

Csoportunkban a génaktivitás kromatin szintű szabályozásával foglalkozunk. Vizsgálatainkhoz elsősorban a *Drosophila melanogaster* testszerveződését és szegmentjeinek egyedi jellegzetességeit meghatározó homeotikus gén-rendszert, ezen belül is főképpen a *bithorax*-komplexet használjuk modellként. A *bithorax*-komplex az ecetmuslica középtorától hátrafelé elhelyezkedő szelvények megfelelő kialakulásáért felelős. A komplex három génje, az *Ubx*, az *abd-A* és az *Abd-B*, kilenc szelvény azonosságát képes meghatározni. Ezt a komplexben az általuk szabályozott szelvényekkel kolineárisan elhelyezkedő kilenc, szelvény specifikus szabályozó régió (*cis*-regulátor) teszi lehetővé. Az egyre hátrébb elhelyezkedő szelvényekben mindig egy új *cis*-regulátor aktiválódik, kerül nyitott kromatin konformációba. Ezek az összetett regulátor szakaszok szükségesek az egyes szelvényekre jellemző transzkripciós aktivitás, ennek következményeképpen a homeotikus regulátor-fehérjék szelvényre jellemző szintjének beállításához, majd a későbbiekben ennek az aktivitási mintázatnak a fenntartásához is.

A homeotikus gének szelvény-specifikus expressziós mintázata az egyedfejlődés korai szakaszában meghatározott térbeli elrendeződésben jelen lévő szabályozó faktorok (GAP és PAIR RULE fehérjék) transzkripció szintű aktiváló és represszáló hatásának eredményeképpen alakul ki. A szabályozás különlegessége, hogy ez a kifejeződési mintázat annak ellenére tartósan fennmarad, hogy a kialakításához elengedhetetlenül szükséges fehérjék az egyedfejlődés első 5 órája után eltűnnek, és többé nem fejeződnek ki. A kialakult aktivitási mintázatot az egyedfejlődés ezt követő fázisaiban egy, a közvetlen transzkripciós regulációtól különböző, a kromatinszerkezet szintjén ható epigenetikus szabályozó rendszer őrzi meg. A génaktivitási mintázat fenntartásáért felelős két, evolúciósan erősen konzervált géncsalád - az aktiváló szerepű *trithorax*-csoport és a represszor szerepű *Polycomb*-csoport – kulcsszerepet játszik ebben a szabályozási mechanizmusban. A két géncsalád által kódolt fehérjék különböző, rövid DNS szakaszokhoz kötődnek az egyes *cis*-regulátor régiókon belül, amelyeket a TRITHORAX fehérjék kötőhelyei esetében Trithorax Response Element-eknek (TRE), míg a POLYCOMB fehérjék esetében Polycomb Response Element-eknek (PRE) neveznek.

Jelen, zárójelentés-köteles OTKA pályázat távlati célja az *Abd-B* gén *iab-7* *cis*-regulátor régiójában található *iab-7* PRE felépülésének és működésének jobb megértése. Vizsgálataink alapját az a korábban laboratóriumunkban előállított, nagyméretű mutáns gyűjtemény képezte,

amelynek tagjai az *iab-7* PRE működését befolyásolják *in vivo*. Ezeket két, egymást kiegészítő rendszer segítségével állítottuk elő. Az első rendszerben azt a korábbi megfigyelésünket használtuk ki, hogy ha a két, szomszédos *cis*-regulátor régió, az *infraabdominal-6* (*iab-6*) és az *iab-7* között elhelyezkedő *Fab-7* izolátor szakaszt eltávolítjuk (de az *iab-7* PRE érintetlen marad), akkor a két *cis*-regulátor régió összeolvad, és egymás működését kölcsönösen befolyásolja. Ennek következményeként olyan fenotípus alakul ki a hatodik potrohszelvényen (A6), amely a normális A5 és a normális A7 jellegzetességeit mozaikosan mutatja. Ezt a fenotípust a Pc-G mutánsok az A7, a *trx-G* mutáns alléljai pedig az A5 irányába tolják el heterozigóta állapotban, így ez az érzékeny fenotípus jól felhasználható a két géncsoport új mutáns alléljeinek azonosítására. A másik rendszer olyan transzgenek felhasználásán alapult, amelyek a *mini-white* jelzőgén mellett az izolált *iab-7* PRE-t tartalmazzák. Amennyiben ezeket a transzgenikus konstrukciókat transzformáció segítségével visszajuttatjuk a muslicába, a kapott transzformáns vonalak nagy részében a PRE részlegesen inaktíválja a *mini-white* jelzőgént. A részleges inaktiváció eredménye a transzgenikus vonalakban olyan átmeneti szemszín megjelenése, amely ugyancsak érzékeny a Pc-G mutációk jelenlétére, és az előbb ismertetett rendszerhez hasonlóan alkalmas új mutációk azonosítására. A két rendszer segítségével korábban azonosított mutációk jellemzése, és az általuk azonosított géneknek epigenetikus génszabályozásban betöltött szerepének lehetőség szerinti tisztázása a pályázat által támogatott munka szorosabb értelemben vett célja.

Az új mutánsaink segítségével, Paul Schedl laboratóriumával együttműködve azonosítottuk és jellemeztük a *grappa* (*gpp*) gént, amelyről megállapítottuk, hogy az élesztő DOT1 fehérje egyetlen muslica homológját kódolja, és a DOT1-hez hasonlóan a hiszton H3 K79-es aminosavának specifikus metilációját végzi. (Ez az aminosav a H3 hiszton globuláris doménjében található.) A különbség a DOT1-hez képest kettős: egyrészt a GPP fehérje csak dimetilálja a K79-et, szemben a DOT1 fehérjével, amely trimetilál ebben a pozícióban, másrészt a GPP az emlős homológokhoz hasonlóan jóval hosszabb a DOT1-nél, és feltehetően több fehérjével képes fizikai kölcsönhatásba lépni. Vizsgálataink szerint az általunk izolált mutációk két jól elkülönülő csoportba oszthatók, amelyek közül az egyik az egyszerű funkcióvesztéses alléleket foglalja magában. Homozigóta formában ezek az allélek lárva letálisak, és a homozigóta lávákban a H3 K79-es aminosav metilációja nem mutatható ki. A másik csoport alléljeire nézve homozigóta állatokban a metiláció látszólag nem sérül, továbbá egy részük életképes és fertilis, míg más allélek késői bábletálisak. Ezek a homozigóták egyértelműen olyan fenotípust mutatnak, amely a *trx* csoportba tartozó gének mutáns

alléljeire jellemző. Ugyanakkor mindkét csoport alléljai heterozigóta formában egyes *Pc* csoportba tartozó gének mutáns változatainak enhanszereiként viselkednek. Az erős kölcsönhatást mutató *Pc-G* mutációk azonban nem azonosak a két csoport esetében. Ezek alapján a *gpp* gén az „enhancer of Polycomb and trithorax” néven meghatározott, látszólag ellentétes jellegzetességeket mutató csoportba tartozik. Tovább bonyolítja a képet, hogy a második, inkább életképes allélek *trx*-szerű fenotípusa gyenge domiáns formában is megmutatkozik, míg a letális csoport nem mutat domináns fenotípust. Végül jelentős különbséget találtunk a két csoport között abban is, hogy míg az egyszerű funkcióvesztéses allélek heterozigóta állapotban jelentősen visszaszorítják az ún. telomerikus inaktivációt, a másik csoport alléljai ilyen hatást nem mutatnak. Érdeemes megjegyezni, hogy egyelőre a *gpp* az egyetlen olyan gén a muslicában, amelynek egyszerű funkcióvesztéses mutációi képesek heterozigóta állapotban a telomerikus inaktivációt jelentős mértékben módosítani. (Hasonló hatást csak olyan deléciók váltanak ki, amelyek egyidejűleg három, a *Pc-G*-ba tartozó gént távolítanak el, ilyenek pl. a *Su(z)2* génkomplexet eltávolító deléciók.) Ez a hatás azonban csak közvetett lehet, mivel a telomerikus régiókban nem mutatható ki a K79-en metilált H3 jelenléte. Feltételezésünk szerint a *gpp* gén dózisének a csökkentése csökkent H3 K79 metilációhoz vezet az egész genom területén, amely ahhoz vezethet, hogy a *Pc-G* fehérjék egy része olyan régiókhoz is kötődik aspecifikusan, amelyek normális körülmények között nem képesek ezeket a fehérjéket megkötni. Az aspecifikus kötődés azután versenghet a „szabad” *Pc-G* fehérjékért a telomerikus régiókkal. Ennek a feltevésnek az értékelése, valamint a különböző *gpp* mutáns típusoknak a magyarázata további, elsősorban molekuláris vizsgálatokat igényel, ezért az eddigi eredményeinket egy cikkben összefoglaltuk, és a *Genetics*-ben közöltük. ([Shanower GA, Muller M, Blanton JL, Honti V, Gyurkovics H, Schedl P](#): Characterization of the grappa gene, the Drosophila histone H3 lysine 79 methyltransferase. *Genetics*. 2005 Jan; 169(1):173-84. Epub 2004 Sep 15.

Francois Karch laboratóriumával együttműködve kimutattuk, hogy a korábban transkripció aktivátorként ismert, specifikus DNS-kötő fehérje, a GRAINYHEAD (GRH) fontos kiegészítő szerepet játszik a különböző *PC-G* fehérje-komplexeknek az *iab-7* PRE-hez való kötésében. Érdeklődésünket a GRH iránt az keltette fel, hogy 5, egy komplementációs csoportba tartozó letális mutációt találtunk a mutánsgyűjteményünkben, amelyek a későbbiek során allélikusnak bizonyultak már ismert *grh* mutációkkal. Megállapítottuk, hogy mind az általunk izolált, mind a már korábban ismert *grh* mutációk (köztük jól jellemzett „null” allélek is) genetikai interakciókat mutatnak olyan heterozigóta deléciókkal, amelyek eltávolítják az *iab-7* PRE-t.

Ebből arra következtettünk, hogy a GRH fehérjének szerepe van az *iab-7* PRE normális működésében. A GRH működésének megértése érdekében *in vitro* kísérleteket végeztünk. Nukleáris fehérjekivonat segítségével végzett DNS footprint elemzéssel kimutattuk, hogy a minimális, transzgenikus kísérletekben még PRE-ként viselkedő DNS szakasztól proximális irányban egy magas, és egy alacsony affinitású GRH kötőhely található. Ezek közül a magas affinitású kötőhely bakteriálisan kifejeztetett GRH felhasználásával is kimutatható, míg az alacsony affinitású kötőhelyhez a GRH csak a másik kötőhelyet elfoglaló GRH molekulával, valamint egy ismeretlen fehérjével kooperálva képes kötődni. Ez utóbbi ugyancsak DNS kötő fehérje, és feltételezésünk szerint a két GRH kötőhelyet elválasztó DNS szakasz olyan mértékű meghajlításához szükséges, amely lehetővé teszi a GRH dimerizálódását. A dimerizálódás elősegíti a DNS-hez való kötődést. Kísérleteink szerint a GRH egy másik, az *iab-7* PRE DNS-t ugyancsak szekvensspecifikusan kötni képes fehérjével, a PLEIOHOMEOTIC-kal is együttműködik *in vitro*. A PLEIOHOMEOTIC (PHO) fehérjéről korábban kimutatták, hogy feltétlenül szükséges a PC-G fehérje-komplexeknek a PRE-khez való kötődéséhez. A GRH és a PHO oly módon működik együtt, hogy kölcsönösen stabilizálják egymás DNS-hez való kötődését. A két fehérje együttműködése *in vivo* is igazolható, mivel kettős heterozigóta mutáns kombinációk (*pho/+; grh/+*) az *iab-7* PRE-t tartalmazó transzgeneken szinergista hatást mutatnak. Eredményeink alapján felállítottunk egy modellt, amelynek a lényege az, hogy a PC-G fehérje-komplexeknek az *iab-7* PRE-hez való hatékony és specifikus kötődését számos DNS-kötő fehérje több szinten történő kooperatív kapcsolata teszi lehetővé. A különböző, egymással együttműködő DNS-kötő fehérjék egy olyan, számos fehérje-fehérje kapcsolatot lehetővé tevő „platformot” alakítanak ki, amelyhez rendkívül nagy affinitással képesek kötődni az egyes, preformált PC-G fehérje-komplexek. A folyamatnak ez utóbbi jellegzetessége biztosítja a kötődés nagyfokú szelektivitását. Az általunk javasolt modell számos ponton hasonló az ún. „enhanceosoma” kialakulásához, és felveti annak a lehetőségét, hogy nagyméretű fehérje-komplexeknek meghatározott DNS szakaszokhoz való specifikus kötődését minden esetben hasonló elvek szabják meg. Ezeket az eredményeinket a *Molecular and Cellular Biology* c. folyóiratban közzeltük. ([Blastyak A, Mishra RK, Karch F, Gyurkovics H](#): Efficient and specific targeting of Polycomb group proteins requires cooperative interaction between grainyhead and pleiohomeotic. *Mol Cell Biol.* 2006 Feb;26(4):1434-44.

Korábbi eredményeinkre alapozva genetikai kísérletekkel valószínűsítettük, hogy az *iab-7* PRE (illetve általában a BX-D-ben található PRE-k) kettős feladatot lát el. (Részletesebben lásd alább.) Ezek egyike az, hogy az *iab-7* *cisz*-regulátorban található enhanszerek hatását a

célgénre (*Abd-B*) módosítja az *A7*-ben, vagyis abban a szelvényben, amelyben az *iab-7* cis-regulátor „nyitott” állapotban van. Ez a megfigyelés felveti azt a kérdést, hogy a PRE miképp kerül a nagy távolságban elhelyezkedő célgénhez elegendő közelségbe. Ez a kérdés közvetlenül kapcsolódik ahhoz az általánosabb kérdéshez, hogy az egyes cis-regulátor régiókban található szabályozó elemek, a PRE-ken kívül, így pl. enhanszer szekvenciák, hogyan kerülnek a hatásuk kifejtéséhez szükséges szoros kapcsolatba az általuk specifikusan szabályozott célgénnek promoter régiójával, különös tekintettel arra, hogy a távolság cis-regulátor és célgén között meghaladhatja az 50 kilobázist. Ezért Sipos Lászlóval közösen egy mini review keretein belül számba vettük azokat a szekvenciákat, illetve szabályozó elemeket, amelyek szerepet játszhatnak az *Abd-B* szabályozási egységen belül a nagy távolságot áthidaló, promoter – szabályozó elemek közötti kölcsönhatások elősegítésében. Áttekintésünk elsősorban egy, az utóbbi években nagy figyelmet keltő DNS szakasszal, az ún. Promoter Targeting Sequence-szel (PTS) foglalkozik. A PTS közvetlenül a *Fab-8* izolátor elem (boundary region) szomszédságában, az *iab-7* cis-regulátoron belül található. Számos kísérlet igazolta, hogy ez a DNS szekvencia nem csak arra képes, hogy az izolátor elemeknek az enhanszer-promoter kapcsolatot blokkoló hatását kivédje, hanem arra is, hogy kiválasszon egyet az izolátor másik oldalán helyet foglaló két, elvileg egyenrangú promoter közül, és az enhanszert tartósan ehhez a véletlenszerűen kiválasztott promoterhez kösse. Még meglepőbb azonban, hogy ez a véletlenszerű választás generációról generációra változatlanul tovább adódik, vagyis sem a mitózis, sem a meiózis során végbemenő kromatin-szerkezeti változások nem képesek megváltoztatni. A PTS-nek mindezek a rendkívüli tulajdonságai azonban csak transzgenikus vonalakban figyelhetők meg. Áttekintésünkben felhívtuk a figyelmet arra, hogy korábbi genetikai adatok lényegében kizárják azt a lehetőséget, hogy a PTS az eredeti kontextusában (az *iab-7* cis-regulátor elemen belül) olyan módon működhessen, amint azt a transzgenikus eredmények alapján várnánk, és tulajdonképpen a PTS transzgenikus viselkedése egyfajta műterméknek tekinthető. Végeredményben úgy foglaltunk állást, hogy bár a PTS (és más, hasonló szerepű szekvenciák) játszhatnak szerepet a távoli enhanszerek és célgénjeik közötti kapcsolat kialakításában, semmi esetre sem lehetnek egyedüli szereplői ennek az összetett folyamatnak. Többek között a PRE-knek is lehet ilyen szerepük. ([Sipos L., Gyurkovics H.](#): Long-distance interactions between enhancers and promoters. FEBS J. 2005 Jul; 272(13):3253-9.)

A pályázat időszakában lezártuk azokat a régóta folyó genetikai kísérleteinket, amelyek segítségével azt kívántuk bizonyítani, hogy a bithorax komplex regulációs doménjeinek

nemcsak az inaktív (zárt kromatinszerkezetű), hanem az aktív (nyitott kromatinszerkezetű) állapotában is fontos szerepet játszik a Polycomb rendszer, illetve a PRE-k. Feltételezésünk szerint a PRE-k szerepe az inaktív cis-regulátorok zárt kromatin-konformációjának fenntartásán kívül az is, hogy az aktív regulációs doméneknél módosítsák (a megfelelő mértékre csökkentésük) a doméneknél található enhanszerek hatását a célgénre (pl. *Abd-B*). Kísérleteink során a legnagyobb nehézséget éppen az a körülmény okozta, hogy a fenotípus szintjén nehéz elkülöníteni azt a hatást, ami egy, az adott szelvényben normálisan inaktív állapotú cis-regulátor részbeni aktiválódása („ektopikus aktiváció”) okoz attól, ami az aktív doméneknél található enhanszerek megnövekedett aktivitása („hiperaktiváció”) okoz. Számos, különböző irányú próbálkozás után végül az *Enhancer of zeste (E(z))* gén egy hőérzékeny mutánsának (*S2*) segítségével sikerült a kétféle hatást nagyrészt elkülönítenünk, és megállapítanunk, hogy az  $E(z)^{S2}$  allélt homozigóta formában hordozó legyek átmeneti hőmérsékleten (25 °C) nevelve elsősorban a hiperaktiváció hatását mutatják anélkül, hogy az ektopikus aktiváció hatása megfigyelhető lenne. Megállapítottuk, hogy ez a hatás az *iab-7* doméneknél belül együttműködni képes PRE-k számának csökkentésével erősödik, ami közvetlenül alá támasztja az eredeti feltevésünk helyességét. Ezekről az eredményekről egyikünk (Gy. H.) meghívott előadóként előadást tartott a Hyderabadban megrendezett EMBO konferencián („Upstream and downstream of HOX genes”, 2005. december 12-19.). Jelenleg eredményeink közlemény formájában való összefoglalásán dolgozunk.

A pályázat folyamán létrehoztunk négy különböző, az *iab-7* mag-PRE-n kívül a környező DNS különböző szakaszait is tartalmazó transzgenikus konstrukcióval transzformált vonalat annak érdekében, hogy a PRE közvetlen közelében általunk feltételezett Trithorax Response Element (TRE) helyét és kiterjedését meghatározzuk. Ismert tény, hogy izolált PRE-k transzgenikus formában képesek a transzgén inszerciós helyének környezetében található endogén PRE-kal együttműködni. Céljainknak azonban csak azok a vonalak felelnek meg, amelyekben a PRE/TRE autonóm módon, az inszerció helyétől függetlenül működik. Annak az esélye, hogy az idegen kromoszómális környezetben az *iab-7* PRE autonóm módon működik, azokban a vonalakban a legnagyobb, amelyek csak párosodott formában inaktiválják a *w* riporter gént. Az ilyen vonalakat úgy válogattuk ki, hogy eltávolítottuk az egyes vonalaktól a PRE-t, és megvizsgáltuk, hogy heterozigóta állapotban változik-e ennek hatására a szemszín. (Ezt az a körülmény tette lehetővé, hogy a PRE-t ún. flip recombinase target (FRT) helyek közé építettük be úgy, hogy a „flipase” enzim, amelyet egy másik transzgén segítségével juttatunk a rendszerbe, a PRE-t képes legyen kivágni). Ha a PRE csak

homozigóta formában (azaz önmagával párosodott állapotban) képes inaktiválni a riporter gént, akkor a PRE eltávolítása semmilyen hatással nincs a heterozigóták szemszínére. Ezzel szemben azonban azt találtuk, hogy a vonalak nagyobb részében a PRE eltávolításának hatására a szemszín megerősödött, ami azt jelenti, hogy ezekben az esetekben a PRE heterozigóta állapotban is inaktivál valamilyen mértékben. Mivel ezekben az esetekben nem lehet kizárni, hogy a transzgenikus PRE egy másik, ismeretlen, *cis* helyzetű PRE-vel működik együtt, ezeket a vonalakat kizártuk a további vizsgálatokból. A fennmaradt vonalak felhasználásával a TRE-t egy hozzávetőleg 250 bp hosszú szakaszra térképeztük a minimális PRE-től (kb 260 bp) mintegy 500 bp távolságra, proximális irányban.

A kromatin szintjén történő génaktivitás-szabályozás alapvető kérdése, hogy miképpen képes az epigenetikus szabályozó fehérjék rendszere felismerni és megkülönböztetni a minta kialakulása során transzkripcionálisan aktívvá vált régiókat a represszált állapotba kerültektől. Nemcsak a fenntartó működésre történő átváltás során kérdéses, hogy hogyan történik a kifejeződési minta újbóli felismerése, hanem az egymást követő sejtosztódások során is, hiszen nem könnyű megérteni, hogy miközben a teljes genom DNS szinten megkettőződik, és a reguláló kromatinfehérjék disszociálnak kötőhelyeikről, az utódsejtek mégis képesek hibátlanul reprodukálni elődeik expressziós mintázatát.

A fenti kérdések megválaszolásához elengedhetetlen azoknak az elemeknek az azonosítása, amelyek ebben a döntési folyamatban kulcsszerepet játszanak. Vizsgálataink kiindulópontjául egy, a *Polycomb*-csoportba tartozó *Enhancer of zeste* gén különleges, domináns mutációja szolgált, amelyet fenotípusa alapján *Trithorax mimic*-nek (*Trm*) neveztünk el. A mutáns fehérjéről korábban bizonyítottuk, hogy jól működő represszor, de az aktívan tartandó kromatin régiókat is részlegesen inaktiválja. A mutáns fehérjében tehát egy olyan elem sérült meg, aminek szerepe van az inaktív kromatin-domének felismerésében, és a represszió megfelelő helyre történő irányításában. A mutáns fehérje működésének megértése közelebb vihet annak az általános kérdésnek a megválaszolásához, hogy minek alapján ismerődnek fel a represszált domének és épülnek újjá a megfelelő helyen a represszor komplexek.

Korábbi vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a mutáns fehérje kompetál a vad fehérjével, tehát ugyanazokon a kromoszómális helyeken működik, mint a vad fehérje. Speciális, más laboratóriumok által izolált független  $E(z)$  pontmutánsok segítségével valószínűsítettük, hogy a homeotikus gének inaktivációjában az  $E(z)$  fehérje dimer (esetleg

multimer) formában vesz részt. A mutáns allélt megszekvenáltuk és a parentális allélhez képest egyetlen báziscserét találtunk, amely a 741. arginin aminosav lizinre cserélődését okozza. 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 felállítottunk egy a hipotézist, amely szerint az  $E(z)^{Trm}$  allél olyan mutáns represszort kódol, amelynek inaktiváló funkciója érintetlen, míg az aktiváló fehérjékre jellemző lizint tartalmazó mutáns SET terminális régió nem képes különbséget tenni az aktív és inaktív kromatin domének között, ezért represszál végül olyan régiókat is, amelyeknek aktívna kéne maradni.

A pályázat időtartama alatt Frank Sauer laboratóriumával együttműködve mesterségesen, Sf9 sejtvonalon termelt vad és TRM mutáns E(Z) fehérjék felhasználásával sikerült *in vitro* kötődést kimutatnunk az E(Z) fehérjék SAC-SET-doménjei között, ezzel biokémiaailag is alátámasztottuk a genetikai eredményeink alapján kialakított feltevésünket, hogy az E(Z) fehérje dimer / multimer formában működik. Ehhez kapcsolódik az a megfigyelésünk, hogy a *trx* csoportba tartozó ASH1 és a TRX fehérje is képes *in vitro* kötődni a vad és *Trm* mutáns E(Z) fragmentekhez. A vad és mutáns E(Z) fehérjék nem különböztek a SET-domén interakciók tekintetében.

Az elmúlt időszak fontos eredménye, hogy sikerült kimutatnunk a mesterségesen termelt vad és  $E(z)^{TRM}$  mutáns fehérjéről, hogy képesek specifikusan kötődni a hiszton H3 N-terminális farki régióhoz. Még jelentősebb az az eredmény, hogy mind a vad, mind a mutáns E(Z) fehérje 273 aminosav hosszúságú C-terminális darabja hiszton-metil-transzferáz aktivitást mutat *in vitro*. Megvizsgáltuk *in vitro* termelt, kovalensen módosított (speciálisan foszforilált és metilált) peptidek, és mesterségesen termelt, tisztított vad és  $E(z)^{TRM}$  mutáns fehérje segítségével a két fehérje hiszton-metil-transzferáz aktivitásának hasonlóságait és különbségeit. Megállapítottuk, hogy mindkét fehérje a H3 hiszton 9. lizin aminosavára specifikus hiszton-metil-transzferáz aktivitást mutat. Azt is megállapítottuk, hogy az aktivitás specifikus, de igen gyenge, az általunk beállított *in vitro* rendszerben óránként mindössze 1-10 szubsztrát molekula metilálódik. Más laboratóriumokban tisztított E(Z) fehérjét tartalmazó komplexek aktivitása hasonlóan alacsony szintű volt, tehát az alacsony aktivitás általános jellemzője az E(Z)-típusú hiszton-metil-transzferázoknak (Muller J, et al.,2002). Bár a mutáns és a vad fehérje aktivitása kismértékben különbözőnek mutatkozott, azt a korábbi



feltevésünket, hogy az  $E(z)^{TRM}$  mutáns fehérje képes lenne metilálni a H3 hiszton farkat a 9. pozícióban lévő lizin aminosavon abban az esetben is, ha a 10. pozícióban lévő serin aminosav foszforilált, kísérleteink nem igazolták. Ezzel szemben azt találtuk, hogy a 4. lizin aminosavon metilált peptid szubsztrátokon a mutáns fehérje a vadnál hatékonyabban működik. Feltételezhető, hogy az aktív kromatin doménekre jellemző 4. lizin metilációt a mutáns fehérje könnyebben figyelmen kívül hagyja, ezért az aktiváció irányába determinált kromatinon is képes a repressziós irányra jellemző mintázatot kialakítani.

Transzgenikus riporter rendszer segítségével (lásd fentebb) megállapítottuk, hogy a funkcionyeréses *Enhancer of zeste* mutáció csak akkor képes kifejteni a hatását izolált PREn, ha a transzgén egyúttal tartalmaz egy szomszédos Trithorax Response Element-et (TRE) is. Ez az eredmény, valamint az a körülmény, hogy *E(z)* mutációk és a trithorax csoportba tartozó gének mutációnak kombinálásával szokatlanul erős genetikai interakciókat mutattunk ki, arra utal, hogy az aktiváló hatású fehérjék kompetálnak az inaktiváló fehérjékkel. Különösen figyelemre méltó az a megfigyelésünk, hogy két funkcióvesztéses, hiszton metilációra nem képes, pontmutáns fehérjét kódoló *ash1* allél (*ash1<sup>10</sup>*, *ash1<sup>21</sup>*) a null alléllal ellentétes genetikai interakciót mutat. Míg a deléciós *ash1* allélek jelentősen erősítik a Trm fenotípusát, az *ash1<sup>10</sup>* és *ash1<sup>21</sup>* allélek szuppresszálják azt. Erre a jelenségre az lehet a magyarázat, hogy a pontmutáns ASH1 fehérjék katalitikusan inaktívak ugyan, de továbbra is képesek a szubsztráthoz hatékonyan kötődni, ilyen módon kompetálni a TRM-mel. Tekintettel arra, hogy mind a TRM, mind az ASH1 helyhez kötött (a PRE, illetve a TRE szekvenciákhoz), a közös szubsztrátum nem lehet más, mint egy, vagy legfeljebb két nukleoszóma. Ennek a vetélkedésnek a kimenetele döntő hatással van a célgén aktivitására. Amennyiben ezt a következtetésünket más módon is alá tudnánk támasztani, az jelentősen megváltoztatná az ún. hiszton kód értelmezésére vonatkozó képünket, mivel a kódot „előállító” fehérjék a gyenge katalitikus aktivitásuk révén, valamint az ennek következményeként leírható térbeli kompetíció révén ezek a fehérjék egyúttal a kódot „leolvasó” rendszernek is részei lennének. Az ezeket az eredményeinket bemutató posztert (Bajusz I., Sauer F., Schedl P. and Gyurkovics H.: The central role of the SET-domain containing histone-methyl-transferase protein Enhancer of zeste in the establishment of the epigenetically silenced state) kiválasztották a Hyderabadban rendezett EMBO konferencián („Upstream and downstream of HOX genes”, 2005. december 12-19.) való bemutatásra.

A mutánsgyűjteményünk egyik letális komplementációs csoportjának tagjai domináns interakciókat mutattak a PcG mutáns alléljeivel, ezért ezt a csoportot feltételesen besoroltuk a PcG tagjai sorába. A génnek a *Piros szem (Pis)* nevet adtuk. Deléciós térképezés segítségével a *Pis* gént azonosítottuk az adatbázisban szereplő CG16975, prediktált transzkripció egységgel. A CG16975 szekvenciának megfelelő virtuális fehérje tartalmaz SAM és mbt fehérje-doméneket, és ennyiben hasonlít más, PC csoportba tartozó fehérjékre, mint pl. a *Sexcombs on midleg*-re. Kétszeri kísérletünk, hogy a *Pis* fehérjével szemben jó minőségű ellenanyagot állítsunk elő, nem járt sikerrel, így ez a jövő feladata lesz.

Mutánsgyűjteményünk egy másik, háromtagú letális komplementációs csoportja a mutánsok fenotípusa alapján egy, a *trx* csoportba tartozó gént (*Fehér szem, Fes*) reprezentál. Ezt a gént genetikai térképezéssel a második kromoszóma 35-ös citológiai régiójára lokalizáltuk. A régiót átfedő deléciók egyike sem mutatott letalitást, vagy egyértelmű fenotípust a mutánsainkkal, így ennek a génnek az azonosítása további munkát igényel.

Röntgen-mutagenézis segítségével sikerült letális revertánsokat előállítanunk az egyik egyelőre névtelen, életképes és feltehetőleg funkcionyeréses mutációból. Ezzel a génnel az elmúlt időszakban egyéb elfoglaltságaink miatt nem tudtunk érdemi munkát végezni.

Végül megemlítendő, hogy az időszak elején kiderítettük a *bonus (bon)* gén alléljeiről, hogy nem a PRE-n, hanem a transz génekben használt *white* riportengéneken keresztül hatnak, így a *bon* génnel a továbbiakban nem foglalkoztunk.

