peteképződés során a rendkívül intenzív transzkripciót, amivel az egyedfejlődés legkorábbi fázisához szükséges mRNS készlet létrejöhet.

A *Drosophila* kísérleti rendszer használata mellett kísérleteinkkel igyekeztünk adatokat nyerni a hiszton acetiláció szerepéről emlős sejtekben is. Vizsgáltuk az acetiláció változását daganatok kialakulásával járó epithelium-mesenchima tranzícióban, és a daganatokra jellemző drog-rezisztenciát okozó gének kifejeződésében. Eredményeink, melyek jelentős része már közlésre került, alapul szolgálnak további kísérlet tervek és megközelítések kidolgozására az ezekben az összetett folyamatokban működő molekuláris mechanizmusok feltárására.