

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

***A Drosophila melanogaster p53 sumoilációjának molekuláris  
biológiai és genetikai vizsgálata***

**Pardi Norbert**

**Témavezető: Dr. Boros Imre  
Egyetemi tanár**

**Biológia Doktori Iskola**

Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar  
Biokémia és Molekuláris Biológiai Tanszék  
Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központ  
Biokémia Intézet

**SZEGED  
2011**

## Bevezetés

A p53 egyike a legismertebb tumor szupresszoroknak. Számos ráktípusban (vastagbél, tüdő, emlő, nyelöcső, máj, húgyhólyag, petefészek, agy) ezen gén mutációját is kimutatták. Az is nagyon gyakori, hogy nem a p53-ban bekövetkező mutáció vezet tumorok kialakulásához, hanem a p53 aktiválódási útvonalában történik hiba. Az aktiválódott p53 képes gátolni a sejtciklust, vagy apoptózist tud előidézni, és fontos szerepet játszik a sejt differenciálódás indukciójában is. Kimutatták, hogy a vad típusú p53 gátolja az érképződést tumorokban az új véredények képzésében részt vevő gének szabályzásával. A p53 sejtciklus gátló funkciója a fehérje transzkripciós faktorként történő működésén keresztül valósul meg. A p53 számos apoptotikus gén transzkripciós aktiválására is képes.

## Célkitűzések

Az ezredfordulón azonosították a p53 tumor szupresszor *Drosophila melanogaster* ortológját. A humán és az *ecetmuslica* fehérje számos hasonló funkcióval rendelkezik, tehát úgy tűnik, hogy a p53-mal kapcsolatos jelátviteli útvonalak - legalább részben - konzerváltak. Mivel a p53 egy nagyon fontos fehérje, minden róla kapott információ érdekes lehet. A rendelkezésünkre álló *ecetmuslica* - mint soksejtű modellorganizmus - kiváló lehetőséget teremt a fehérje részletes biokémiai és genetikai vizsgálatához.

Munkám kezdeti szakaszában Dmp53 kölcsönható fehérjéket azonosítottam *Drosophila* embrionális cDNS könyvtáron végrehajtott nagyléptékű szűréssel. Ezek közt Dmp53-mal interakcióba lépő fehérjeként azonosítottam a sumoilációban szerepet játszó enzimeket is. Dolgozatomban a Dmp53 SUMO-módosításával kapcsolatos kérdésekre keresem a választ.

Célul tűztem ki annak meghatározását, hogy az élesztő két-hibrid kísérletből Dmp53-kölcsönható partnerként azonosított - a sumoilációban szerepet játszó -

DmUba2 (SUMO-aktiváló), DmUbc9 (SUMO-konjugáló) és DmPias (SUMO-ligáz) fehérjék a Dmp53 mely régiójával lépnek kölcsönhatásba.

Célom volt a Dmp53 és a SUMO-módosításban részt vevő fehérjéket kódoló gének közötti genetikai kölcsönhatás vizsgálata.

Célul tűztem ki a Dmp53 konszenzus sumoilációs helyet megváltoztató mutáció hatásának vizsgálatát a fehérje *in vivo* működésére.

## **Anyagok és módszerek**

*In vitro* rekombináns DNS technikák

Nukleinsav-preparálás

Polimeráz láncreakció, kvantitatív reverz transzkripcó-kapcsolt PCR

Northern analízis

Western analízis

Immunprecipitáció

Élesztő két-hibrid kísérletek

GST-pulldown módszer

Transzgenikus *Drosophila melanogaster* törzsek létrehozása P-elem inszercióval és a  $\phi$ C31 transzgén integrációs rendszerrel

*In vivo* funkcionális vizsgálatok UAS-GAL4 rendszerrel

Szárnyklón mozaikok létrehozása, LOH teszt

*Drosophila* lárvális szövetek immunfestése

*Drosophila* (S2) sejt kultúra fenntartása és transzformáció

Luciferáz aktivitás mérése

## Eredmények

### **1. A Dmp53 C-terminálisa vesz részt a sumoilációs enzimekkel kialakított kölcsönhatásban**

Élesztő két-hibrid módszer segítségével kimutattam, hogy a Dmp53 C-terminális doménje vesz részt a sumoilációban szerepet játszó fehérjékkel kialakított kölcsönhatásban. A C-terminális funkcionálisan két részre bontható: az oligomerizációs, és az úgynevezett basic doménre. A Dmp53-DmUba2 kölcsönhatáshoz a basic domén szükséges, a DmUbc9 külön-külön az oligomerizációs, illetve a basic doménnel is interakcióba lép, míg a Dmp53-DmPias kölcsönhatás kialakításában a teljes hosszúságú C-terminális domén részt vesz. Az élesztő két-hibrid módszerrel kimutatott kölcsönhatásokat GST-pulldown kísérlettel erősítettem meg. A Dmp53 szekvenciájában egy olyan helyet találtam, amely tökéletesen megfelel a konszenzus sumoilációs szekvenciának. Ennek a helynek a megváltoztatása nem befolyásolja a vizsgált kölcsönhatásokat, és a fehérje továbbra is kötődik a sumoilációs enzimekhez.

### **2. A sumoilációs aktivitás részleges elvesztése csökkenti a Dmp53 DNS javításban betöltött aktivitását**

Megvizsgáltam, hogy a Dmp53 és a SUMO módosításban részt vevő fehérjéket kódoló gének között genetikai kölcsönhatást ki tudok-e mutatni. Ecetmuslicában a genomban történő hibák felhalmozódásának mérésére alkalmas technika a LOH rendszer, amelyben a *Drosophila* szárnyon az *mwh* gén termékének hiányában kialakuló több szőrszálalat eredményező fenotípus megjelenését vizsgáljuk. Ezt a rendszert használtam annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy vajon a muslicákban a sumoilációs aktivitás csökkenése hatással van-e a *Dmp53* mutátor fenotípusára. *Dmp53* és *mwh* heterozigóta háttéren hoztam létre olyan állatokat, amelyek *Su(var)2-10* vagy *lwr* vagy *smt3* vagy *lwr-smt3* heterozigóta mutánsok

voltak, és vizsgáltam rajtuk, hogy röntgensugárzás hatására a szárnyklónok száma hogyan változik. Azt az eredményt kaptam, hogy a sumoilációs aktivitás részleges elvesztése növeli a *Dmp53* mutátor fenotípusát (nőtt a klónok száma), ami azt sugallja, hogy a sumoiláció hiánya, vagy csökkent mértékű megvalósulása csökkenti a *Dmp53* DNS károsodások kijavítását biztosító aktivitását.

### **3. A sumoilációs enzimek csökkent mennyisége nem befolyásolja a *Dmp53*-túlermelés okozta szemfenotípust**

Amikor a sumoilációs enzimek csökkent mennyiségének hatását vizsgáltam a *Dmp53* szemben történő túlermelésére, a *lwr/smt3/lwr-smt3/Su(var)2-10* gének egyetlen kópiája ugyanolyan hatású, mintha mindkét kópia jelen lenne, tehát a fehérjék alacsonyabb mennyisége nem okoz lényeges szemfenotípus változást a *Dmp53* túlermelés esetén.

### **4. A *Dmp53* fehérje állatokban történő túlermelése súlyos fenotípusokat okoz, a *K302R* mutáció miatt az állatok korábbi fejlődési állapotban pusztulnak el**

A *Dmp53* további *in vivo* vizsgálatához transzgenikus állatokat hoztam létre, először P-elem alapú technikával. Vizsgálataim során azt szerettem volna megtudni, hogy a fehérjét túlermelve látok-e fenotípus különbséget a vad típusú, illetve mutáns *Dmp53*-at expresszáló állatok között. Kísérleteimben az UAS-GAL4 rendszert használva, általános és szövetspecifikus driverek segítségével hajtottam meg a transzgéneket, és vizsgáltam a kapott fenotípusokat. Kísérleteimben két *Dmp53*<sup>K302R</sup> fehérjét túlermelő törzset használtam, egyik a 2., a másik pedig a 3. kromoszómára beépült transzgént tartalmazott. Akár a 2., akár a 3. kromoszómás mutáns *Dmp53*-at termelő törzset használtam, súlyosabb fenotípusokat kaptam, mint a vad típusú fehérjét expresszáló törzsnél. Megfigyeltem, hogy a hím állatok minden esetben erőteljesebb fenotípusokat mutattak, mint a nőstények. Előállítottam *Dmp53* és *Dmp53*<sup>K302R</sup> transzgént hordozó törzseket, amelyeknél a beépülés a muslica 2. vagy a

3. kromoszómájának ugyanabba a régiójába történt. Ezekkel a törzsekkel is megvizsgáltam, hogy a fehérje túlermelése eredményezi-e a korábban látott fenotípus különbségeket a *Dmp53*, illetve a *Dmp53*<sup>K302R</sup> transzgén tartalmazó állatok között. A korábban tapasztaltakkal ellentétben sokkal kisebb mértékű volt a különbség, nem olyan drasztikus, mint amit a random inszertálódott transzgén tartalmazó állatoknál tapasztaltam.

Felvetődött a kérdés, hogy vajon a súlyosabb fenotípusokat a magasabb fehérjeszint okozza? Ennek a kérdésnek a tisztázására olyan transzgenikus állatokat állítottam elő, amelyek két kópia vad típusú *Dmp53*-at tartalmaznak, így nagyobb mennyiségű fehérjét termelnek. Ha ezekben az állatokban expresszáltattam a fehérjét, akkor azt tapasztaltam, hogy a nagyobb mennyiségű fehérje erősebb fenotípusokat eredményez, hasonló, mint amelyet a *Dmp53*<sup>K302R</sup> túlermelő állatoknál figyeltem meg. Ugyanakkor, azoknál a muslicáknál, amelyek a *Dmp53*-nak egy domináns negatív formáját (*Dmp53*<sup>H159N</sup>), valamint a *Dmp53*<sup>K302R</sup>-t is termelték, azt tapasztaltam, hogy a fenotípusok enyhülést mutattak, vagyis a vad típusú, kevesebb fehérjét tartalmazó állatokhoz lettek hasonlók. Ez a két kísérlet azt bizonyítja, hogy a *Dmp53* transzgenikus állatoknál látott fenotípusok súlyosságát elsősorban a *Dmp53* fehérje mennyisége határozza meg.

### **5. A *Dmp53* fehérje a *K302R* mutáció eredményeként stabilizálódik**

Továbbhaladva, Western analízissel ellenőriztem transzgenikus muslicáinkban a *Dmp53* mennyiségét. Azt tapasztaltam, hogy a pontmutáns fehérjét túlermelő random inszertálódott transzgén tartalmazó állatokban a fehérje stabilizálódik, és nagy mennyiségben van jelen, sokkal több van belőle, mint a vad típusút expresszáló társaikban. Ugyanezen mintákból megpróbáltam a *Dmp53* SUMO-módosított formáját is kimutatni, de nem jártam sikerrel. A helyspecifikusan integrálódott transzgén tartalmazó legyekben a mutáns és vad típusú *Dmp53*-at túlermelő legyek körülbelül egyforma mennyiségű fehérjét képeznek.

A Dmp53 és Dmp53<sup>K302R</sup> transzgéneket hordozó, random inszercióval előállított állatoknál Northern blot és Q-PCR technikával mértem meg a géntermékek mennyiségét. Azt az eredményt kaptam, hogy a Dmp53<sup>K302R</sup> transzgénről nem íródik át több mRNS, mint a Dmp53 transzgénről. Ezen eredmény alapján azt a konklúziót vontam le, hogy a Dmp53<sup>K302R</sup> transzgenikus állatokban stabilizálódik a fehérje, és ez súlyosabb fenotípusokat okoz.

## **6. A Dmp53 SUMO-módosítása sem muslicákból, sem S2 sejtekből készült fehérje preparátumokon nem mutatható ki**

A sumoiláció kimutatásának általánosan használt módszere annak transzfektált sejtekben történő detektálása. Ezért megpróbáltam a SUMO-módosítás S2 sejtekben történő kimutatását. A Dmp53 és Dmp53<sup>K302R</sup> fehérjéket tranzienst transzfekcióval túltermeltem a sejtekben, majd Western analízist végeztem, és azt tapasztaltam, hogy - bár a fehérjét sikerült túltermelni - SUMO-módosított Dmp53 frakciót nem tudtam detektálni. Ezt követően immunoprecipitációval próbálkoztam: nagyobb mennyiségű S2 sejt kultúrát transzfektáltam, és ebből próbáltam meg kicsapni a Dmp53-at. Ez utóbbi kísérletet is többször megismételtem, de nem tudtam kedvező eredményre jutni. Végeztem kotranszfekciós kísérleteket, ahol a Dmp53 mellé a SUMO-t kifejező konstrukciót is juttattam a sejtekbe, de sajnos itt sem tudunk módosítást kimutatni, holott ez a módszer a sumoiláció kimutatásának széleskörűen alkalmazott módja.

## **7. A Dmp53 fehérje a sejtmagban helyezkedik el, és a K302R mutáció hatására nem változik meg lokalizációja**

A sumoiláció számos jól jellemzett biológiai funkcióval rendelkezik. Ismert, hogy bizonyos fehérjék sumoiláltak, illetve módosítatlan formája különböző sejten belüli elhelyezkedést mutat, tehát a sumoiláció/desumoiláció szükséges a fehérje citoplazma és sejtmag közötti transzportjához. Immunfestést alkalmazva *Drosophila* szöveteken

azt tapasztaltam, hogy a Dmp53 fehérje vad típusú, illetve K302R mutáns formája is, a sejtmagban helyezkedik el, ami azt mutatja, hogy a fehérje transzportját a SUMO-módosítás nem, vagy nem önmagában befolyásolja.

#### **8. A Dmp53-ban létrehozott K302R mutáció nem változtatja meg a Dmp53 transzkripciós aktivitását**

A sumoiláció egyik jól ismert hatása, hogy a célfehérje transzkripciós aktivitását képes módosítani. S2 sejteken végeztem luciferáz aktivitásmérést, ahol a Dmp53 és Dmp53<sup>K302R</sup> transzkripcióra gyakorolt hatását tudtam mérni. Kísérleteimben nem találtam lényeges különbséget a vad típusú és mutáns fehérje transzkripcióra kifejtett hatásában.



## Közlemények jegyzéke

Daxx-like protein of *Drosophila* interacts with Dmp53 and affects longevity and Ark mRNA level.

Bodai L, Pardi N, Ujfaludi Z, Bereczki O, Komonyi O, Balint E, Boros IM  
*J Biol Chem.* 2007 Dec 14;282(50):36386-93.

IF: 5,854

TATA binding protein associated factor 3 (TAF3) interacts with p53 and inhibits its function.

Bereczki O, Ujfaludi Z, Pardi N, Nagy Z, Tora L, Boros IM, Balint E  
*BMC Mol Biol.* 2008 Jun 12;9:57.

IF: 4,485

In vivo effects of abolishing the single canonical sumoylation site in the C-terminal region of *Drosophila* p53

Pardi N, Vamos E, Ujfaludi Z, Komonyi O, Bodai L, Boros IM  
*Acta Biol. Hung.* 62 (4), 2011

IF: 0,636

## Konferencia előadások és poszterek

30. FEBS Kongresszus – 9. IUBMB Konferencia, 2005.

**N. Pardi**, Z. Ujfaludi, L. Bodai, O. Bereczki, É. Bálint and I. M. Boros

**Identification and characterization of p53-interacting proteins and target genes in *Drosophila melanogaster* (poszter)**

20. Nemzetközi IUBMB Kongresszus, 2006.

**N. Pardi**, L. Bodai, É. Bálint and I. M. Boros

**The role of sumoylation in *Drosophila melanogaster* p53 function (poszter)**

8. Nemzetközi *Drosophila* heterokromatin konferencia, 2007.

**N. Pardi**, L. Bodai, O. Komonyi, Z. Ujfaludi, O. Bereczki, É. Bálint, and I. M. Boros

**Daxx-like protein of *Drosophila* interacts with Dmp53 and effects longevity and Ark mRNA level (poszter)**

32. FEBS Kongresszus, 2007.

O. Bereczki, Z. Ujfaludi, **N. Pardi**, L. Tora, I. M. Boros, E. Balint

**Evolutionarily conserved interaction of P53 with *Drosophila melanogaster* Bip2/mammalian TAF3 (poszter)**

Magyar Biokémia Egyesület Vándorgyűlése, 2008.

Berezki O., Újfaludi Z., **Pardi N.**, Boros I. M., Bálint É.

**Analysis of the TAF3-p53 interaction (poszter)**

Magyar Biokémia Egyesület Vándorgyűlése, 2006.

Berezki O., **Pardi N.**, Boros I. M., Bálint É.

**Functional analysis of the p53-TAF3 and p53-Bip2 interactions (poszter)**

Magyar Biokémia Egyesület Vándorgyűlése, 2004.

Újfaludi Z., Berezki O., Czeglédsky A., **Pardi N.**, Bálint É., Boros I. M.

**Identification of regulating proteins for Dmp53 (=Drosophila p53) and by Dmp53 regulated genes (poszter)**

Magyar Biokémia Egyesület Vándorgyűlése, 2003.

A. Czeglédsky, **N. Pardi**, É. Balint, I. M. Boros

**Identification of *Drosophila* p53 interacting proteins using yeast two-hybrid screen (poszter)**

Straub napok, 2007.

**Norbert Pardi**, Orbán Komonyi, László Bodai, Újfaludi Zsuzsanna, Éva Bálint, Orsolya Berezki, Imre M. Boros

***Drosophila* p53- a model for the better understanding of human p53 function (előadás)**

## **Köszönetnyilvánítás**

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Boros Imrének szakmai irányítását, hasznos tanácsait, valamint a dolgozatom átolvasását és észrevételeit. Hálásan köszönöm Ökrösné Katalin gyakorlati tanácsait és önzetlen segítségét, mellyel munkámhoz hozzájárult. Köszönettel tartozom Bálint Évának munkám kezdetén nyújtott segítségéért. Ezen felül köszönettel tartozom csoportunk minden tagjának, mert lehetővé tették, hogy munkámat kellemes, vidám légkörben végezhettem. Végezetül szeretném megköszönni családom támogatását, amely a nyugodt háttér biztosításával segítette, hogy a munkámra tudjak koncentrálni.

## Társszerzői nyilatkozat

Alulírott Prof. Dr. Boros Imre kijelentem, hogy Pardi Norbert „A *Drosophila melanogaster* p53 sumoilációjának molekuláris biológiai és genetikai vizsgálata” című Ph.D. értekezésében felhasznált **In vivo effects of abolishing the single canonical sumoylation site in the C-terminal region of Drosophila p53 (Pardi N, Vamos E, Ujfaludi Z, Komonyi O, Bodai L, Boros IM Acta Biol. Hung. 62 (4), 2011)** és **Daxx-like protein of Drosophila interacts with Dmp53 and affects longevity and Ark mRNA level (Bodai L, Pardi N, Ujfaludi Z, Bereczki O, Komonyi O, Balint E, Boros IM J Biol Chem. 2007 Dec 14;282(50):36386-93)** publikációkból származó eredményekhez meghatározó fontossággal hozzájárult.

Kijelentem, hogy az általa felhasznált eredményeket az első/társszerzők nem használták fel tudományos fokozat megszerzéséhez, és azt a jövőben sem teszik. Más jelöltnek nem adok ki hasonló jellegű nyilatkozatot a fenti publikációkat illetően.

Prof. Dr. Boros Imre

Szeged, 2011. február 24.