

A *Drosophila* p53 működésének vizsgálata

Doktori értekezés

Készítette: Újfaludi Zsuzsanna

Témavezetők:

Dr. Bálint Éva

Dr. Boros Imre Miklós

Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar

Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

Szeged, 2008.

Tartalomjegyzék

| | |
|---|-----------|
| <u>1. Bevezetés</u> | 4 |
| 1.1. A humán és <i>Drosophila</i> p53 fehérje- és génszerkezete..... | 4 |
| 1.2. Az emlős p53 stresszválaszokban betöltött szerepe..... | 7 |
| 1.3. A Dmp53 <i>in vivo</i> funkciói..... | 13 |
| <u>2. Célkitűzések</u> | 17 |
| <u>3. Felhasznált anyagok és módszerek</u> | 19 |
| 3.1. UVC, röntgen és hősokk kezelés..... | 19 |
| 3.2. RNS izolálás és egyes szálú cDNS szintézis..... | 19 |
| 3.3. Génexpresszió mérés kvantitatív real time PCR (QPCR) módszerrel..... | 20 |
| 3.4. Transzkriptom vizsgálat DNS microarray módszerrel..... | 21 |
| 3.5. Transzkripció faktor kötőhelyek bioinformatikai analízise..... | 22 |
| 3.6. Apoptózis kimutatása akridin orange festéssel..... | 22 |
| 3.7. Használt <i>Drosophila melanogaster</i> törzsek, keresztezések..... | 22 |
| 3.8. Fehérje-fehérje kölcsönhatás kimutatása élesztő két-hibrid módszerrel..... | 23 |
| <u>4. Eredmények</u> | 25 |
| 4.1. A <i>Dmp53</i> null mutáns ecetmuslicák fokozottan UVC érzékenyek..... | 25 |
| 4.2. Különböző DNS károsodások eredményeként eltérően aktiválódnak egyes <i>Dmp53</i> -tól függő pro-apoptotikus gének..... | 26 |
| 4.3. UVC sugárzás hatására számos gén expressziója <i>Dmp53</i> -tól függően indukálódik...28 | |
| 4.4. A <i>Dmp53</i> különböző jellegű DNS károsodások hatására eltérő géncsoportok transzkripcióját módosítja..... | 32 |
| 4.5. A <i>Dmp53</i> jelenlétében indukálódó gének nem tartalmaznak p53 konszenzus kötőhelyeket..... | 33 |
| 4.6. A <i>Dmp53</i> és CG11985 fehérjék kölcsönhatásának vizsgálata élesztő két-hibrid módszerrel..... | 35 |

| | |
|--|-----------|
| 4.7. A Daxx Drosophila homológja, a DLP, a Dmp53 működését szuppressálja és részt vesz az <i>Ark</i> alap expressziójának szabályozásában..... | 36 |
| 4.8. A dADA2a Drosophila transzkripciós adapter szerepet játszik a Dmp53 működésében..... | 40 |
| <u>5. Az eredmények megvitatása</u> | 43 |
| <u>6. Köszönetnyilvánítás</u> | 51 |
| <u>7. A doktori értekezés összefoglalója</u> | 52 |
| <u>8. Summary</u> | 58 |
| <u>9. Irodalmi jegyzék</u> | 63 |
| <u>10. Rövidítések jegyzéke</u> | 72 |
| <u>11. Függelék</u> | 74 |
| <u>12. Publikációs lista</u> | 76 |

1. Bevezetés

1.1. A humán és *Drosophila* p53 fehérje- és génszerkezete

1979-ben DeLeo és munkatársai azonosítottak egy, a rákos transzformációra jellemző antigént, amelyet mind a kémiai indukált szarkóma, mind az egyéb módokon transzformált egér sejtvonalakban kimutattak (37). A fehérjét molekulatömege alapján p53-nak nevezték el. Ugyanezt a fehérjét szinte egy időben ezzel a felfedezéssel, egymástól függetlenül Arnold Levine és David Lane csoportjaiban is azonosították és kimutatták, hogy a majomvírus 40 (simian vírus 40, SV40) nagy T antigénjével képes kölcsönhatásba lépni (76, 86). 1981-ben Crawford és munkatársai a humán p53 fehérjét számos rákos sejtvonalban kimutatták. Megállapították, hogy a sejtek SV40 vírussal való fertőzése után a p53 annak nagy T antigénjével kölcsönhatásba lép és foszforilálódik. Feltételezték, hogy a foszforilált p53 jelenléte kapcsolatban áll a sejtek tumoros transzformációjával (34). Ezt követően, habár kis mennyiségben, normális ütemben osztódó sejtekben is kimutatták a p53 proteint (66) és megfigyelték, hogy G₀ fázisban levő, nem osztódó limfocitákban a p53 nem szintetizálódott. Amikor azonban a limfociták osztódását stimulálták, a p53 újra detektálhatóvá vált (103). Ezek az adatok a p53 sejtciklussal való kapcsolatát valószínűsítették. Mercer és munkatársai 1982-ben bizonyították, hogy a p53 szükséges a sejtek S fázisba lépéséhez (98). Ezen első közlemények alapján a p53 fehérjét sokáig onkogénnek tekintették, 1989-ben azonban Finlay és munkatársai bebizonyították, hogy ezzel ellenkezően a p53 egy tumor szuppresszor (45).

A p53-ról, mint tumor szuppresszorról napvilágot látott első biztató eredmények a fehérjét a rákkutatás egyik központi molekulájává tették. Számos kutatócsoport foglalkozott a p53-t kódoló gén jellemzésével és a fehérje szerkezetének megismerésével. 1983-ban Oren és Levine SV40 vírussal fertőzött SVT2 egér sejtekből poliszómákat izolált, majd monoklonális p53 antitesttel végzett immunprecipitációval kizselektálta a p53 mRNS-ét tartalmazókat. Az mRNS izolálását követően azt templátként használva radioaktív cDNS próbát szintetizáltak, amelyet hibridizálva a fent említett sejtekből előállított cDNS könyvtárral egy p53-specifikus szekvenciát tartalmazó klónt azonosítottak. Az izolált plazmid inszertje Southern-blot kísérletben egy 3,3 kb hosszú genomi DNS fragmenthez kötődött (111). Ezekkel a kísérletekkel azonosították először a p53 fehérjét kódoló mRNS-t, illetve gént. 1985 és 1986-ban az egér homológ segítségével három független csoport azonosította fibroblasztokban a humán p53-t

kódoló cDNS-t. *In situ* hibridizációval a humán *p53* gént a 17-es kromoszóma rövid karjának 13-as régiójába (17p13) térképezték és feltételezték, hogy bizonyos daganatos elváltozások esetén érinthetik a más proto-onkogének esetében már leírt kromoszómális átrendeződések (61, 95, 102). A gén szerkezete 1984-ben vált ismertté. Bienz és munkatársai leírták, hogy a gén legalább 11 exonból és 10 intronból áll (22) és az 5' végén egy nem kódoló exont is tartalmaz, amelyben evolúciósan konzervált, a képződő mRNS stabilitását befolyásoló szekven-
cia található. A gén promóterének vizsgálata során világossá vált, hogy abban sem TATA, sem CAT box nem azonosítható. E tekintetben a *p53* szabályozó régiója hasonlóságot mutat egyes növekedési faktorok – transzformáló növekedési faktor- β (transforming growth factor β , TGF- β), epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) – szabályozó részével, amelyek transzkripciója több faktort és szignált is igényel. Emellett azt sem zárták ki, hogy a TATA box hiánya többszörös transzkripciós iniciációs helyet jelez. A *c-myc* és *N-ras* génekhez hasonlóan a *p53* promóterében is azonosítottak, a transzkripciót negatívan szabályzó upstream elemet (21).

A *p53* fehérje aminosav szekvenciájáról az első információk 1983-ban láttak napvilágot (82). Matlashewski és munkatársai egy évvel később izoláltak egy humán cDNS klónt, amely tartalmazta a *p53* szinte teljes nyitott leolvasási keretét és a 3' nem transzlálódó régiót is. A humán és egér *p53* elsődleges aminosav szekvenciákat összehasonlítva, erős, 84%-os hasonlóságot mutattak ki (93). 1986-ban Harris és csoportja bebizonyította, hogy a *p53* izoformái különböző mRNS-ekről transzlálódnak (58). Arai és munkatársai a különböző mRNS formákat alternatív mRNS érés eredményének tekintették (8). A kilencedik exon alternatív splicingjával képződő rövidebb mRNS transzlációja során a *p53* 341 aminosavat tartalmazó *p53AS* izoformája keletkezik, amely a karboxi terminálisán tér el a teljes hosszúságú *p53* izoformától (47). A *p53AS* izoforma szerepe még tisztázatlan. Finlay és munkatársai 1988-ban bebizonyították, hogy az eredetileg daganat sejtekből izolált *p53* a fehérje egy mutáns formája és meghatározták a vad típusú *p53* cDNS szekvenciáját (46). A *p53* komplett cDNS szekvenciájának felderítésével a 393 aminosavból álló fehérje teljes aminosav sorrendje is ismertté vált. Az SV40 nagy T antigénje és a *p53* közötti kölcsönhatás vizsgálata során utóbbi középső és C-terminális végén két, evolúciósan konzervált régiót azonosítottak, amelyek az interakció kialakulásához szükségesek. Azt is feltételezték, hogy ezeknek a régióknak fontos szerepe lehet a *p53* normális működésében és a T antigén a *p53* sejtbeli célpontjait szorítja ki kötődésével (67). A C-terminális vég valóban jelentős szereppel bír a *p53* stabilitásában. Kraiss és munkatársai 1988-ban kimutatták, hogy a *p53* fehérje képes oligomereket kialakítani. A nagy molekulatömegű formákat tumorosan transzformált sejtvonalakban azonosí-

tották, ezért feltételezték, hogy a p53 fehérje molekulák összekapcsolódása a sejtek rákos átalakulásával van összefüggésben (73), azonban ma már tudjuk, hogy a fehérje normális működéséhez a p53 oligomerek kialakulása nélkülözhetetlen. 1993-ban élesztő két-hibrid kísérletekben igazolták, hogy a p53 oligomerizációért felelős régiója a karboxi terminálisán található. Megfigyelték, hogy a fehérje mutáns formája képes a vad típusúhoz kötődni és arra gátló hatást gyakorol (64). A p53 fehérjének valójában két autonóm oligomerizációért felelős része van: a karboxi terminálison elhelyezkedő erős tetramerizációs, és a fehérje közepén található gyenge oligomerizációs domének. A mutáns p53 a tetramerizációs doménon keresztül fejt ki domináns negatív hatását, ami végül a sejtek tumoros transzformációjához vezet (134).

A p53 szekvencia-specifikus DNS kötésre képes és ezáltal a transzkripciót aktiválja (43, 44, 50, 71). Az örökítő anyag károsodása esetén célgénjei kifejeződésének szabályozásán keresztül DNS javító folyamatokat aktivál, sejtciklus leállást vagy apoptózist vált ki, ezáltal a p53 gátolja a sérült sejtek rákos transzformációját. Az egyik elsőként azonosított célgénjének, a *WAF1 (Cip1)*-nek a kifejeződését a p53 serkenti és a képződő fehérje termék a proliferációt gátolja (41, 44). A p53 DNS-kötő doménje a fehérje középső része, amelyen belül két autonóm régió található. A 280-390 aminosavak közötti nem specifikus és a 80-290 aminosavak közötti specifikus DNS kötést biztosító szubdomének (16, 126, 137). A DNS kötő domént érintő pontmutációk a p53 leggyakrabban kimutatott elváltozásai humán daganatokban (113). A p53 konszenzus kötőhelyét El-Deiry és munkatársai már 1992-ben meghatározták. A kötőhely szelekciójára alkalmas *in vitro* kísérletekben egy szimmetriát mutató szekvenciát azonosítottak, amely egy 10 bázispáros motívum – 5'PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy3' – kétszeri ismétlődéséből áll. A két részt 0-13 bázispáros szakasz választja el egymástól (40). A DNS-kötő domén a fehérje amino terminálisán található transzaktiváló savas doménnel együtt képes *in vivo* aktiválni p53-specifikus promótereket (137). A transzaktiváló domén az amino terminális 74 aminosav, melynek szerepét Fields és Jang vizsgálta először élesztőben és emlős sejtekben (44). Ez a rész az 1-42 aminosavig terjedő aktivációs szubdoménre (AD1) és a 43-63 aminosavig terjedő AD2 szubdoménre osztható. Az AD1 szubdomén fehérje-fehérje kölcsönhatásban vesz részt általános transzkripciós faktorokkal és onkogénekkal, mint például a „mouse double minute 2” (MDM2) (33). Az AD2 szubdomén egyes hivatkozások szerint adapter komplexekkel való interakciókért felelős (30), míg mások szerint az apoptózis megindításával kapcsolatos transzkripció aktivációban játszik szerepet (143). Walker és Levine 1996-ban azonosítottak öt, prolinban gazdag úgynevezett növekedési szuppresszor motívumot – PXXP – a p53 64-90 aminosaváig terjedő részében. Ezen régiók deléciója esetén a p53 a tumor sejtek növekedését nem gátolta (133). Kimutatták, hogy ennek a régiónak a p53 általi

transzkripció represszióban van szerepe (131): a p53 ugyanis egyes gének transzkripcióját nemcsak aktiválni, hanem represszálni is képes (52). Ezt a hatást azonban nem a konszenzus kötőhelyén, hanem a TATA boxon keresztül, a TATA box kötő fehérjével (TATA Binding Protein, TBP) együttműködésben fejt ki (88). Más sejtmagi fehérjékhez hasonlóan a p53 is a citoplazmában szintetizálódik, ahonnan aktívan transzportálódik a sejtmagba, ez a lépés a transzkripció faktor funkció betöltéséhez elengedhetetlen. A p53 sejtbéli elhelyezkedése a sejtciklus során változik. Immunfluoreszcens festésekkel kimutatták, hogy szérum elvonással növekedésükben megállított sejtekben a p53 a perinukleáris részeken, míg a sejtciklusba belépő sejtekben a sejtmagban lokalizálódik (38). A fehérje belépését a sejtmagba egy evolúciósan konzervált, sejtmagi lokalizációs szignál (NLS) biztosítja, amelyet a p53 fehérje 316-325 aminosavának megfelelő rész alkot (35).

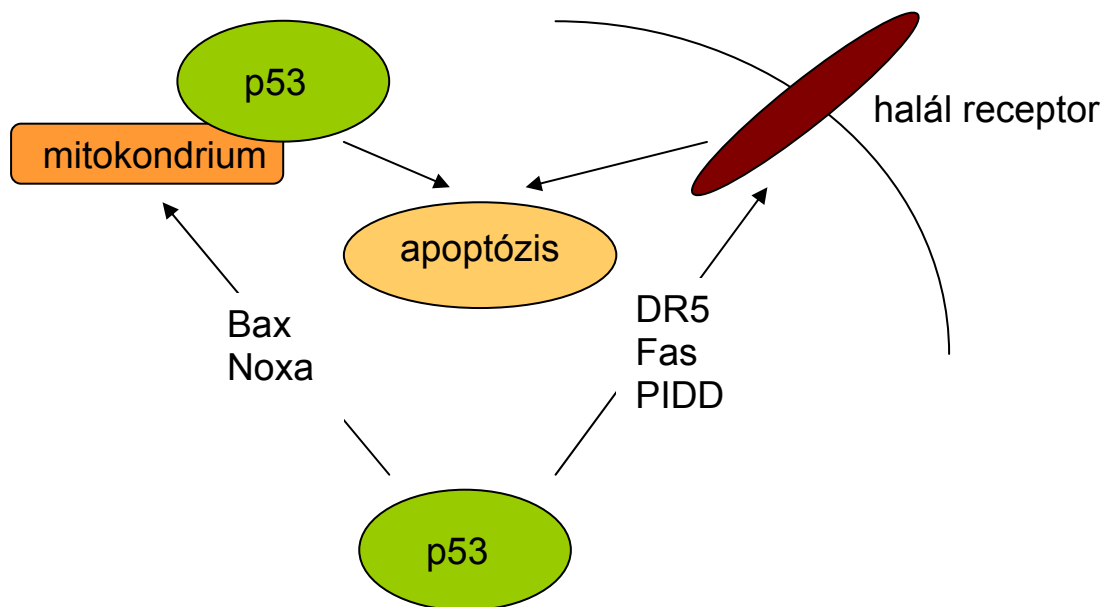
1.2. Az emlős p53 stresszválaszokban betöltött szerepe

A p53 legfontosabb szerepe a sejteket érő stressz hatására bekövetkező válaszfolyamatok összehangolása. Normális ütemben osztódó sejtekben a p53 fehérje koncentrációja nagyon alacsony, és a fehérje rövid, körülbelül 20 perces féléletideje miatt gyakran kimutathatatlan (83). A p53 gyors lebomlása ubiquitin-mediált, a 26S proteozómában bekövetkező proteolízissel történik. A ubiquitin kapcsolását a p53 fehérjéhez specifikus E3 ubiquitin ligázok – többek között az MDM2, COP1, Pirh2 – végzik. Különösen jól és részleteiben ismert a p53 szintjének MDM2 általi szabályozása. Az MDM2 a p53 amino terminálisához kötődik és annak karboxi terminálisán elhelyezkedő lizin oldalláncaihoz ubiquitint kapcsol. Ez a kölcsönhatás a p53-nak a sejtmagból a citoplazmába történő exportjához is szükséges (99). Az *mdm2* gén transzkripciója maga is p53 által szabályozott, így a két fehérje egy autoregulációs, visszacsatolós szabályozási kört alkot (138). Ez a szabályozás nemcsak a p53 alacsony szintjét tartja fenn nyugalmi körülmények között, hanem a DNS károsodások kijavítása után a megnövekedett mennyiségű p53 szint csökkentésében is szerepet játszik (127). Ezt a finoman szabályozott folyamatot stresszhatások megszakíthatják. Ilyen hatással lehetnek például az ionizáló sugárzásra bekövetkező dupla szálú DNS törések, az UVC sugárzás hatására keletkező pirimidin dimerek, a hipoxia és aktivált onkogének. Mindezek hozzájárulnak a protein féléletidejének megnövekedéséhez, a p53 szintjének gyors megemelkedéséhez és transzkripció faktorként való aktiválódásához. A p53 szintjének emelkedése és aktivitásának erősödése a DNS károsodás mértékével arányos. Az aktivitás növekedés specifikus a DNS károsodások

jellegére és így az azt okozó stresszhatásra. A sejtekben több funkció és protein adaptálódott az eltérő jellegű DNS károsodások felismerésére és azok javítására. Például ionizáló sugárzás hatására az „Ataxia-Telangiectasia-Mutated” (ATM) fehérje – a foszfatidil-inozitol-3 kináz család tagja – aktiválódik és számos proteint foszforilál. Az ugyancsak ebbe a kináz családba tartozó „Ataxia-Telangiectasia-and-Rad3-Related” (ATR) fehérje pedig a nem teljes DNS replikáció hatására aktiválódik (59). Mindkét kináz képes vagy közvetlenül a p53 15-ös pozícióban levő szerin foszforilálásával, vagy közvetve egy foszforilációs kaszkád beindításával stabilizálni és aktiválni a p53-t (31). Utóbbi esetben az ATM és ATR az effektor „checkpoint kinase 1” (Chk1) és „checkpoint kinase 2” (Chk2) kinázokat aktiválja, amelyek ezt követően a p53 fehérjét foszforilálják. A foszforiláció hatására a p53 MDM2-vel való kölcsönhatása felbomlik, így az MDM2 nem képes a p53 ubiquitinálására. A DNS károsodások alkalmával aktivált onkogének – Myc, Ras, E2F1 – az „*Alternative Reading Frame*” (ARF) transzkripciójának aktivációja révén képesek a p53 stabilitását indukálni. Az ARF egy, a p53 stabilizálásában szerepet játszó fehérje, a Ciklin-Dependens Kináz Inhibitor 2A/p19 (CDKN2A/p19) izoformája. Az ARF az MDM2-höz kötődve képes a p53 ubiquitinációját gátolni. A p53 ilyen úton történő aktiválása egy olyan védő mechanizmust biztosít, amely védelmet nyújt az abnormális sejtosztódás és a daganat képződés ellen. Lévén, hogy a p53 egy transzkripciós faktor, aktivitásának szabályozásában egy másik kulcslépés a sejtmagba történő transzportja, amely a fehérje karboxi terminálisán található NLS szekvenciákat felismerő import faktorok segítségével játszódik le. Egyes irodalmi adatok azt bizonyítják, hogy a p53 amino terminális és a tubulin között kialakuló kölcsönhatás révén a sejt mikrotubulus hálózata és az ahhoz kapcsolódó dynein motor fehérjék is szerepet játszanak a p53 DNS károsodás utáni sejtmagi felhalmozódásában (51).

Az aktivált p53 által szabályozott három fő sejtválasz a sejtciklus leállítása, az apoptózis és DNS javító folyamatok indukciója (3/A. ábra a 15. oldalon). Ezeket a p53 transzkripciós faktorként funkcionálva, specifikus gének expressziójának indukcióján és represszióján át, illetve a génkifejeződés szabályozásától független útvonalon keresztül is irányítja. A p53 a sejtciklus leállítást a p21^{WAF/Cip1} ciklin dependens kináz inhibitor génjének aktivációján keresztül szabályozza. A p21 számos ciklin és ciklin dependens kináz (Cdk) komplexéhez – ciklin D1-Cdk4, ciklin E-Cdk2, ciklin A-Cdk2 és ciklin A-Cdc4 – kötődik, ezzel meggátolja a kinázok aktivitását és a sejtciklus G1 fázisban való megállását eredményezi. A sejtciklus leállításával szemben, az apoptózis két fő útvonalának indukcióját a p53 nem egy jól definiált gén kifejeződésének szabályozásán keresztül végzi. Az apoptózishoz a p53 a DR5

és Fas – „halál receptorok” –, illetve a „halál doméneket” tartalmazó fehérjék – például PIDD – transzkripciós aktiválásával, a halál receptor sejtfelszíni megjelenésén keresztül aktiválódó útvonalat indítja be (1. ábra). A p53 más target génjeinek – például a *Bax* és *Noxa* – termékei a mitokondriumban felhalmozódnak és membránpotenciál megváltoztatásával indítják meg a programozott sejthalált (1. ábra). Abban az esetben, ha a sejtben transzkripciós blokádnak alakul ki, a p53 a mitokondrium külső membránjának dezintegrációját egy, a transzkripcióra gyakorolt hatásától független útvonalon is képes indukálni. A sejtben felhalmozódott p53 a mitokondriumba transzlokálódik, ahol komplexeket alakít ki a Bcl-2 és Bcl-xL proteinekkel, ami a külső membrán permeabilizálódásához és a citokróm *c* sejtplazmában való megjelenéséhez vezet (89, 101).



1. ábra: A p53 által szabályozott apoptótikus utak

Az ábrán a p53 által szabályozott két fő apoptótikus útvonal vázlatja és azok főbb résztvevői szerepelnek.

Felmerül a kérdés, hogy hogyan „választ” a p53 az apoptózis indukciója és a sejtciklus leállítása között. Sokféle mutáns p53 esetében megfigyelték a sejtciklus leállítást és az apoptózis indukciót kiváltó funkciók elkülönülését. Ennek ellenére lehetséges, hogy a p53-nak a végső sejtválasz determinálásában nincs szerepe, hanem aktivációja után mindig azonos jeleket küld, indukálja mind az apoptóziskor, mind a sejtciklus leállításkor aktivált target génjeit. Ezt az elképzelést az a megfigyelés támasztja alá, hogy a p53 által indukált apoptózis

gátlásakor a p53-függő sejtciklus leállítás automatikusan bekövetkezik. Ez az úgynevezett „buta” p53 modell, amely szerint a p53 aktivációja mindig apoptotikus szignált indít be. Ezt a túlélési szignálok elfojthatják, vagy elérhet egy küszöbértéket, amely más, független apoptotikus szignálokkal együttműködve megöli a sejteket. A modell egyik variációja szerint a p53 minden stimulus hatására azonos módon működik, de apoptotikus célgénjeinek transzkripció aktivációjához más, azok promóteréhez kötődő transzkripció faktor közreműködését is igényli. Egyik jó példája ennek az NF- κ B hozzájárulása a p53 által kiváltott sejthalálhoz, ami jelzi, hogy egyes p53 apoptotikus célgének indukciójához mindkét transzkripció faktor működése szükséges. A sejtciklus leállításakor indukált target gének aktiválása azonban nem igényli több transzkripció faktor egyidejű közreműködését (120). Egy másik elgondolás szerint a p53 működésével kijelöli a sejtválasz végső kimenetelét. Ez az úgynevezett „okos” p53 modell, amely szerint a p53 különbözően viselkedik a sejtciklus leállítására, illetve a sejthalálra determinált sejtekben, és a p53 különböző formái aktiválják az egyes folyamatok beindításában szerepet játszó célgéneket. A p53 sejtbeli mennyisége befolyásolhatja az általa kiváltott választ. Megfigyelték, hogy ha a p53 mennyisége kevés, akkor inkább a sejtciklus leállást, míg ha magas, akkor inkább apoptózist vált ki. Az eltérő sejtválasz a p53 célgénjei promótereihez való különböző erősségű affinitásával is magyarázható. A modell egyik továbbgondolása szerint a p53 kötődését a célgének promóteréhez befolyásolhatják a p53 poszttranszlációs módosításai is. Több p53 módosításról, többek között a foszforilációról, acetilációról, szumoilációról és glikozilációról is kimutatták, hogy a p53 konformációjában létrehozott finom változtatások által befolyásolják a p53 DNS-kötő és transzaktiváló képességét (72, 109). A poszttranszlációs módosítások hatással lehetnek a p53 más koaktivátorokkal – például ASPP2 – létesített interakcióira is, amelyek az apoptotikus gének expressziójához szükségesek (132).

A DNS javító folyamatokban a p53 egyrészt a transzkripció szabályozásával, másrészt a reparációs gépezettel direkt interakcióba lépve is részt vesz. A p53 képes közvetlenül kötődni egyes szálú DNS-hez is (11, 80). Magasabbrendű eukariótákban az UV sugárzás okozta ciklobutan típusú pirimidin dimereket és a 6-4 fotoproduktumokat a nukleotidok kivágását végző „Nucleotide Excision Repair” (NER) javító mechanizmus távolítja el. A NER két, mechanizmusában eltérő altípusa a transzkripcióval kapcsolt reparáció (Transcription Coupled Repair, TCR) és a globális genom javítás (Global Genome Repair, GGR), amelyeket a p53 egyaránt képes irányítani. Kimutatták, hogy a p53 a transzkripció kapcsolt reparációt csak UVB sugárzást követően aktiválja (92). A p53 működése elengedhetetlen a GGR lezajlásához, annak főleg hatékonyságát befolyásolja mind a fotoproduktumok, mind a pirimidin

dimerek javításakor (57). A p53 NER-re gyakorolt hatása részleteiben nem ismert. Feltételezik, hogy a többi sejtválaszhoz hasonlóan célgénnek transzkripciójának szabályozásán keresztül befolyásolja azt, tulajdonképpen „építőköveket” biztosítva a DNS javításához. A p53 egyik ilyen fő targetje a p48 javító faktor, amely a NER komplex tagja (57). A „*growth arrest- and DNA damage inducible 45*” (*Gadd45*) gén p53 általi, UV sugárzás utáni indukciója is a DNS javítást segíti elő a *Gadd45*-nek a „Proliferating Cell Nuclear Antigen”-nel (PCNA) történő asszociációján keresztül (124). UV sugárzás hatására a p53 a *xeroderma pigmentosum C (XPC)*, és egy ribonukleotid reduktázt kódoló gén – *p53R2* – transzkripcióját is erősíti (4, 108, 128). A p53 által szabályozott sejtciklus leállítás és DNS javítás egyes tanulmányok szerint egymással nem összefüggő folyamatok. A GGR beindításakor ugyanis a p53 nem transzaktiválja a *p21^{WAF1/CIP1}* gént (5). A p53 célgénjeinek aktiválásán túl számos, TFIIH asszociált NER faktorra való kölcsönhatásán keresztül is hatással van a DNS javító folyamatokra (136). Kimutatták, hogy a NER kialakulásában a p53 és a replikációs protein A (replication protein A, RPA) interakciójának is szerepe van, ugyanis UV hatására a két fehérje disszociál, így az RPA képes lesz a reparációban részt venni, a p53 pedig célgénjeit transzaktiválni (1, 36). Az UV sugárzást követő GGR kialakulását a p53 a hiszton acetiltransferáz (HAT) tartalmú komplex DNS sérülésekhez való koncentrálásával, ezáltal a kromatin globális fellazulásával kezdeményezi, amely elengedhetetlen a reparációs faktorok DNS léziókhöz való hozzáférésehez (119).

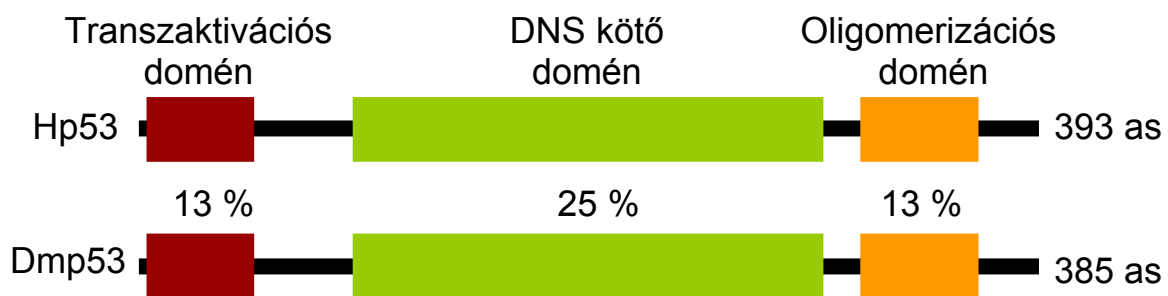
Számos hiszton-módosító aktivitással rendelkező transzkripció koaktivátor és korepresszor komplexről bebizonyosodott, hogy képesek *in vivo* a p53 fehérjével kölcsönhatásba lépni, ami jelzi, hogy a célzott kromatin módosításoknak fontos szerepe lehet a p53 transzkripció faktor funkciójának ellátásában (87, 107). A hiszton acetiltransferázok és -deacetilázok nemcsak hisztonok, hanem egyéb fehérjék, többek között a p53 acetilálását/deacetilálását is végzik (87, 121). Kimutatták, hogy a koaktivátor és hiszton acetil transferáz aktivitású p300, a p53 karboxi terminálisának számos lizinjét acetilálja. Ez kritikus a p53 DNS kötő képességének szabályozásában, illetve hatással van a p53 stabilitására és a sejten belüli lokalizációjára is (54, 87, 121). Az MDM2 elősegíti a p53-nak a hiszton deacetiláz 1 (HDAC1) komplex általi deacetilációját, ezáltal pedig degradációját (62). Egyes p53 célgénnek transzaktivációjában nem a p53 acetilációjának, hanem a hiszton módosításoknak van nagyobb súlya. A p53 acetilációja például a *p21^{WAF1/CIP1}* aktivációját közvetve, annak promóter régiójában a hiszton acetiláció módosításán keresztül befolyásolja. Az acetilált p53 ugyanis a „CREB binding protein” (CBP) és a „transformation/transcription domain-associated protein” (TRRAP) fehérjék illetve a p21 promóterének asszociációját segíti és ezen keresztül a H3 és

H4 hisztonok acetilációját serkenti. Így a *p21* promóter környezetében lokálisan fellazult kromatin a transzkripciós komplex DNS-hez való hozzáférését és végső soron a génkifejeződés erősödését eredményezi (18). A p53 és hiszton deacetiláz komplexek közötti interakciónak a p53 általi transzkripció represszióban van szerepe. Ennek egyik jó példája a *Map4* repressziója p53 által. A p53 képes a HDAC1 komplexhez kapcsolódó mSin3A korepresszort a *Map4* promóteréhez kötni. Ezzel elősegíti a hiszton deacetilációt, a promóter zártabb konformációjának kialakulását és végeredményben a transzkripció csökkenését (107). A p53 kromatin módosító komplexekkel való kapcsolata tehát többoldalú: egyrészt a p53 módosítása a komplexek által közvetlenül hatással van a fehérje működésére, másrészt a p53 képes célgénjeinek kifejeződését módosítani a komplexekkel együttműködve, harmadrészt pedig a globális hiszton acetiláció elősegítésével a p53 DNS-javító folyamatok beindítását segíti elő.

A p53 funkcióit nemcsak poszttranszlációs módosításai, hanem más transzkripciós- és kofaktorokkal kialakított kölcsönhatásai is befolyásolják. A p53 működését moduláló kofaktorok egyike a halál doménnel asszociált faktor 6 (death domain associated factor 6, Daxx). A Daxx-nak az apoptózisban kettős szerepet tulajdonítanak. A Daxx-ot mint egy, a Fas receptort kötő, citoplazmában lokalizálódó fehérjét azonosították, és kimutatták, hogy közvetlenül aktiválva az „apoptosis signal-kinase 1 (ASK1)/ Jun N-terminal kinase 1 (JNK1)” útvonalat az apoptózis kiváltásában játszik szerepet (32, 140). A Daxx részt vesz a TGF β -n keresztül aktiválódó programozott sejtihalál útvonalban is (114). A Daxx hiánya egérben kiterjedt apoptózist és korai embrionális letalitást okoz, ami a Daxx lehetséges anti-apoptótikus hatására utal (100). Ezt alátámasztja az a megfigyelés is, miszerint malignus myelocitákban a p53 és más pro-apoptótikus gének expressziójára a Daxx negatív hatással van (24). Anti-apoptótikus hatását tehát a sejtmagba transzportálva fejt ki, ahol a transzkripció regulációjában vesz részt (42, 84, 122). Többek között a p53 transzaktiváló hatását modulálja, annak karboxi terminálisával kialakított kölcsönhatásán keresztül, ami alátámasztja a fentebb említett „buta” p53 modell egyik feltevését. A Daxx ugyanis a *p21*^{WAF1/CIP1} transzaktivációját gátolja, azonban más pro-apoptótikus célgénnek p53 általi szabályozására nincs hatással. Ezzel a Daxx a p53 közreműködésével kiváltott sejtciklus leállítás és apoptózis közti egyensúlyt befolyásolja (53).

1.3. A Dmp53 *in vivo* funkciói

A p53 tumor szuppresszor által szabályozott folyamatok pontosabb ismerete fontos a humán daganatok kialakulásának megértésében és terápiás eljárások kidolgozásában. A bonyolult sejtszintű folyamatok jól tanulmányozhatók biológiai modellek alkalmazásával, mint például a *Drosophila melanogaster*, ami egy genetikailag jól jellemzett, könnyen kezelhető organizmus. A *Drosophila* genom-projekt befejeződésekor végzett összehasonlító vizsgálatok során fény derült arra, hogy a humán daganatok kialakulásában szerepet játszó gének két harmadának homológja megtalálható az ecetmuslicában (3, 19, 49). 2000-ben 3 független csoport azonosította a *Drosophila melanogaster p53 (Dmp53)* génjét (27, 68, 110). A *Dmp53* gén a harmadik kromoszóma jobb karján, a 94D10 citológiai régióban található. Transzkripciója során egy 3,8 kilobázisos, 8 exont és 7 intront, valamint nem transzlálódó régiókat tartalmazó mRNS képződik, amely a Dmp53 fehérje A izformáját kódolja. Újabb annotációk szerint a fehérjének egy másik – B – izoformája is létezik, amelynek 4,4 kilobázis hosszú mRNS-e 9 exont tartalmaz és transzkripciója egy távolabbi, az A izoformáét megelőző start pontból indul. A két variáns az A második, illetve a B harmadik exonjától megegyezik (Flybase). A B izoformáról irodalmi adatok nem kerültek közlésre. A Dmp53 fehérje 385 aminosavból áll, szekvencia homológia vizsgálatok szerint az emlős p53-hoz hasonló doménekkal rendelkezik. EMSA és *Drosophila* sejt kultúrával végzett kísérletekben a Dmp53 specifikusan kötődött a humán p53 konszenzus DNS-kötőhelyeihez és arról képes volt transzkripciót aktiválni, ami bizonyította, hogy a humán p53-hoz hasonlóan a Dmp53 is transzkripció aktivátor (27, 68). Élesztőben végzett egy- és két-hibrid kísérletek felfedték, hogy a Dmp53 amino terminálisán



2. ábra: A humán (Hp53) és *Drosophila* p53 (Dmp53) fehérjék szerkezete

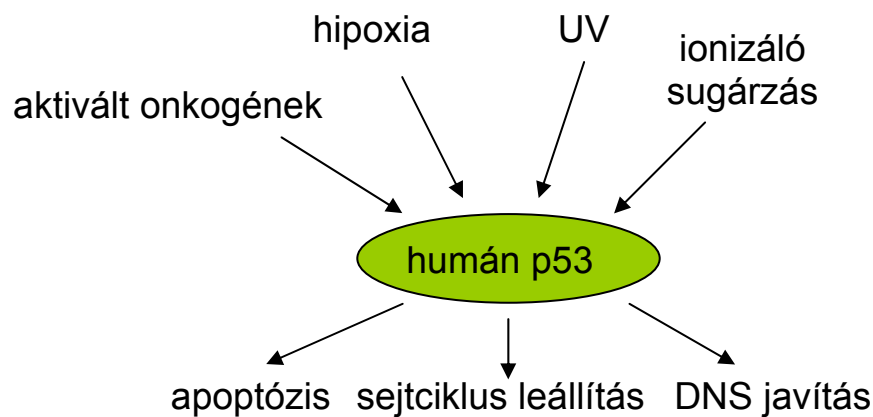
A színes részek a humán és *Drosophila* p53 fehérjék fő doménjeit és azok százalékban kifejezett hasonlóságát mutatják.

található egy transzaktivációért, illetve karboxi terminálisán egy, a fehérje oligomerizációjáért felelős domén. A humán és *Drosophila* p53 a középső, DNS-kötő doménjében mutatja a legnagyobb hasonlóságot, az amino- és karboxi terminális transzaktivációs és oligomerizációs részek konzerváltsága alacsony (2. ábra) (27).

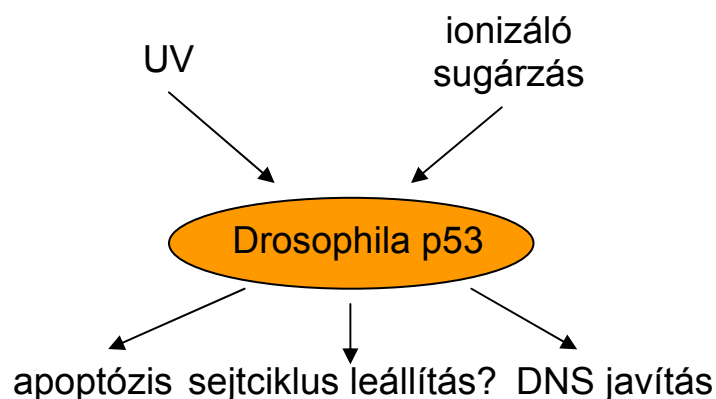
A Dmp53 és az emlős p53 hasonlósága miatt előbbi azonosítását követően főleg a sejtciklus leállításában, apoptózis-, illetve DNS javító folyamatok indukációjában betöltött szerepét tanulmányozták. Az emlős p53 DNS kötő doménjében számos, úgynevezett mutációs „forrópont” található, amelyek mutációja domináns negatív p53 fehérje termékek képződéséhez vezet. A Dmp53 DNS kötő doménjében hasonló pontmutációkat létrehozva domináns negatív Dmp53 formákat állítottak elő, amelyek *in vitro* az emlős homológához hasonlóan, a vad típusú Dmp53 DNS kötő képességét gátolták (68, 110). A Dmp53 *in vivo* működését a vad típusú, illetve domináns negatív Dmp53 túltermelésével is vizsgálták. A vad típusú Dmp53 túltermelésekor nem tapasztalható sejtciklus leállítás a G1 fázisban. A Dmp53 nem aktiválja a humán $p21^{WAF1/CIP1}$ *Drosophila melanogaster* homológját, a *dacapo*-t, amely a humán p53 specifikus célgénje a sejtciklus leállításában. Az ionizáló sugárzást követően az imágó korongokban bekövetkező sejtciklus leállásra a domináns negatív Dmp53 túltermelése nincs hatással. Ezek az eredmények azt tükrözik, hogy a röntgen sugárzás indukálta sejtciklus leállítás a *Drosophilában* a Dmp53-tól függetlenül zajlik (27, 68, 110). A Dmp53, emlős homológjához hasonló, sejtciklus leállítást indukáló képességét a mai napig nem bizonyították. A vad típusú Dmp53 túltermelése kiterjedt apoptózist vált ki a *Drosophila* szemben, a szárny diszkuszban a domináns negatív forma pedig gátolja a röntgen sugárzás kiváltotta programozott sejtthalált. Ezek az adatok a Dmp53 ionizáló sugárzás hatására kialakuló apoptózisban játszott szerepéről árulkodnak. Pro-apoptotikus gének, mint például a *reaper* (*rpr*), Dmp53 hatására bekövetkező expresszió változása alátámasztja ezt az elképzelést. A *reaper* szabályozó régiójában egy sugárzás által indukálható, az emlős p53 kötőhelyre emlékeztető szekvenciát találtak. Erről a feltételezett kötőhelyről a Dmp53 élesztő egy-hibrid kísérletben a ripoter gén transzkripcióját aktiválta. A fent említett kötőhelyet β -galaktozidáz riportert kódoló szekvencia elé építve embriókba injektálták. Ezekben a transzgenikus embriókban röntgen kezelést követően a Dmp53 képes volt a transzkripció aktivációjára (27). Egy ezen eredmények alapján felállított hipotézis szerint a Dmp53 röntgen sugárzást követően aktiválódik, majd pro-apoptotikus gének, mint a *reaper*, transzkripcióját indukálja, azonban nem módosítja a sejtciklus leállításában szerepet játszó gének kifejeződését. Ezt a modellt alátámasztotta az a megfigyelés, miszerint a mutáns Dmp53 nem képes apoptózis kiváltására és a *reaper* indukálására ionizáló sugárzást követően (79, 125). Jassim és munkatársai az UV által kiváltott sejt-

halált vizsgálták *Drosophila* retinában. Úgy találták, hogy a *reaper* nem játszik szerepet a retinában UV hatására kialakuló sejtválaszban, azonban egy másik pro-apoptotikus gén, a *hid*, aktiválódik. Emellett kimutatták, hogy a Dmp53 megvédi a retina sejtjeit az UV sugárzás következtében kialakuló apoptózistól, amit a Dmp53 DNS javító folyamatok irányításában betöltött lehetséges szerepével magyaráztak (65). A Dmp53 DNS sérülések javításában betöltött szerepére egy oligonukleotid microarray analízisben találtak bizonyítékokat. Két gén, a *Ku70* és *Ku80*, a Dmp53-tól függően aktiválódott röntgen kezelést követően. Ezen gének fehérje termékei DNS törések javításában és a nem homológ DNS végek egyesítését végző, úgynevezett „non homologous end-joining repair” folyamatokban vesznek részt (2/B. ábra a 13. oldalon) (28).

A.



B.



3. ábra: A humán (A) és *Drosophila* p53 (B) által irányított legfontosabb sejtválaszok

Az emlős p53 aktivitásának egyik fontos szabályozási mechanizmusa a különböző E3 ubiquitin ligázok – például MDM2, COP1, Pirh2 – által katalizált poliubiquitinációt követő degradációja. A *Drosophila* genomban nem találtak meggyőző hasonlóságot mutató MDM2, COP1 vagy Pirh2 homológot, továbbá az MDM2 kötőhelye sem konzerválódott a Dmp53-ban (3, 19, 49). A Chk2 *Drosophila* homológja (DmChk2) a DNS károsodás által indukálódott sejtciklus leállításban és apoptózisban fontos szerepet játszik (139). Kimutatták, hogy a DmChk2 és Dmp53 szemben való együttes túlermelése felerősíti a Dmp53 okozta apoptózist, a Chk1 *Drosophila* homológjának (DmChk1) azonban nincs hatása. A DmChk2 nem okozott a Dmp53 fehérje szintjében változást, amely azt sejtette, hogy egy DmChk2-től függő foszforilációs módosítás befolyásolta a Dmp53 DNS kötő képességét, vagy kofaktorokkal létesített interakcióját és apoptótikus hatását (115). Ezt a feltételezést bizonyította annak kimutatása, hogy a Dmp53 gél mobilitása celluláris stressz hatására megváltozik. A mobilitás változásban a DmChk2 szerepet játszik, Dmp53 szintjét azonban a DmChk2 ebben a rendszerben sem befolyásolta. Ez alapján azt a következtetést vonták le, hogy a Dmp53 működésének szabályozása nem a humán p53 és MDM2 által alkotott autoregulációs, visszacsatolósos – a fehérje mennyiségét befolyásoló – mechanizmushoz hasonlóan valósul meg, hanem működését foszforilációja befolyásolja (28).

2. Célkitűzések

1. A Dmp53 modell alkalmazásával új ismeretek szerzése a p53 tumor szuppresszor genom stabilitásban, sejtciklus szabályozásában és apoptózisban játszott szerepéről

A sejtek DNS állományának sérülésekor az emlős p53 meghatározza a sejt további sorsát részben transzkripciós faktorként működve célgénjei transzkripciójának fokozásán, vagy gátlásán keresztül. A p53 a sejtciklus leállítását és DNS javítási folyamatokat képes beindítani, azonban ha a genomot ért sérülések túl súlyosak, apoptózist indukál, amely során a sérült sejt eliminálódik. A p53 működésének pontos részletei mindazonáltal még nem világosak. A Drosophila p53 homológ hasonló működéséről kevés információ áll rendelkezésünkre. A célom az volt, hogy a Drosophila p53 transzkripciós célgénjeinek azonosításával képet kapjak a Dmp53 által szabályozott sejtválaszokról.

2. Különböző genotoxikus ágensek Dmp53-ra kifejtett hatásának vizsgálata, illetve egy ennek analizésére alkalmas kísérleti rendszer beállítása

A Drosophila p53 ionizáló sugárzást követő működéséről számos tanulmány született. Keveset tudunk azonban az UVC hatására bekövetkező sejtválaszok kialakulásában betöltött szerepéről. Célom volt egy olyan könnyen használható rendszer létrehozása, amely segítségével a p53 lehetséges célgénjei azonosíthatók. A célgének Dmp53 általi génaktivációjának vizsgálatán keresztül pedig a Dmp53 különböző genotoxikus ágensek hatására létrejövő működését kívántam tanulmányozni.

3. A csoportunk által azonosított, a Dmp53-mal kölcsönható fehérjék, illetve a dADA2a tartalmú hiszton acetil transzferáz komplex (ATAC) és a Dmp53 közti kapcsolat következményeinek vizsgálata

A humán p53 működését más transzkripciós faktorokkal, koaktivátor és korepresszor komplexekkel létesített kölcsönhatása finomíthatja. Az egyik ilyen kofaktor a Daxx, amely-

nek a humán p53-ra gyakorolt hatásáról egymásnak ellentmondó eredmények láttak napvilágot. Céлом volt annak vizsgálata, hogy milyen hatással van a Dmp53 működésére annak kölcsönhatása a Daxx *Drosophila* homológ, DLP (Daxx like protein) fehérjével.

A *Drosophila* dADA2b transzkripciós adapter fehérjét tartalmazó SAGA hiszton acetiltranszferáz aktivitással rendelkező komplex és a Dmp53 kapcsolatáról már rendelkezünk némi információval. A közelmúltban azonosított dADA2a tartalmú ATAC komplex és a Dmp53 funkcionális viszonyáról azonban nincsenek adatok. Az ATAC komplex szerepéről a Dmp53 általi transzaktivációban és apoptózis indukcióban *dAda2a* mutáns állatok segítségével kívántam képet kapni.

3. Felhasznált anyagok és módszerek

3.1. UVC, röntgen és hősokek kezelése

Korai harmadik stádiumú *Drosophila melanogaster* lárvákat (10 lárva/ Petri csésze) germicid lámpával növekvő dózissal (0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 J/m²) UVC (245 nm; 0,121 mW/cm²; 1,22 J/m²/sec) sugárzásnak tettem ki. A lámpa intenzitását Cole-Parmer 97503-00 radiométerrel határoztam meg. A fél letális dózis (LD₅₀) meghatározásához a kezelés elvégzése után az állatokat visszahelyeztem táptalajra és 8 nappal később a kikelt felnőtt állatokat megszámláltam. Génexpressziós vizsgálatokhoz 300 J/m² dózissal UVC-vel sugárztam be korai harmadik stádiumú lárvákat (10 lárva/ Petri csésze), majd visszahelyeztem őket táptalajra és 4 óra elteltével össz RNS-t izoláltam belőlük. Röntgen kezeléshez korai harmadik stádiumú *Drosophila melanogaster* lárvákat 40 Gy röntgen sugárzásnak (150 kV; 0.5-mm Al filter; 1000 R/perc) tettem ki, majd visszahelyeztem táptalajra és 2 óra elteltével össz RNS-t izoláltam (28). Apoptózis kimutatásához vándorló, harmadik stádiumú lárvákat 40 Gy röntgen sugárzással kezeltem, majd 4 órával később imaginális diszkuzaikat kipreparáltam és akridin orange festékkel megfestettem.

A *Dmp53* és *DLP* mutánsok (*DLP^{U26}*, *DLP^{U32}*, *DLP^{U42}*) röntgen érzékenységének meghatározásához harmadik stádiumú lárvákat 20 Gy ionizáló sugárzással kezeltem, majd táptalajra helyeztem (20 lárva/fióla) és a kikelt felnőtt állatok számát meghatároztam.

DLP és *Dmp53* transzgenek hősokek driverrel (*P[Hs-Gal4]*) való túltermelését felnőtt nőstények 37 °C-on történő, 60 percig tartó inkubációjával biztosítottam. A hősokekkel után 1 órával a mintákat feldolgoztam további génexpressziós vizsgálatokhoz.

3.2. RNS izolálás és egyes szálú cDNS szintézis

L3 stádiumú *Drosophila melanogaster* lárvából össz RNS-t izoláltam QIAGEN RNeasy Kit-et használva, a gyártó által mellékelt protokoll szerint, mintánként 5 darab állatot felhasználva. Az RNS koncentrációját NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer) segítségével határoztam meg. Egyes szálú cDNS-t, 1-1 µg össz RNS bemérésével az Applied Biosystems

Reverse Transcription Reagents Kit-tel szintetizáltam a gyártó útmutatása szerint, az alábbi reakció körülményeket használva: 25 °C 10 perc, 37 °C 60 perc, 95 °C 5 perc.

3.3. Génexpresszió mérés kvantitatív real time PCR (QPCR) módszerrel

Génspecifikus primereket terveztem primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi; (118) és Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) programot használva (1/A. táblázat). Annak érdekében, hogy elkerüljem az esetleges genomi DNS szennyeződésről történő amplifikációt, a primer párokat lehetőség szerint intron határra helyeztem. A szintetizált primerekkel meghatároztam a QPCR reakciókhoz használandó optimális primer koncentrációkat.

A.

| gén | Forward primer (5' - 3') | Reverz primer (5' - 3') |
|-----------------|---------------------------------|--------------------------------|
| <i>Ark</i> | TGTCGCCAATCAAGACTGAG | CATCCAAGGCTACCCAAGTC |
| <i>hid</i> | TCGCCAAGGGTTTTAGTTCT | GGATTGGATTTGATTGGGCT |
| <i>reaper</i> | CCAGTTGTGTAATTCCGAACGA | TCGCCTGATCGGGTATGTAGA |
| <i>18SRNA</i> | GCCAGCTAGCAATTGGGTGTA | CCGGAGCCCCAAAAGCTT |
| <i>l(1)dd4</i> | TAAATTCCGCCTACGATTGC | AGGTCTGCTGGTAGCACGTT |
| <i>Grip75</i> | GCGAGCGGGAGATATTTATG | ACGTCCGATCTCAGCGTAGT |
| <i>CG8319</i> | AGGCAATCTGGAAGCAAAGA | GGCATACTGTGAATTGCTG |
| <i>ballchen</i> | GGCACAGTTTTTCACCGATT | CGTGCTTCTGCATGAACTGT |
| <i>CG5620</i> | AATCTGCTGTGCTGCTGTTG | CCAGAAAGGGACAGTCGAAG |
| <i>ebi</i> | GCGTTCGTCATGAGTTTTT | CCTACGCTCCACTCCACTTC |
| <i>toutatis</i> | AGAAGTCCTCACGGGTTTTG | TGCCAGTAAACACCAAGCAG |
| <i>PP2A-B'</i> | AATTTTTGGGCTTGAGAGCA | GCTACCCAGGATTTCCAACA |
| <i>rho</i> | AACTCGGATCCGTTGTCATC | CGCTTCCATCGAAGTATTGG |
| <i>ftz-fl</i> | TTGTTCAAGTTGCGTCTCGTC | CTTCGAGCTGATGTGCAAAG |

B.

| gén | TaqMan próba |
|---------------|--|
| <i>reaper</i> | 6-FAM-AAGAAAGATAAACCAACAATGGCAGTGGCA-TAMRA |
| <i>18SRNA</i> | 6-FAM-TATGGCTCTCTCAGTCGCTTCCGGG-TAMRA |

1. táblázat: A kvantitatív real time PCR vizsgálatokban használt primerek és próbák szekvenciái

Az A. táblázat a használt primer szekvenciákat a B. a TaqMan próbák szekvenciáit tartalmazza.

A kvantitatív real time PCR reakciókat (QPCR) ABI 7500 Real Time System (Applied Biosystems) készüléken végeztem. A polimeráz láncreakciókban keletkező termékek detektálásához SYBR Green interkalálódó festéket tartalmazó Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) reagenst használtam az alábbi reakció körülményeket alkalmazva: 95 °C 10 perc; 95 °C 15 másodperc, 60 °C 1 perc (45 ciklus). A reakciók végén olvadási görbe analízist végezve ellenőriztem a keletkező termék minőségét. A *reaper* gén és a *18S RNS* endogén (bemérési) kontroll esetében TaqMan próba (1/B. táblázat) segítségével detektáltam a PCR terméket, TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems) reagenst használva. A minták „cycle threshold” (Ct) értékei a PCR reakció során minden gén esetében a 20-30 ciklusok közötti tartományba esett. Az egyes gének expresszióját relatív kvantifikálással határoztam meg az úgynevezett $\Delta\Delta Ct$ formulát használva (69). A kezelt minták endogén kontrollal való normalizált (ΔCt) expressziós értékéből kivontam a kezelt minták értékeit ($\Delta\Delta Ct$), majd a relatív expressziót a PCR hatékonyságának figyelembe vételével határoztam meg ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). A génexpressziós vizsgálatokat 3-3 függetlenül izolált mintán végeztem el, az adatokat statisztikailag párosított t-próbával értékeltem.

3.4. Transzkriptom vizsgálat DNS microarray módszerrel

Dmp53 mutáns és kontroll *w¹¹¹⁸* lárvák UVC sugárzás hatására bekövetkező globális transzkripció változásait DNS microarray kísérlettel vizsgáltam. A hibridizációt és chip leolvasást a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központjának Funkcionális Genomikai Laboratóriumában végezték az alábbiak szerint: 3-3 μg UVC kezelt, illetve kezeltlen kontroll, illetve *Dmp53* null mutáns L1-es állapotra szinkronizált *Drosophila* lárvából tisztított össz RNS-t Cy5 és Cy3 fluoreszcens festékekkel jelölték Genisphere 900 MPX jelölő rendszert alkalmazva a gyártó által ajánlott protokoll szerint. A mintákat szín páronként DGRC-1 Amplicon Transcriptome Array-re (*Drosophila* Genomics Resource Center) hibridizálták. Az array 15552 pontot tartalmaz, ami a *Drosophila melanogaster* predikált géneinek 88%-ának felel meg. 2-2 chipen hasonlították össze a vad típusú és *Dmp53* null mutáns állatok UVC sugárzásra bekövetkező expressziós profilját. A relatív expressziós hányadosokat normalizálták, majd a két kísérletből átlagot képeztek és Student-féle t-tesztet végeztek. A kísérlet elvégzése során számos technikai probléma akadt, ami miatt a statisztikai számítások adatait figyelmen kívül hagytam az eredmények értékelésekor. 1,8- és 2-szeres expressziós változást választottam overexpressziós és repressziós küszöbértékeknek.

3.5. Transzkripció faktor kötőhelyek bioinformatikai analízise

A vizsgálatokra kiválasztott gének promóter régióit a Flybase (www.flybase.org) adatbázisból nyertem ki. A 4000-7000 bázispáros genomi szekvenciákon transzkripció faktorok kötőhelyeit kerestem a Genomatix MatInspector (116) (www.matinspector.de) programmal. Az analízist emlős és *Drosophila* adatbázisokon végeztem el.

3.6. Apoptózis kimutatása akridin orange festéssel

Ionizáló sugárzással kezelt és kezeletlen w^{1118} és $dAda2a^{189}$ mutáns lárvákat PBS (137mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,4) oldatban felbontoltam és az imágó korongokat kipreparáltam, majd 1,6 µg/ml akridin orange oldatba helyeztem 5 percre. Az imágó korongokat háromszori PBS-sel történő mosást követően tárgylemezre helyeztem és fedőlemezzel lefedtem. A kész preparátumokat fluoreszcens konfokális mikroszkóppal vizsgáltam.

3.7. Használt *Drosophila melanogaster* törzsek, keresztezések

A használt *Drosophila* törzseket standard táptalajon (9,3 g agar; 61,2 g kukoricadara; 129,4 g glükóz; 32,4 g száraz élesztő; 10 ml 10% Nipagin M/ 1 liter), 25 °C-on tartottam fenn. A kísérletekben w^{1118} törzset használtam kontrollként. A $Dmp53^{5A-1-4}$ törzset Yikang S. Rong (NIH, Bethesda, USA) laboratóriuma bocsátotta rendelkezésünkre. A törzs $Dmp53$ null mutáns, amelyet a génben levő korai stop kodon okoz. A $Dmp53$ ektópikus túltermelésére alkalmas $P[UASp53]$ transzgenikus törzs Michael W. Young laboratóriumából származott (68). Az $Ada2a$ mutáns $Ada2a^{d189}$ allélt az $Ada2a$ lókuszbba inszertálódott P elem ($l(3S)096713$) kiugratásával Dr. Pankotai Tibor hozta létre (112). A DLP mutáns DLP^{U26} , DLP^{U32} és DLP^{U42} allélokat a DLP génben található RS elem ($UM-8182-3$) – amelyet a szegedi *Drosophila* Törzsközpont biztosított számunkra – remobilizálásával, Dr. Bodai László hozta létre (23). Genetikai interakciós vizsgálatokban kontrollnak ugyanezen RS elem precíz kiugratásával a DLP gén normál szerkezetét helyreállító izogenikus – továbbiakban precíz excíziós (PE) – törzset hoztunk létre (23). A DLP túltermeléséhez használt EP elemet hordozó *Drosophila*

törzseket – *EP(2)2108*, *EP(2)2193*, *EP(2)2180* – a szegedi *Drosophila* Törzsközpont bocsátotta rendelkezésünkre. Az *P[UASDLP1,7kb]* mesterséges P elemet hordozó transzgenikus állatok a DLP humán Daxx fehérjével homológ karboxi terminálisának túltermeléséhez használtam (23). A DLP túltermelését hősokk driver biztosította az alábbi genotípusú nőstény állatokban: *P[Hs-Gal4]/ EP(2)2108*, *P[Hs-Gal4]/ EP(2)2193*, *P[Hs-Gal4]/ EP(2)2180*, *P[Hs-Gal4]/P[UASDLP1,7kb]*, *P[Hs-Gal4]/+*. A Dmp53 és DLP közti genetikai interakciós kísérletet a következő keresztezésekből – *DLP^{U26};P[ey-Gal4]* nőstény \otimes *DLP^{U26};P[UASp53]/TSTL* hím, illetve *DLP^{U26}; P[ey-Gal4]* nőstény \otimes *PE;P[UASp53]/TSTL* hím – származó utódokon – *DLP^{U26}/DLP^{U26}; P[UASp53]/ P[ey-Gal4]* és *DLP^{U26}/PE; P[UASp53]/P[ey-Gal4]* – végeztem, amelyeket a *Tb⁺* fenotípus alapján szelektáltam. Az egyes genotípusú állatok szemméreteit azonos fénymikroszkópos nagyítás mellett a hosszanti tengelyük mentén lemértem, majd az adatokat statisztikailag párosított t-próbával értékeltem.

3.8. Fehérje-fehérje kölcsönhatás kimutatása élesztő két-hibrid módszerrel

A *CG11982* gén cDNS-ét az alábbi, *EcoRI* és *BglII* restrikciós endonukleáz felismerő szekvenciákat is tartalmazó primerekkel szaporítottam fel: forward – 5'-CGGAATTCATG GCAGAGGCAATG-3'; reverz – 5'-GAAGATCTAGTCCAGAAACATGTT-3'. A PCR reakcióban az alábbi körülményeket alkalmaztam: 95 °C 5 perc; 95 °C 30 másodperc, 53 °C 30 másodperc, 72 °C 90 másodperc (32 ciklus); 72 °C 10 perc. A reakcióban templátként használt plazmidot (pOT-CG11982) Dr. Erdélyi Miklós bocsátotta rendelkezésemre. A tisztított PCR terméket pTZ57R/T klónozó vektorba (Fermentas) építettem és felszaporítottam. A pTZ57R-CG11982 plazmidból a *CG11982* cDNS-t tartalmazó inszertet *EcoRI* és *BglII* restrikciós endonukleázokkal kivágtam, majd 1,5%-os agaróz gélből izoláltam V-Gene Gel Extraction Kit-et használva, a gyártó útmutatása alapján (V-Gene Biotechnology). Az inszertet élesztő két-hibrid kísérletekben használt vektorokba klónoztam. Az egyik ilyen a pGAD424, leucin szelekciós markert és Gal4 transzaktivációs domént tartalmazó plazmid (Clontech) volt, amelybe az *EcoRI* és *BglII* helyek közé építettem cDNS-t. A pBTM116, triptofán szelekciós markert és LexA DNS-kötő szekvenciát hordozó vektornak pedig az *EcoRI* és *BamHI* helyére ligáltam a CG11982 fragmentet. Az élesztő transzformációra *Saccharomyces cerevisiae* L40 törzset (*MATa his3Δ200 trp1-90 leu2-3,2-11 ade2*

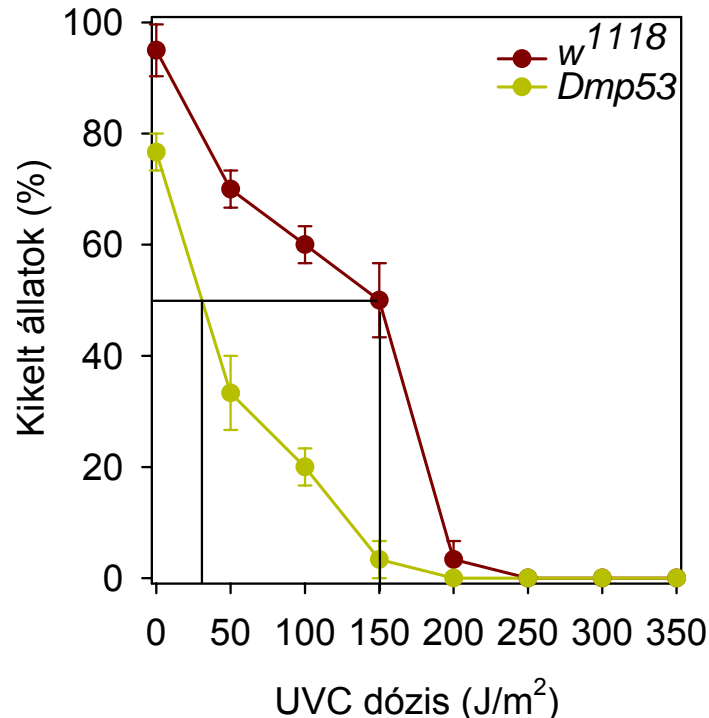
LYS2::lexA-HIS URA3::lexA-lacZ gal4 gal80) használtam a Clontech Matchmaker élesztő két hibrid rendszerhez mellékelt protokoll alapján. A transzformáns élesztő telepeket a megfelelő szelektív minimál táptalajra (1,2 g élesztő nitrogén forrás; 5 g (NH₄)₂SO₄; 10 g borostyánkősav; 6 g NaOH; 0,55g Trp⁻, Ura⁻, Leu⁻, Lys⁻, His⁻ Complete Supplement Mixture – kiegészítő keverék; 20 g agar; 100 ml 20% glükóz; 4 ml 25 mg/ml adenin/ 1 liter) széleszttem és 3 napig, 30 °C-on növesztettem. A transzformálást követően felnőtt élesztő kolóniák β-galaktozidáz aktivitását kolónia filter módszerrel teszteltem az alábbi eljárás szerint: a minimál táplemezen felnőtt élesztő telepeket a pozíciójukat megőrizve nitrocellulóz filterre (Millipore) replikáztam, majd folyékony nitrogénes fagyasztással rögzítettem. A nitrocellulóz filtert 0,2 mg/ml X-gal tartalmú Z puffer oldattal (60 mM Na₂HPO₄; 40 mM NaH₂PO₄; 10 mM KCl; 1 mM MgSO₄; 50 mM β-merkaptotanol; pH 7,0) átíttam és 3 órára 37 °C-os inkubátorba helyeztem. A β-galaktozidáz riporter gén aktiválódását a nitrocellulóz filteren rögzített élesztő telepek kék elszíneződésén keresztül követtem és fotókkal dokumentáltam.

4. Eredmények

4.1. A *Dmp53* null mutáns ecetmuslicák fokozottan UVC érzékenyek

Az emlős p53 fehérje központi szerepet játszik a genom integritásának fenntartásában azzal, hogy DNS károsodások esetén a DNS-ben keletkező hibák javítását végző mechanizmusokat aktivál. A *Drosophila* p53 – az emlős homológához hasonlóan – az örökítőanyag sérülésének hatására DNS javító folyamatokat, illetve programozott sejthalált indukál. A *Dmp53* ezen funkciót főleg a röntgen sugárzás okozta DNS törések hatására kialakuló sejtválaszokban vizsgálták. A *Dmp53* null mutáns *Drosophilák* jellegzetes fenotípusa, hogy röntgen kezelés hatására a vad típusnál érzékenyebb dózisfüggő letalitást és genomi instabilitást mutatnak (79). Megfigyelték továbbá, hogy *Dmp53* hiányában a fejlődő retinában az UVC sugárzás hatására bekövetkező DNS javító folyamatok elmaradnak, így az apoptózis túlsúlya miatt a kifejlett állatok szemének ommatida szerkezete sérül (65). Az UVC sugárzás hatására bekövetkező *Dmp53*-függő sejtválaszok további tanulmányozását fontosnak tartottam, mivel azokról viszonylag kevés információ áll rendelkezésünkre. Mindehhez egy olyan kísérleti elrendezést terveztem, amelyben az UVC sugárzás hatására bekövetkező, *Dmp53*-függő folyamatok jól követhetők. Első lépésként megvizsgáltam, hogy a *Dmp53* mutáns állatokra milyen hatással van az UVC sugárzás. Ehhez *Dmp53* homozigóta és w^{118} korai hármas stádiumú lárvákat növekvő dózisu UVC sugárzással kezeltem, majd 8 nappal később a kikelt felnőtt állatok számát meghatároztam. A besugárzást követően – a kontroll és *Dmp53* mutáns lárvák esetében egyaránt – az állatok legnagyobb része báb állapotban, nagyobb UVC dózisok alkalmazásakor pedig még késői harmadik lárvastádiumban pusztult el. Az UVC kezelés fejlődésük időtartamára nem volt hatással. Megállapítottam, hogy a *Dmp53* mutánsok életképessége a kontroll állatokénál gyengébb volt (4. ábra). A fél letális dózis w^{118} törzs esetén 150 J/m^2 volt, ami az irodalomban leírt adatokkal megegyezik (105, 117). A *Dmp53* mutánsok esetében az LD_{50} érték a w^{118} állatoknál mért dózis ötödére csökkent ($\sim 30 \text{ J/m}^2$). A *Dmp53* mutáns állatok tehát, hasonlóan az ionizáló sugárzáshoz, az UVC sugárzásra is fokozottan érzékenyek. Ez arra utal, hogy a *Dmp53* fehérje jelenléte és működése szükséges az UVC hatására bekövetkező DNS károsodások utáni túléléshez. Hiányában a DNS javító folyamatok nem

képesek megindulni, ami az örökítő anyagban bekövetezett sérülések felszaporodásához és az állatok elpusztulásához vezet.



4. ábra: A *Dmp53* null mutáns ecetmuslicák fokozottan UVC érzékenyek.

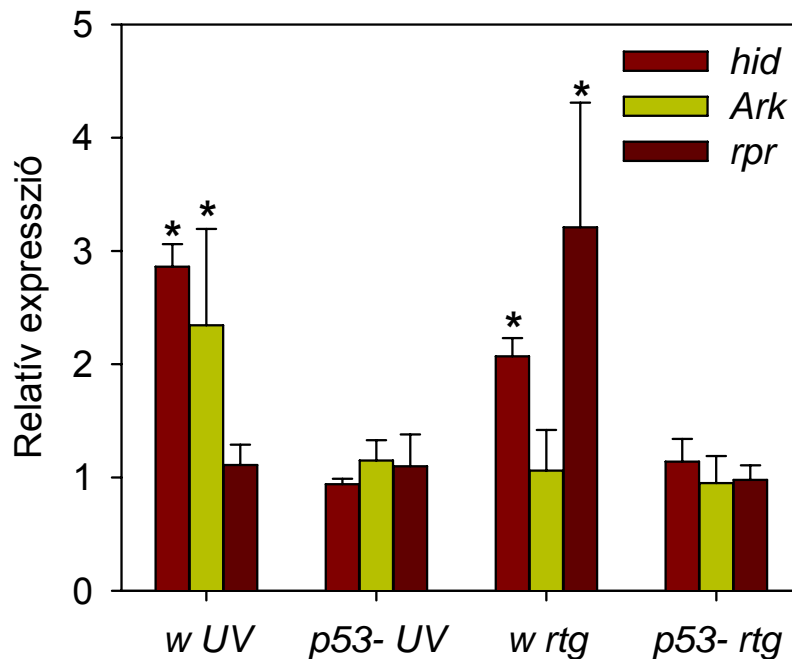
w¹¹¹⁸ és *Dmp53* homozigóta és korai hármas stádiumú lárvákat az ábrán feltüntetett dózissal UVC sugárzással kezeltem. A kikelt állatok számának átlagát a besugarazott lárvák százaléka-ként fejeztem ki. A szórást három egymástól függetlenül végrehajtott kezelésből származó eredmények alapján számoltam.

4.2. Különböző DNS károsodások eredményeként eltérően aktiválódnak egyes *Dmp53*-tól függő pro-apoptotikus gének

Az emlős p53 célgénjei transzkripciójának szabályozásán keresztül irányítja a DNS károsodások hatására kialakuló sejtszintű válaszreakciókat. A *Dmp53* – emlős homológjához hasonlóan – transzkripciós aktivátorként viselkedik, működése tehát jól nyomon követhető célgénjei transzkripciójának változását vizsgálva DNS károsodást követően. *Drosophilában* számos apoptózisban szerepet játszó gén ismert, melyek *Dmp53*-mal való kapcsolatáról viszonylag kevés ismerettel rendelkezünk. Az e tekintetben legrészletesebben vizsgált *reaper*

(*rpr*) pro-apoptotikus génről kimutatták, hogy cisz-regulátor régiójában egy ionizáló sugárzás által indukálható enhanszer található, amely egy emlős p53 konszenzus kötőhelyre hasonlító elemet tartalmaz. β -galaktozidáz riportert és a fent említett kötőhelyet kódoló plazmidot hordozó transzgenikus embriókban röntgen kezelést követően a Dmp53 képes volt a transzkripció aktivációjára (27). Ugyancsak a *reaper*, továbbá a *head involution defective/wrinkled (hid)* gének szerepéről Jassim és munkatársai közöltek adatokat az UVC sugárzásnak a fejlődő retinára gyakorolt hatását és abban a Dmp53 szerepét vizsgáló munkájuk alapján. DNS microarray kísérletben azt találták, hogy UVC hatására az előbbi nem változott, míg az utóbbi indukciót mutatott (65). A *hid* génkifejeződésének Dmp53-általi szabályozását ionizáló sugárzás esetén is kimutatták (28), de egyéb DNS károsodások (pl.: reaktív oxigén gyökök) okozta sejtválaszban attól függetlennek vélik (104). Az *Apaf-1-related killer (Ark)* kaszpáz aktivátort kódoló gén esetében UVC és UVB hatására bekövetkező indukciót figyeltek meg (142), azonban a Dmp53 és *Ark* közötti kapcsolatról nem áll irodalmi adat rendelkezésünkre.

Az előbbieket ismeretében célul tűztem ki a *hid*, *Ark* és *reaper* pro-apoptotikus gének illetve a Dmp53 kapcsolatának részletes vizsgálatát és összehasonlítását különböző DNS károsító hatásokat követően. A DNS károsodások kiváltásához a kísérletben w^{1118} és *Dmp53* homozigóta harmadik lárvastádiumú állatokat kezeltem 300 J/m^2 UVC, illetve 40 Gy röntgen sugárzással. A nagy dózisok alkalmazásától jól detektálható, viszonylag gyors és magas génaktiváció kialakulását vártam. A besugárzásokat követően 4 (UVC), illetve 2 (röntgen) órával össz RNS-t izoláltam, majd reverz transzkripciót követően a fent említett pro-apoptotikus gének expresszióját kvantitatív real time PCR-rel (QPCR) meghatároztam. Az egyes gének esetében a mért génkifejeződési szinteket mindig az adott kategória kezeltlen kontrolljához viszonyítottan állapítottam meg. A kísérleti eredmények szerint a *hid* expressziója háromszorosára nőtt UVC és kétszeresére ionizáló sugárzás hatására ($P < 0,05$; 5. ábra). A *reaper* kifejeződése csak röntgen kezelés esetén emelkedett háromszorosára ($P < 0,05$; 5. ábra), azonban a UVC esetében aktivációt nem tapasztaltam. Ez összhangban áll a *reaper* aktivációjáról közölt irodalmi adatokkal (27, 65). Az *Ark* mRNS szintje ezzel ellentétben csak UVC sugárzás esetében emelkedett több mint kétszeresére ($P < 0,05$; 5. ábra). A *Dmp53* null mutáns lárvákban ezen pro-apoptotikus gének kifejeződése egyik DNS károsító kezelés hatására sem változott (5. ábra). A *hid*, *reaper* és *Ark* gének DNS károsodásra bekövetkező expressziós változása tehát a Dmp53 jelenlététől függ. A *hid* mindkét genotoxikus ágens hatására bekövetkező aktivációja a *hid* általános szerepét sejteti a DNS károsodások által kiváltott sejtválaszokban. Az *Ark* és *reaper* esetében az expresszió megváltozása függ az örökítő anyagban bekövetkezett károsodás jellegétől.



5. ábra: A *hid*, *Ark* és *reaper* pro-apoptotikus gének UVC és ionizáló sugárzás hatására eltérően aktiválódnak.

Kontroll – w^{1118} – és *Dmp53* null mutáns harmadik stádiumú lárvákat kezeltem UVC és ionizáló sugárzással, majd a *hid*, *Ark* és *reaper* gének expresszióját vizsgáltam QPCR-ral három független kísérletben. Az ábrán az egyes kategóriák kezeletlen kontrolljához viszonyított relatív expressziók átlaga és szórása szerepel.

4.3. UVC sugárzás hatására számos gén expressziója *Dmp53*-tól függően indukálódik

Az UVC sugárzás hatására bekövetkező *Dmp53*-függő sejtválaszok további részletesebb tanulmányozásához új, *Dmp53* által aktiválódó gének azonosítására alkalmas vizsgálatot végeztem. Olyan eljárást kerestem a kísérlet tervezésekor, amely minél több *Dmp53*-függő gén megtalálását teszi lehetővé. A DNS microarray jól használható specifikus génexpressziós változások megfigyeléséhez és genom szintű tanulmányozásához. A tervezett kísérletben kezeletlen és UVC kezelt w^{1118} – kontroll –, illetve *Dmp53* mutáns állatok transzkripciós profilját hasonlítottam össze DNS chipen. Olyan géneket kerestem, amelyek kifejeződése UVC kezelés hatására csak a kontroll csoportban módosult, így expressziós változásuk a *Dmp53* jelenlétéhez kapcsolható. A vizsgálatokhoz a *Drosophila* Genomics Resource Center 1 (DGRC-1) DNS microarrayt használtam, amely a *Drosophila melanogaster* annotált génei-

nek 80%-át tartalmazza. A DNS károsodások kiváltásához nagy dózist és viszonylag rövid inkubációs időt választottam annak érdekében, hogy lehetőleg a *Dmp53* általi génaktiváció elsődleges célgénjeit tudjam azonosítani. Az UVC besugárzáshoz a *Drosophila* fél letális dózisának kétszeresét alkalmaztam (300 J/m^2), majd a kezelést követően négy órával történt az össz RNS izolálás, cDNS szintézis jelölés és hibridizáció. A hibridizáció és leolvasás során történt technikai nehézségek miatt a 15552 hibridizációs pontnak csupán a négyötödéről jutottam információhoz. Ezért a teljes genomra kiterjedő statisztikai értékeléstől és további elemzésektől az adatok feldolgozása során eltekintettem. Két párhuzamos microarrayről a kontroll, két másikkól pedig a *Dmp53* mutánsokban bekövetkező transzkripciós változásokat detektáltam, amelyeket a kezelt és kezeletlen minták hányadosaként, mint relatív expressziókat határoztam meg. Az overexpressziós küszöböt 1,8-szoros, a repressziós küszöböt pedig 2-szeres relatív expressziós változásban határoztam meg, azonban még így is viszonylag kevés gén felelt meg ezeknek a kritériumoknak. A kontroll csoport és *Dmp53* adathalmazainak összehasonlításával összesen 71 olyan gént találtam, amely expressziós változása a *Dmp53* jelenlététől függ. Ezek közül 55 transzkripciója megemelkedett, 16 gén kifejeződése pedig csökkent (Függelék, 2. táblázat). Funkciójukat a Flybase „Gene Ontology” (48) adatbázisa alapján határoztam meg.

| Név | Funkció | Relatív expresziós növekedés | |
|-----------------|---------------------------------------|------------------------------|--------------|
| | | Microarray | QPCR |
| <i>tou</i> | kromatin remodelling | 1,82 | 2,86 ± 1,22 |
| <i>rho</i> | szerin típusú endopeptidáz | 2,01 | 5,54 ± 1,64 |
| <i>PP2A-B'</i> | 2A típusú protein foszfatáz regulátor | 1,87 | 1,27 ± 0,30 |
| <i>ftz-fl</i> | transzkripciós faktor | 2,05 | 10,37 ± 3,08 |
| <i>ebi</i> | EGFR szignalizáció, DNS kötés | 1,81 | 12,14 ± 4,31 |
| <i>ballchen</i> | hiszton treonin kináz | 2,62 | 4,53 ± 0,94 |
| <i>Grip75</i> | mikrotubulus kötés | 2,98 | 3,17 ± 1,93 |
| <i>l(1)dd4</i> | mikrotubulus kötés | 1,99 | 4,61 ± 1,03 |
| <i>CG8319</i> | transzkripciós faktor | 2,29 | 4,6 ± 1,53 |
| <i>CG5620</i> | transzkripciós faktor | 2,15 | 3,28 ± 1,09 |
| <i>CG11982</i> | RING finger ubiquitin ligáz | 4,51 | 2,9 ± 0,28 |

2. táblázat: Lehetséges *Dmp53* célgének transzkripciós aktivációja UVC kezelés hatására DNS microarray és QPCR kísérletekben.

A táblázatban az egyes gének indukciójának a kezeletlen kontrollhoz viszonyított relatív expressziós növekedése szerepel.

A Dmp53-tól független, DNS károsodásra kialakuló sejtválaszok létét bizonyítja az a tény, hogy találtam olyan expressziós változásokat is, amelyek csak a *Dmp53* mutánsokban, vagy mindkét kategóriában megjelentek.

Az eredmények megerősítését egy független kísérleti rendszerrel, QPCR-rel végeztem. Ehhez a vizsgálathoz azokat a géneket választottam, amelyek a DNS károsodások után kialakuló Dmp53 által irányított sejt válaszokkal – mint apoptózis, DNS javítás – kapcsolatban lehetnek (2. táblázat). A mérések kivitelezéséhez kontroll – w^{118} – és *Dmp53* null mutáns harmadik stádiumú lárvákat kezeltem 300 J/m^2 UVC sugárzással. A vizsgálatokat három-három független kezelésből származó mintán végeztem el. A besugárzást követően 4 órával össz RNS izolálást és reverz transzkripciót követően a kiválasztott gének kifejeződését meghatároztam és az egyes kategóriák kezeletlen kontrolljában mért alap kifejeződési szintekhez viszonyítottam. Az egyes gének esetében a következő génexpressziós változásokat tapasztaltam:

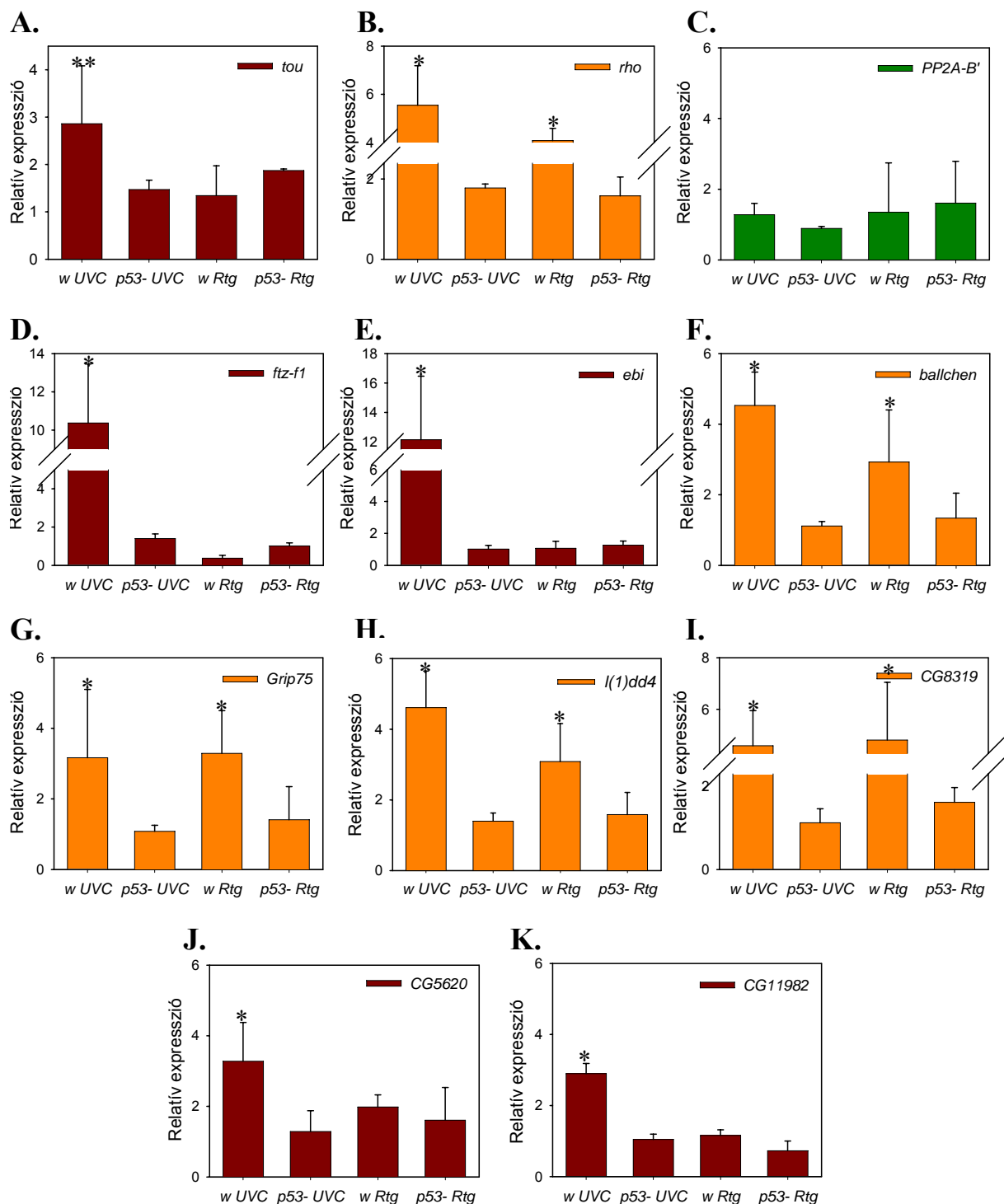
A *toutatis* (*tou*) expressziója UVC hatására a Dmp53-tól függően mintegy háromszorosára növekedett ($P < 0,01$; 2. táblázat, 6/A. ábra). A *tou* gén terméke a kromatin „remodelling” fehérjékre jellemző doméneket tartalmaz (130) és kimutatták, hogy a szteroid által kiváltott programozott sejthalál folyamán transzkripciója megnövekedik (78).

A rhomboid-1 (*rho-1*) fehérjét kódoló *rho* gén kifejeződése Dmp53 jelenlétéhez köthetően több, mint ötszörösére emelkedett UVC kezelést követően ($P < 0,05$; 2. táblázat, 6/B. ábra). A *rho-1* szerin típusú endopeptidáz egy EGFR ligandjának proteolízisével és az extracelluláris térbe való kijutásának segítségével az EGFR szignál transzdukciós útvonal beindulását segíti (12). Az aktivált EGFR szignálok a Ras-on keresztül a sejt sorsát és az apoptózis lefolyását határozzák meg.

A *PP2A-B'* expressziója a microarray kísérletben növekedést mutatott, a QPCR kísérlet ezt nem erősítette meg (2. táblázat, 6/C. ábra). A *PP2A-B'* gén terméke, a protein foszfatáz A (PP2A) B' regulációs alegysége (129). Az általa szabályozott PP2A-t RNS interferenciás kísérletekben az apoptózis szignalizációs útvonalának az *Ark*, *Dmp53*, *reaper* és *hid* génektől upstream elhelyezkedő tagjaként határozták meg (85).

A *fushi tarazu factor 1* (*ftz-fl*) gén expressziója a UVC által okozott DNS károsodások hatására Dmp53 jelenlétében több mint tízszeresére növekedett ($P < 0,05$; 2. táblázat, 6/D. ábra). A Ras által pozitívan szabályozott Ftz-fl transzkripció faktornak szerepe van a fejlődés során bekövetkező programozott sejthalál lefolyásában és szükséges a kaszpáz-3 génjének expressziójához (9, 26, 91).

Az *ebi* kifejeződése w^{118} kontroll lárvákban 12-szeresére növekedett, míg *Dmp53* mu-



6. ábra: A Dmp53 különböző jellegű DNS károsodások hatására eltérő géncsoportok transzkripcióját módosítja.

Az ábrán a feltételezett Dmp53 célgénként azonosított gének három független kísérletben meghatározott mRNS szintjei (átlag és szórás) szerepelnek. A gének expresszióját kontroll (w) és *Dmp53* (*p53*⁻) null mutáns lárvák UVC és röntgen (Rtg) kezelését követően határoztam meg QPCR-al. Az ábrán az egyes géneknek megfelelő mRNS szintek minden kategóriában a kezeletlen kontroll mintákhoz viszonyított relatív expresszióiként szerepelnek.

tánsokban nem változott UVC kezelést követően ($P < 0,05$; 1.táblázat, 6/E. ábra). Az *ebi* gén által kódolt F-box és WD-ismétlődéseket tartalmazó Ebi fehérje emlős ortológja egy, a p53 által DNS károsodás hatására aktiválódó, a β -katenin lebomlásához vezető, újonnan leírt útvonal tagja (94). Az útvonalat felépítő fehérjék evolúciósan konzerváltak, Drosophilában ortológjaik kölcsönhatása ismert. A Drosophila Ebi a Ttk88 transzkripció faktor degradációját segíti elő, ami az EGFR útvonal beindulását eredményezi (39).

A „nucleosomal histone kinase-1” (NHK-1) fehérjét kódoló *ballchen (ball)* gén Dmp53-függő, több mint négyszeres aktivációját mutattam ki QPCR kísérletekben ($P < 0,05$, 2. táblázat, 6/F. ábra). Az NHK-1 hiszton kináz a sejtciklus során a citoplazma és a sejtmag közt ingázik, és a H2A hiszton foszforilációjával a sejtciklus előrehaladását befolyásolja (6).

A *Grip75* és *lethal (1) disc degenerate 4/Grip91 (l(1)dd4)* gének esetében UVC kezelés hatására a Dmp53 jelenlététől függő szignifikáns expresszió növekedését tapasztaltam ($P < 0,05$; 1.táblázat, 6/G. és H. ábra). A *Grip75* és *l(1)dd4* géntermékei – a Grip75 és Grip91 fehérjék – olyan mikrotubulusokhoz kötődő proteinek, amelyek a mikrotubulusok centroszómától történő nukleációjában vesznek részt (15, 56).

Két potenciális cink ujj transzkripció faktor kódoló predikált gén – *CG8319* és *CG5620* – expressziója is ötszörös, illetve háromszoros növekedést mutatott *w¹¹¹⁸* lárvákban ($P < 0,05$; 2. táblázat, 6/I. és J. ábra).

Az emlős p53 két, RING finger ubiquitin ligáz – *mdm2* és *Pirh2* – expresszióját szabályozza, amelyek normális ütemben osztódó sejtekben a p53 alacsony szintjének fenntartásában játszanak szerepet (29, 81). A *CG11982* – egy potenciális RING finger ubiquitin ligáz kódoló gén – Dmp53 jelenlététől függően enyhén aktiválódott ($P < 0,05$; 2. táblázat, 6/K. ábra).

Összefoglalva tehát a microarray kísérletben expresszió növekedést mutató gének közül 10 esetben a Dmp53-függő génkifejeződést független módszerrel, független biológiai mintákat használva megerősítettem. Ezeket a géneket a továbbiakban Dmp53 által szabályozott „lehetséges transzkripció célgéneknél” tekintetem.

4.4. A Dmp53 különböző jellegű DNS károsodások hatására eltérő géncsoportok transzkripcióját módosítja

A Dmp53 különböző tulajdonságú DNS károsodások esetében eltérő hatást gyakorolt a *hid*, *Ark* és *reaper* pro-apoptotikus gének transzkripciójára. A DNS microarray kísérletben

azonosított lehetséges Dmp53 célgének esetében is megvizsgáltam, hogy különböző típusú DNS károsodások milyen hatással vannak kifejeződésükre. A microarray kísérleti eredményeinek megerősítésére során vizsgált gének expressziós változását tanulmányoztam tehát röntgen kezelést követően is. *Dmp53* mutáns és *w¹¹¹⁸* hármastádiumú lárvákat 40 Gy ionizáló sugárzásnak tettem ki, majd 4 órával később azokból RNS-t izolálva QPCR-rel génextpressziós vizsgálatokat végeztem. A génkifejeződési változásokat minden esetben a belső kontrollal való normalizálás után, az adott kategória kezeletlen kontrolljához viszonyítottam. A *PP2A-B'* expressziója az UVC kezelésnél tapasztaltakhoz hasonlóan nem változott (6/C. ábra, zöld oszlopokkal jelölve). Lehetséges, hogy a *PP2A-B'* a *PP2A* foszfatáz szabályozásán keresztül a Dmp53 destabilizálódását segíti elő, amely a Dmp53 DNS károsodásokat követő aktiválódását akadályozhatja. Ez magyarázhatja, hogy a *PP2A-B'* expressziója nem változott sem UVC sem röntgen sugárzást követően. Az *Ark*-hoz hasonlóan a *tou*, *ftz-fl*, *ebi*, *CG5620* és *CG11982* gének ionizáló sugárzás okozta DNS károsodások hatására nem indukálódtak sem *w¹¹¹⁸*, sem *Dmp53* mutáns lárvákban ($P < 0,05$; 6/A., D., E., J. és K. ábra, bordó oszlopokkal jelölve). Ezek a gének tehát valószínűleg specifikusan, az UVC sugárzás által kiváltott Dmp53 által irányított sejtválaszokban játszanak szerepet. A *rho*, *ballchen*, *Grip75*, *l(1)dd4* és *CG8319* – csakúgy, mint a *hid* – általánosan a DNS károsodás hatására, de annak jellegétől függetlenül beinduló mechanizmusok szereplői lehetnek. Ezen fehérjéket kódoló gének mRNS szintje ugyanis mind UVC, mind ionizáló sugárzást követően a Dmp53 jelenlétéhez köthetően szignifikánsan megemelkedett ($P < 0,05$; 6/B., F., G., H. és I. ábra, narancssárga oszlopokkal jelölve). Az adatok szerint az újonnan azonosított, lehetséges Dmp53 célgének esetében is a *hid*, *Ark* és *reaper*, pro-apoptotikus géneknél tapasztaltnál hasonlóan, a különböző genotoxikus ágensektől függően eltérő génaktiváció valósul meg. Ez arra utal tehát, hogy a Dmp53 fehérjének vannak általános és speciális, csak bizonyos károsodások esetén aktivált célgénjei.

4.5. A Dmp53 jelenlétében indukálódó gének nem tartalmazzak p53 konszenzus kötőhelyeket

A *Drosophila* p53 képes az emlős p53 kötőhelyéhez kapcsolódni *in vitro*, és *in vivo* riporter rendszerben az ahhoz közeli promoterról a transzkripciót aktiválni (68, 110). A *reaper* pro-apoptotikus gén cisz-regulátor régiójában egy emlős p53 konszenzus kötőhelyre hasonlító – 5'-tGACATGTTT GAACAAGTCg-3' –elemet találtak (27), azonban a *Drosophi-*

| gén | kötőhely^a | pozíció^b | DNS szál^a | szekvencia^c |
|-----------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| <i>tou</i> | 5' fél | -3566 | + | tgagggcaatgaaCATGccca |
| | 3' fél | -3584 | - | tggacacctgggCATGttca |
| <i>rho</i> | 3' fél | -262 | + | aaggtcaccacggCATGttgc |
| | 5' fél | -870 | + | agttgctgcactaCATGccca |
| | teljes | -900 | - | tgaCGTGcctggctcatgggca |
| | 3' fél | -902 | + | gcccattgaccaggCACGtcat |
| | 5' fél | -1192 | - | gtgccagtgggtcCATGtccg |
| | teljes | -2932 | - | gagCATTCcctggcttctgg |
| | 3' fél | -3862 | + | atggttcccaggaCATGtcga |
| | 3' fél | -3880 | - | atgccagtgcgaCATGtctc |
| | <i>ftz-fl</i> | 3' fél | -1054 | + |
| <i>ebi</i> | 3' fél | -1072 | - | tcgacgaactgaaCATGttca |
| | 3' fél | -3500 | - | cttcaaacacgaCAAGttaa |
| <i>PP2A-B'</i> | teljes | -3702 | - | tcaCATAgccgggcaagtggg |
| | teljes | -3704 | + | ccaCTTGcccggctatgtgag |
| <i>CG5620</i> | 3' fél | -1800 | + | gcagtcccacgaCAAGttcc |
| | 5' fél | -3638 | - | gctaagtggttatCATGcccc |
| | 5' fél | -5552 | + | ccacaccacagcaCATGtctc |
| | 5' fél | -7112 | + | tcaatgctctggaCTTGcctc |
| | 3' fél | -7130 | - | gcaaattgcgaggCAAGtcca |
| <i>ballchen</i> | 5' fél | -616 | - | aggetgccacgacCATGcccc |
| | 3' fél | -3420 | + | aaggcgaagctgaCAAGttgc |
| | teljes | -5418 | - | tcaCACGcctgcgcaggtgca |
| | teljes | -5420 | + | gcaCCTGgcgcagcgtgtgaa |
| <i>CG8319</i> | 5' fél | -3308 | - | ctggatctccactCATGtccc |
| | 3' fél | -5312 | + | ataatgtgcttgaCATGtttg |
| | 3' fél | -5330 | - | attaattcacaaaCATGtcaa |
| <i>Grip75</i> | teljes | -1778 | + | gcaTATGtacggccaagacaa |
| <i>l(1)dd4</i> | teljes | -4052 | + | gcaAATGgtagggcattttaa |
| | 5' fél | -6384 | - | gaatgcgtttaacCATGccct |
| | 3' fél | -7256 | + | actggggcaaaagCATGtctc |
| <i>CG11982</i> | teljes | -5266 | + | cgaTATGgccggggacttctt |
| | 5' fél | -7364 | - | caatcgctggtcCATGtcca |

3. táblázat: Lehetséges Dmp53 célgénnek szabályozó régióinak számítógépes analízise.

A táblázatban a Genomatix MatInspector software-rel végzett p53 kötőhely keresés eredménye látható. Jelmagyarázat: ^a a MatInspector annotációja (5' illetve 3' fél: a kötőhely 5' vagy 3' fele); ^b bázispár upstream a transzkripció iniciációs helytől; ^c a MatInspector által kiadott eredmény, a nagybetűk a core szekvenciát jelölik, a vastagított szekvenciák az emlős konszenzushoz való 60%-nál nagyobb pozícióbeli hasonlóságot jelzik.

la p53 konszenzus kötőhely még nem ismert. Az általam azonosított UVC hatására indukálódó gének Dmp53 általi transzkripció szabályozása a Dmp53-t kötő szekvenciákon keresztül is megvalósulhat. E feltevés vizsgálatához a 11 fent említett lehetséges Dmp53 célgén transzkripció startpontjától upstream elhelyezkedő kb. 4000-7000 bázispárnyi genomi szekvenciát a Genomatix MatInspector software-rel vizsgáltam. Az analízist Drosophila és emlős transzkripció kötőhely adatbázisokon végeztem el. A keresési beállítások alapján az összes vizsgált promóter tartalmazott „fél- és teljes” p53 kötőhelyeket, habár az irodalomban leírt 5'PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy3' emlős p53 konszenzustól ezek egy kissé eltértek (3. táblázat). A szekvenciákban nem találtam az annotációk közt szimmetrikus, az emlős konszenzusra jellemző kötőhelyet. Nem valószínű, hogy ezek a gének a Dmp53 indirekt targetjei és esetleg egy másik, p53 által korán aktivált transzkripció faktor indukálta kifejeződésüket, mivel aktivációjukat röviddel az UVC kezelés után már ki tudtam mutatni. A Dmp53 esetleg nem konszenzus kötőhelyen keresztül szabályozta expressziójukat. Az emlős p53-ról már bebizonyosodott, hogy represszív hatását nem konszenzus kötőhelyén keresztül fejt ki (88).

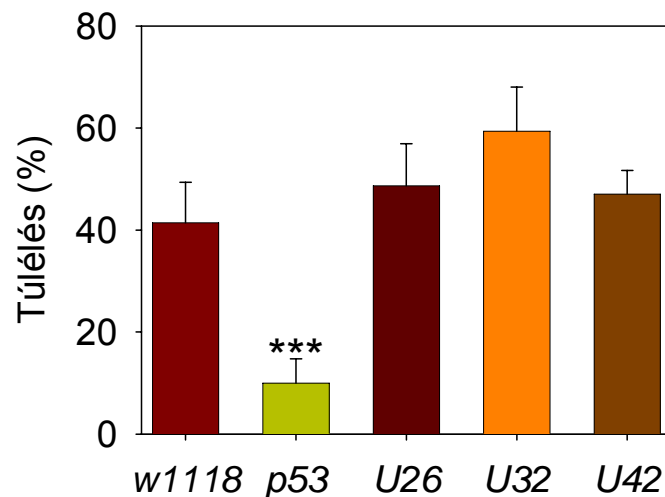
4.6. A Dmp53 és CG11985 fehérjék kölcsönhatásának vizsgálata élesztő két-hibrid módszerrel

Az emlős MDM2, Cop1 és Pirh2 ubiquitin ligázok a p53 fehérje szintjét autoregulációs, visszacsatolásos rendszereken keresztül szabályozzák normális ütemben osztódó sejtekben. Drosophilában nem ismertek hasonló, a Dmp53 szintjét befolyásoló fehérjék. A *CG11982* ubiquitin ligáz kódoló gént, mint UVC hatására Dmp53-tól függően aktiválódó gént azonosítottam a fentebb ismertetett DNS microarray kísérletben. Különösen érdekesnek találtam megvizsgálni, hogy a *CG11982* gén terméke rendelkezik-e a humán p53 szintjét szabályozó ubiquitin ligázokhoz hasonló funkcióval. Feltételeztem, hogy a *CG11982* kölcsönhatásba lép a Dmp53-mal, ami elengedhetetlen lépése egy protein ubiquitinnel történő módosításának. A Dmp53 és *CG11982* fehérjék közti lehetséges interakciót élesztő két-hibrid rendszerrel terveztem megvizsgálni. A *CG11982*-t egyaránt beépítettem a pBTM116 – LexA DNS-kötő –, illetve a pGAD424 – Gal4 transzaktivációs domént tartalmazó – plazmidokba. Az interakciós kísérleteket megelőző vizsgálatok során azonban kiderült, hogy a *CG11982* – függetlenül attól, hogy a DNS kötő, vagy a transzaktivációs doménhez kapcsolva fejeződik ki – önmagában képes aktiválni az élesztő két-hibrid rendszerben felhasznált hisztidin és β -

galaktozidáz riporter géneket. Az élesztő két-hibrid módszer tehát nem volt alkalmas a Dmp53 és CG11982 fehérjék közti kölcsönhatás kimutatására. A két fehérje kapcsolatának tisztázására tehát további, más módszert alkalmazó vizsgálatok szükségesek.

4.7. A Daxx Drosophila homológja, a DLP, a Dmp53 működését szuppresszálja és részt vesz az *Ark* alap expressziójának szabályozásában

A humán halál doménnel asszociált 6-os faktor (death domain associated factor 6, Daxx) egyike azoknak a fehérjének, amelyek a p53 működését módosítják. A p53-ra gyakorolt hatásáról közölt adatok azonban ellentmondók. Élesztő két-hibrid szűrés során a humán Daxx fehérje Drosophila homológját, a „Daxx like proteint” (DLP) a Dmp53-mal kölcsönható partnerként azonosítottuk, és a két fehérje közti interakciót GST pull-down kísérletben is megerősítettük. A kölcsönhatás a DLP karboxi terminálisa és a Dmp53 karboxi terminális oligomerizációs és bázikus regulációs doménjét is tartalmazó régiója között jön létre (23). A kölcsönhatás kimutatása, és a humán homológokról közölt adatok felvetik a kérdést, hogy a DLP befolyásolja-e a Dmp53 sejtválaszok kiváltásában betöltött szerepét. A *Dmp53* null mu-

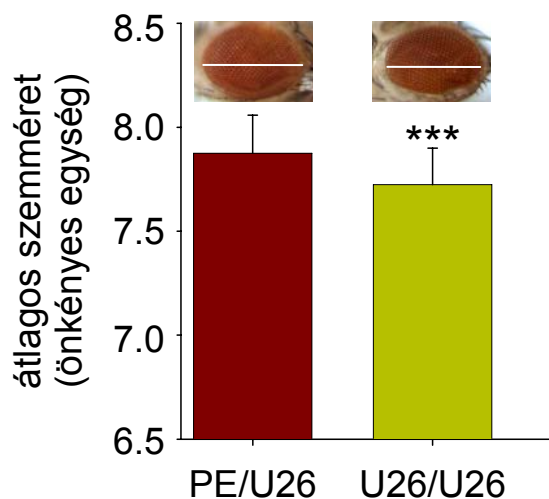


7. ábra: A DLP mutánsok a röntgen érzékenységének meghatározása.

Kontroll – *w¹¹¹⁸* –, *Dmp53* null –, *DLP^{U26}*, *DLP^{U32}*, *DLP^{U42}* mutáns, 20 Gy ionizáló sugárzással kezelt harmadik stádiumú lárvákból kikelő egyedek száma. Az egyes kategóriák túlélésének átlagát és szórását a besugározott állatok százalékaként tüntettem fel (n=6).

táns *Drosophilák* röntgen kezelés hatására a vad típusnál érzékenyebb dózisfüggő letalitást és genom instabilitást mutattak (79), ami a *Dmp53* által irányított sejtszintű folyamatok aktivációjának elmaradására vezethető vissza. Feltételeztem, hogy a *DLP* mutáns állatok nagyfokú DNS károsodások esetén a *Dmp53* mutánsokéhoz hasonló érzékenységet mutatnak. A *DLP* mutánsok röntgen érzékenységének meghatározásához kontroll – *w¹¹¹⁸* –, *Dmp53*, és *DLP* mutáns, harmadik stádiumú lárvákat 20 Gy ionizáló sugárzással kezeltem, majd a kikelt állatok számát meghatároztam hat független kísérletben. Az irodalmi adatokkal megegyezően a kezelt *Dmp53* mutánsok túlélési képessége erősen csökkent ($P < 0,001$; 7. ábra), azonban a *DLP* mutánsok esetében hasonló érzékenységet nem tapasztaltam (7. ábra). Ez arra utal, hogy a *DLP*-nek nincs kulcsfontosságú szerepe a nagy dózisu ionizáló sugárzás hatására létrejövő *Dmp53*-függő sejtválaszok aktivációjában.

A *Dmp53* és *DLP* fehérjék közti kölcsönhatást genetikai interakciós kísérletekben vizsgáltam. A *Dmp53* szemben történő ektópikus túltermelése a megnövekedett apoptózis eredményeként durva szem fenotípust és csökkent szemméretet eredményez (79, 110). A *Dmp53 eyeless-Gal4* driverrel való túltermelésekor, a *DLP^{U26}* homozigóta nőstényekben és hímekben egyaránt a szemméret fokozatos csökkenését tapasztaltam a heterozigóta, kontroll állatokhoz képest. Ez megnövekedett mértékű apoptózisra utal ($P < 0,001$; 8. ábra). A *DLP* hiá-

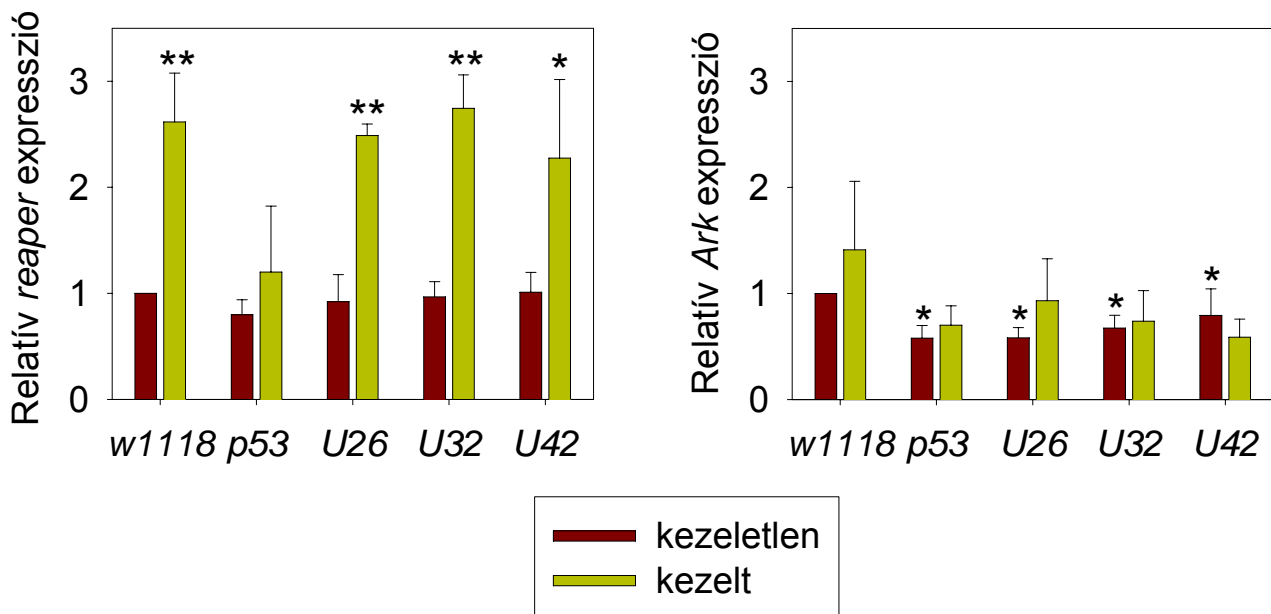


8. ábra: A *DLP* és *Dmp53* közötti genetikai interakció a *DLP* gátló hatására utal.

Dmp53-at túltermelő (*P[UASDmp53]-t P[ey-Gal4]*) *DLP^{U26}* hetero- (*PE/U26*) és homozigóta (*U26/U26*) ecetmuslicák átlagos szemmérete. Az ábrán három független keresztezésből származó átlagos szemméretek és azok szórása szerepel (20 állat/keresztezés). Az oszlopdiagramm felső részén az egyes genotípusú állatok szemét reprezentáló fotókat és azok hosszanti tengelye mentén mérhető szemméretét tüntettem fel.

nyában megerősödő fenotípus arra enged következtetni, hogy a DLP a Dmp53 hatását gátolja.

A humán Daxx a transzkripció szabályozásban is részt vesz (42, 84, 122). Érdekes volt ezért megvizsgálni, hogy a DLP milyen hatással van a *reaper* és *Ark* gének kifejeződésére. A DLP *reaper* és *Ark* alap expressziójára gyakorolt hatásának vizsgálatához QPCR-rel összehasonlítottam a két pro-apoptotikus gén mRNS szintjét w^{1118} , *Dmp53* null-, *DLP*^{U26}, *DLP*^{U32} és *DLP*^{U42} mutánsokban (9. ábra). A mutánsok mRNS szintjeit a kezeletlen w^{1118} törzsben mért-hez viszonyítottam és relatív expresszióként határoztam meg. A *reaper* kifejeződésében nem tapasztaltam különbségeket. Az *Ark* mRNS szintje azonban mind a *Dmp53*, mind a *DLP* mutánsokban szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a w^{1118} törzsben (P=0,003; 9. ábra), ami arra utal, hogy a Dmp53 és a DLP részt vesznek az *Ark* alap expressziójának fenntartásában. A DLP hiány Dmp53 általi transzkripcióra gyakorolt hatásának vizsgálatához röntgen kezelést követően a *reaper* és *Ark* gének mRNS szintjét meghatároztam. *Dmp53* null mutáns, *DLP*^{U26}, *DLP*^{U32}, *DLP*^{U42} és w^{1118} harmadik stádiumú lárvákat 40 Gy röntgen sugárzással kezeltem, majd 4 óra inkubációs időt követően QPCR-rel expressziós méréseket végeztem. Az mRNS

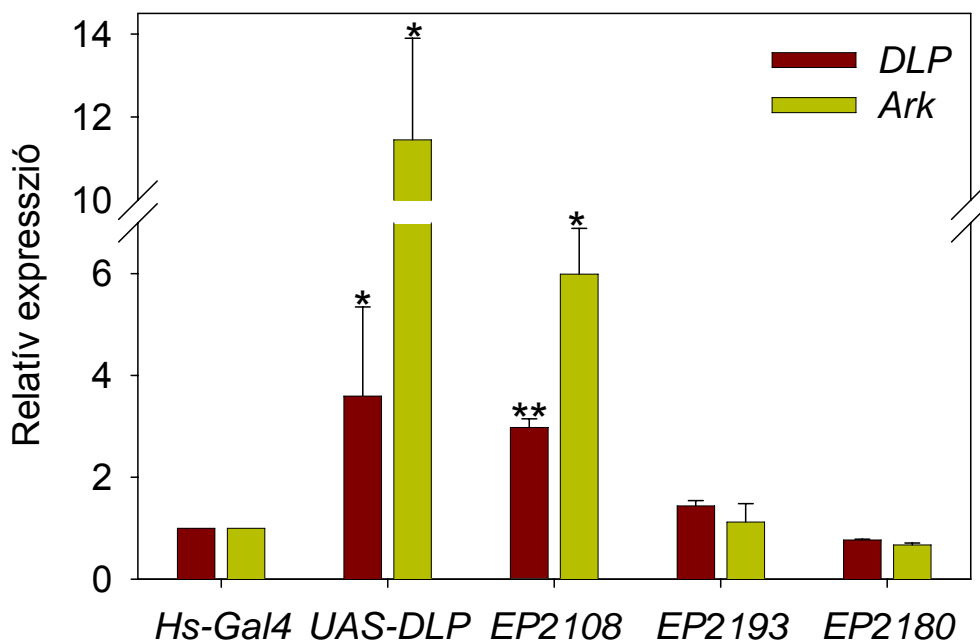


9. ábra: A DLP nem szükséges a Dmp53 által szabályzott gének nagy dózísú ionizáló sugárzás okozta aktiválásához.

DLP-, *Dmp53* mutáns és w^{1118} lárvák 40 Gy röntgen sugárzással történő kezelését követően, a *reaper* és *Ark* gének mRNS szintjét QPCR-rel meghatároztam három független kísérletben. Az mRNS szintek átlagát és szórását a kezeletlen w^{1118} kategóriához viszonyított relatív expresszióként ábrázoltam.

szinteket az egyes kategóriákban mindig a kezeletlen kontrollokhoz viszonyítva, relatív expresszióként fejeztem ki. A *reaper* mRNS szintje a kontroll, *w¹¹⁸* lárvákban megnőtt ($P < 0,05$ és $P < 0,01$), azonban *Dmp53* mutánsokban nem változott (9. ábra), összhangban az előzőekben ismertetett eredményekkel (5. ábra). A *DLP* mutánsokban a *reaper* szintje a kontrollhoz hasonlóan megemelkedett, ami azt jelzi, hogy a *DLP* nem szükséges a *reaper* lokusz *Dmp53* általi aktivációjához (9. ábra). Az *Ark* transzkripciója nem változott szignifikánsan egyik kategóriában sem, ami a *w¹¹⁸* és *Dmp53* mutánsokban az előzetes kísérleteknél tapasztaltakkal megegyezik (5. ábra).

A *DLP* *Ark* alap expressziójára gyakorolt hatását négy, *DLP*-t túltermelő törzs felnőtt nőstényeiben tanulmányoztam tovább. Három törzsben a *DLP* ektópikus túltermelését a génbe inszertálódott EP elemek hősokk driverrel történő meghajtásával biztosítottam. Az EP-elem a három inszerciós törzs közül egyben a *DLP* génnel azonos (*EP(2)2108*), kettőben pedig azzal ellentétes irányba mutatott (*EP(2)2193* és *EP(2)2180*). A negyedik törzsben – amely a *DLP* humán *Daxx*-szal homológ régióját kódoló cDNS-ét transzgénként hordozta – a *DLP* karboxi terminális részét termeltem hősokk driver segítségével. Kontrollként hősokkolt *P[Hs-Gal4]* transzgenikus nőstényeket használtam. Az *Ark* és *DLP* gének mRNS szintjét mindig a kontroll



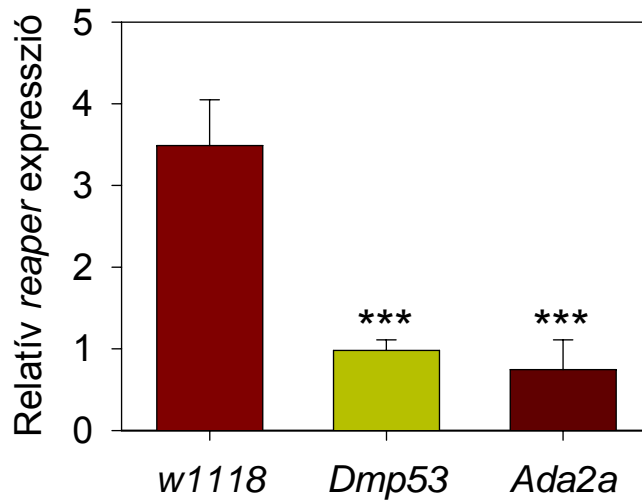
10. ábra: A *DLP* szerepet játszik az *Ark* alap expressziójának fenntartásában.

A *DLP* és *Ark* gének expresszióját hősokkot követően QPCR-al határoztam meg három független kísérletben. Az mRNS szintek átlagát és szórását minden kategóriában a hősokkolt, vad típusú kontrollhoz viszonyított relatív expresszióként tüntettem fel.

törzsben mért eredményekhez hasonlítva adtam meg relatív génexpresszióként. A transzgenikus és a *DLP* leolvasási irányába mutató *EP(2)2108* elemet hordozó állatokban a *DLP* mRNS szintje megemelkedett, míg a másik két EP inszerciós törzsben a kontroll törzshöz hasonló génkifejeződést mértem ($P < 0,05$ és $P < 0,01$; 10. ábra). Az *Ark* kifejeződése a *DLP* expressziójának mértékével párhuzamos emelkedést mutatott ($P < 0,05$; 10. ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a *Dmp53* és *DLP* szelektíven játszanak szerepet egyes proapoptotikus gének alap expressziójának fenntartásában.

4.8. A dADA2a Drosophila transzkripciós adapter szerepet játszik a Dmp53 működésében

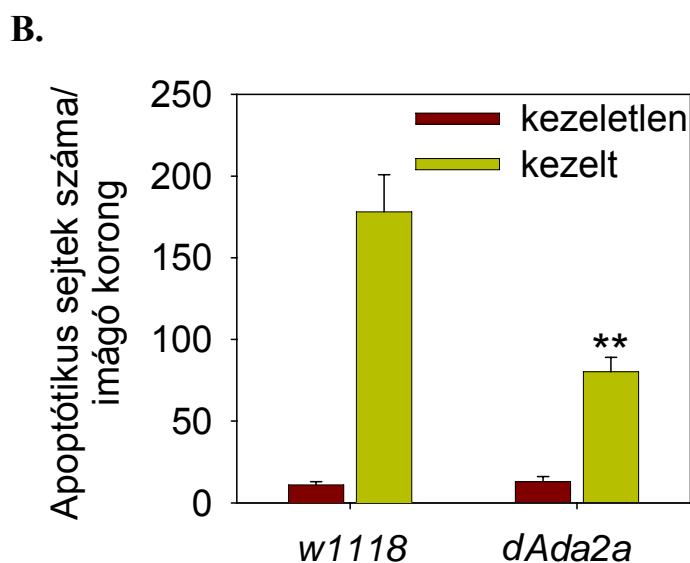
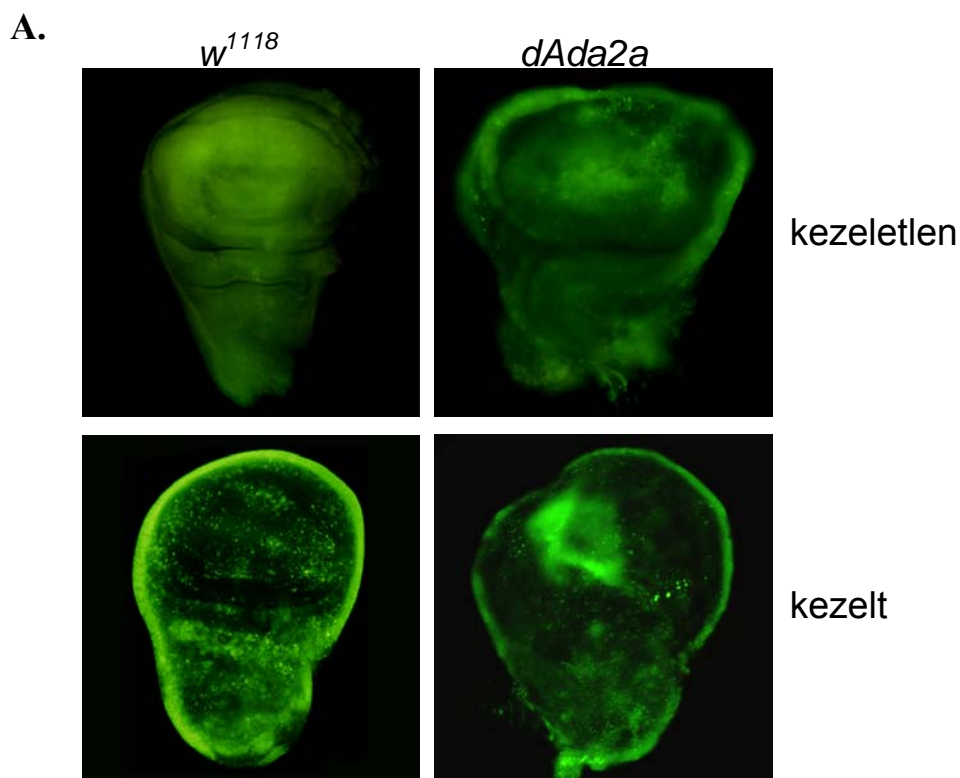
Az „alteration/deficiency in activation 2” (ADA2), transzkripciós adapter tartalmú komplexek élesztőben és emberben szekvencia specifikus transzkripciós faktorokon keresztül vesznek részt génspecifikus transzkripció aktivációban (13, 17, 20, 90, 123, 135). A humán p53 transzaktivációs funkcióinak betöltésében és az általa kiváltott apoptózisban szükséges az ADA2/ADA3/GCN5 (general control of amino-acid synthesis 5) tartalmú adapter komplex közreműködése (135). A *Dmp53* és *Drosophila* ADA fehérjék kapcsolatáról már vannak irodalmi adatok. A *Dmp53* és *dADA2b* kölcsönhatását *in vitro* pull-down kísérletekben igazolták, azonban a *dADA2a*-val nem detektáltak interakciót (75). A *dADA2b* tartalmú komplexek és a *Dmp53* kapcsolatára utal továbbá, hogy ionizáló sugárzással kezelt *dAda2b* mutáns lárvák imágó korongjaiban az apoptotikus sejtek száma kevesebb, mint a vad típusú lárvákéban (112). A *dADA2a* a *Drosophila* ADA2a-t tartalmazó – ADA two A Containing (ATAC) – hiszton acetil transzferáz komplex tagja a *dGCN5* és *dADA3* fehérjékkel együtt (55). A *Dmp53* és *dADA2a* kapcsolatát a *reaper* röntgen sugárzást követő aktivációján keresztül vizsgáltam. Kontroll – *w¹¹¹⁸* –, *Dmp53* és *dAda2a* mutáns, harmadik stádiumú lárvákat 40 Gy röntgen sugárzással kezeltem, majd 4 órával később QPCR mérést végeztem. A *reaper* kifejeződését mindegyik kategóriában a kezeletlen kontrollokhoz viszonyítottan relatív expresszióként fejeztem ki. ADA2a hiányában, a *Dmp53* null mutánsokhoz hasonlóan a *reaper* nem indukálódott ($P < 0,001$; 11. ábra), ami feltételezi, hogy a *Dmp53* és a *dADA2a*-t tartalmazó ATAC egyaránt részt vesznek a *reaper* kifejeződésének szabályozásában.



11. ábra: A dADA2a közreműködik a reaper Dmp53 általi aktivációjában.

A *reaper* ionizáló sugárzást követő aktivációját w^{1118} , *Dmp53*- és *Ada2a* mutáns lárvákon vizsgáltam három független kísérletben. Expressziós szintjének átlagát és szórását minden kategóriában a kezeletlen kontroll mintákhoz viszonyított relatív expresszióként fejeztem ki.

A *reaper* Dmp53 általi aktivációja Drosophilában az ionizáló sugárzás hatására bekövetkező apoptózis megindulásához szükséges (2). Ezért feltételezhető, hogy a *reaper* aktivációjának hiánya *dAda2a* mutánsokban a programozott sejthalál lefolyására is hatással van. Akridin orange festékkel az apoptotikus sejtek könnyen kimutathatók. Kontroll – w^{1118} – és *dAda2a* mutáns harmadik stádiumú lárvákat 40 Gy röntgen sugárzással kezeltem, majd imágó korongjaikat akridin orange festékkel megfestettem (12/A. ábra). Az imágó korongokban festődést mutató, apoptotikus sejtek száma *dAda2a* mutáns lárvákban szignifikánsan kevesebb volt, mint a w^{1118} állatokéban ($P < 0,01$; 12/B. ábra). A dADA2a fehérje hiányában tehát a Dmp53-függő apoptózis nem megy végbe nagy dózisú ionizáló sugárzást követően. Tehát a *reaper* transzkripciójának szabályozását és a programozott sejthalál indukcióját a Dmp53 vélhetően az dADA2a tartalmú ATAC komplexszel együttműködve végzi.



12. ábra: A nagy dózísú ionizáló sugárzás okozta apoptózis a *dAda2a* mutáns imágó korongokban csökkent mértékű.

Vad típusú és *dAda2a* mutáns lárvák imágó korongjait akridin orange-zsal megfestettem az állatok 40 Gy ionizáló sugárzással való kezelését követően. Az A. panelen egy-egy kezeletlen és kezelt állatból származó szárny diszkusz reprezentatív képe látható. A B. ábrán az apoptotikus sejtek diszkuszonkénti számának átlagát és szórását ábrázoltam. Az ábra három független kísérletben, 15-15 imágó korong adatait összegzi.

5. Az eredmények megvitatása

Miután a p53 gén mutációját a humán daganatos elváltozások több mint 50 százalékában kimutatták, tanulmányozása a rákkutatás egyik központi témájává vált (83). A p53 fehérje a sejteket érő stressz – mint hipoxia, aktivált onkogének, ionizáló- és UV sugárzás – hatására stabilizálódik és transzkripciós faktorként célgénjeinek kifejeződését aktiválja, vagy represszálja. Ezen gének kifejeződésének szabályozásán keresztül olyan sejtválaszokat indít be, amelyek apoptózist, a sejtciklus leállítását és DNS javító folyamatok aktiválását eredményezik. Így a p53 mint a sejt központi „őre” meghatározhatja a sejt végső sorsát. A p53 finom működésének megértése, az általa szabályozott célgének azonosítása végső soron a daganatképződés részleteinek feltárását, esetleges rák ellenes terápiák kidolgozását szolgálják.

A Dmp53 biokémiai tulajdonságait tekintve emlős homológjára nagyon hasonlít. Transzkripciós faktorként célgénjeinek kifejeződését befolyásolva apoptózist és DNS javító folyamatokat indukál. A *Drosophila melanogaster*, mint modell, sok evolúciósan konzervált sejt szintű folyamat tanulmányozására alkalmas. Az így nyert eredményeket az emlős rendszerekre finomításokkal alkalmazni lehet, tekintve, hogy az *ecetmuslica* azonosított fehérjéinek fele szekvencia hasonlóságot mutat az emlős proteinekkel (19). Így a Dmp53 működésének tanulmányozása olyan információkkal szolgálhat, amelyek az emlős p53 funkcióinak közelebbi megismerését teszik lehetővé.

A humán p53-hoz hasonlóan a Dmp53-nak is központi szerepe van az ionizáló sugárzás okozta DNS törések kijavításának indukálásában, vagy túl nagy károsodás esetén az apoptózis beindításával a sérült sejt eliminálásában. A *Dmp53* deficiens *ecetmuslicák* fokozottan érzékenyek az ionizáló sugárzásra és genomi instabilitást mutatnak (79, 125). A *Dmp53* mutáns állatok UVC sugárzás esetén hasonlóan fokozott érzékenységet mutattak, fél letális dózisuk a vad típusú *Drosophilák*hoz képest az ötödére csökkent. Ez a megfigyelés arra enged következtetni, hogy a Dmp53-nak fontos szerepe van az UVC sugárzás következtében kialakuló DNS károsodások feldolgozásában és a sejtek túlélésében. Emlős sejtes rendszerekben kimutatták, hogy a p53 kisebb mennyiségben inkább sejtciklus leállítást és DNS javító folyamatokat indukál az apoptózissal szemben, így megvédve a sejteket az eliminációtól (96). Azonban ha a DNS sérülések nem javíthatók, a p53 szintje átmenetileg megnövekszik és beindítja a programozott sejtihalált. Feltételezhető, hogy a Dmp53 esetében is a DNS javító folyamatok beindítása az elsődleges a sejtek apoptózissal való eliminálásával szemben. A

Dmp53 hiányában azonban a DNS hibáit kijavító folyamatok nem képesek indukálódni, ami az örökítő anyagban bekövetkezett sérülések felszaporodásához vezet. A *Dmp53* mutáns állatok csökkent életképessége tehát feltételezhetően a DNS javító folyamatok elmaradásának köszönhető.

UVC kezelt w^{1118} és *Dmp53* mutáns ecetmuslicák expressziós profiljának DNS microarray kísérletben történő elemzésével és összehasonlításával lehetséges *Dmp53* célgéneket azonosítottam. Megállapítottam, hogy a UVC és ionizáló sugárzás hatására bekövetkező expresszió változás alapján a *Dmp53* célgének három csoportba sorolhatók. Az első csoportba az *Ark*, *tou*, *ftz-fl*, *ebi* és *CG11982* gének tartoznak, amelyek *Dmp53*-függő aktivációja csak UVC sugárzást követően következik be. A második csoport – *hid*, *rho*, *ballchen*, *Grip75*, *l(1)dd4*, *CG8319* és *CG5620* – tagjai *Dmp53* jelenlétében ionizáló és UVC sugárzás hatására egyaránt indukálódnak. Ezen gének termékei feltételezhetően általános szereppel bírnak az örökítő anyag károsodásakor beinduló sejtválaszokban. Egy harmadik géncsoport is felállítható, az ebbe tartozó gének – *reaper*, *sickle*, *Eiger*, *Ku70* és *Ku80* – kizárólag ionizáló sugárzást követően aktiválódnak a *Dmp53* közreműködésével (28). A humán p53 működésével kapcsolatban is leírtak hasonló stresszfüggő szelektív génaktivációt, például a *p21* és *mdm2* esetében. Kimutatták, hogy amíg a *p21* ionizáló sugárzást követően és aktinomicin D, vagy kaptotecin kezelés után is aktiválódik a p53 szabályozásán keresztül, addig az *mdm2* expressziós szintje csak ionizáló sugárzás és aktinomicin D hatására emelkedik meg (10). Zhao és munkatársai a p53 által szabályozott gének azonosításához használt microarray analízisben, speciálisan UV kezelés után 1 aktivált és 3 represszált gént találtak. 18 gén aktiválódott és 7 gén represszáldott ionizáló sugárzást követően, illetve 6 gén kifejeződése erősödött és 3 gyengült mindkét stimulus hatására (141).

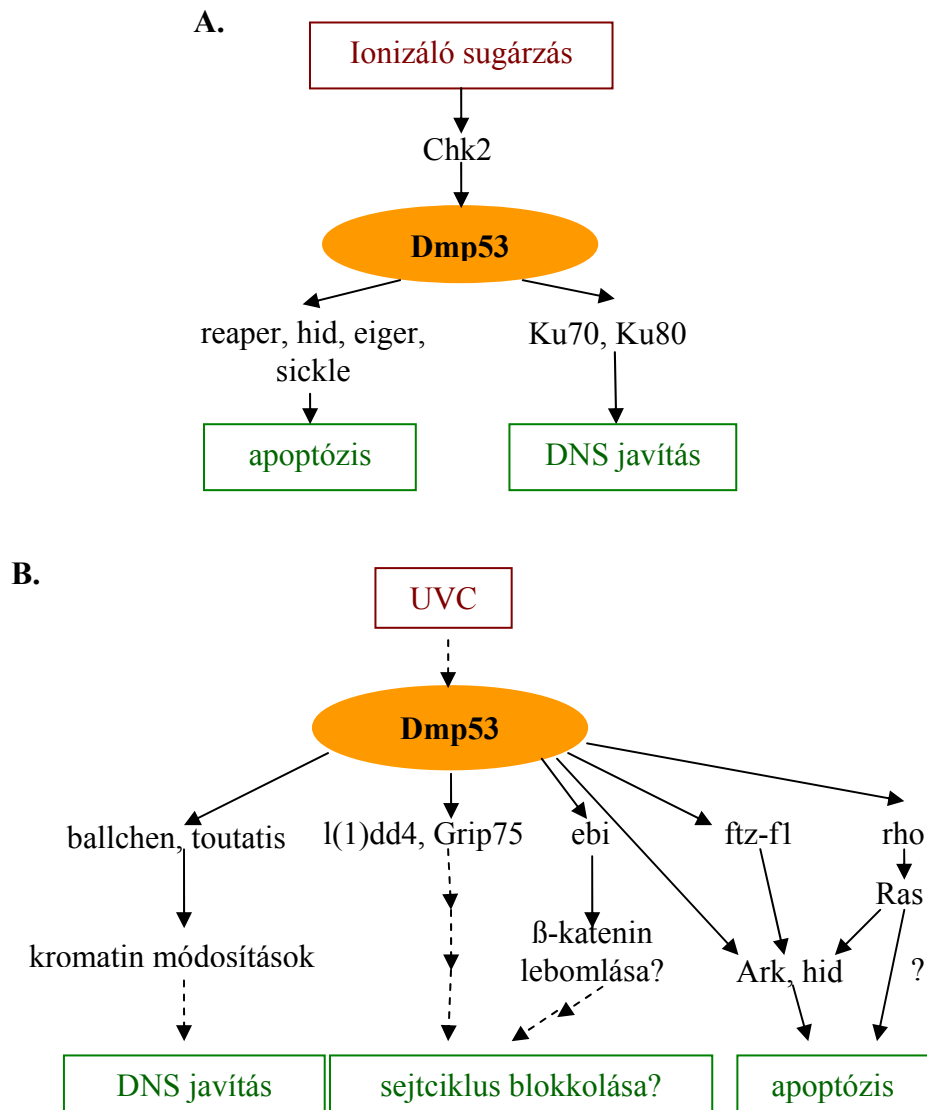
Több lehetséges magyarázat adható arra, hogy a *Dmp53* célgénjeinek miért csak egy bizonyos csoportját aktiválja speciális stimulusokra. Egyes irodalmi adatok arra utalnak, hogy a gének mérete befolyásolja azok UV sugárzás hatására megváltozó kifejeződésének szabályozását. Az UV sugárzás által okozott DNS károsodások a transzkripciót gátolják. Az UV dózistól függően a p53 célgének kifejeződése is akadályba ütközik, emiatt a p53 a kisebb méretű target génjeit nagyobb gyakorisággal aktiválja (97). Eredményeim nem utalnak hasonló korrelációra a *Dmp53* esetében, sőt az általam azonosított gének kifejezetten nagyméretűek, például a *tou* 37 kb, az *ftz-fl* 47 kb, illetve a *CG5620* 55 kb hosszúak. Egy másik magyarázat az lehet, hogy a *Dmp53* csak az UVC hatására bekövetkező poszttranszlációs módosítások után képes célgénjei transzkripciójának befolyásolására. Ezt a feltevést támasztja alá az a

megfigyelés, hogy a 15-ös és 20-as aminosav pozíciókban szerinjein foszforilált humán p53 a *p21* gént képes aktiválni, de az *mdm2*-t nem. Az ezekben a pozíciókban nem módosított p53 azonban képes mind a *p21*, mind az *mdm2* aktivációjára (10). Kimutatták, hogy a humán p53 392-es pozícióban levő szerinje specifikusan UV sugárzást követően foszforilálódik (70). A harmadik feltételezhető magyarázat az, hogy a Dmp53 célgénjeinek kifejeződését más, az UVC hatására aktiválódó transzkripciós faktorokkal együttműködve szabályozza, amelyek a célgének enhanszereiben saját reszponzív elemeikhez képesek kötödni. Ezt a feltételezést a humán p53 konszenzusra emlékeztető – a *reaper* enhanszerében megtalálható – szimmetrikus kötőhelyek hiánya támasztja alá, ugyanis az újonnan azonosított, lehetséges célgének szabályozó régióin bioinformatikai analízist végezve nem találtam szimmetrikus, az emlős konszenzusra jellemző kötőhelyet, csupán „fél- és teljes” p53 kötőhelyeket. A humán p53-ról kimutatták, hogy a konszenzus szekvencia egyetlen kópiájához nem képes kötödni (40). Mindazonáltal nem valószínű, hogy a kísérletek során azonosított lehetséges célgének a Dmp53 által aktivált sejtválasz későbbi lépéseit képviselnék, hiszen indukciójuk az UVC sugárzást követően igen korán kimutatható volt. A humán p53 kötőhelyére emlékeztető szekvenciák hiánya azt is jelezheti, hogy a Dmp53 célgénjeinek kifejeződését nem konszenzus kötőhelyeken keresztül is képes befolyásolni. A humán p53 ilyen nem konszenzus szekvenciákon keresztül gátolja egyes célgénjeinek expresszióját (88).

Az emlős és *Drosophila* p53 ionizáló sugárzást követő aktivációja közös és egyedi vonásokat is mutat. Ionizáló sugárzás hatására a „checkpoint kinase 2/maternal nuclear kinase” (Chk2/MNK) kináz mindkét homológ fehérjét foszforilálja (115). Ionizáló sugárzással kezelt vad típusú és *Dmp53* mutáns embriók microarray vizsgálata során DNS javításban és apoptózisban szerepet játszó fehérjéket kódoló géneket a Dmp53 célgénjeiként azonosítottak. Ezek közül a *Ku70* és *Ku80* gének termékei a nem homológ DNS végek egyesítését eredményező úgynevezett „non-homologous end joining” DNS javító folyamat résztvevői. A *reaper*, *sickle* és *hid* pro-apotótikus gének mellett az *Eiger* tumor nekrosis faktor homológot is Dmp53 által szabályozott célgénként írták le ebben a kísérleti rendszerben, ami rávilágított a Dmp53 belső és külső apoptótikus útvonalakban egyaránt betöltött szerepére (28). Ezek alapján egy modellt állítottam fel a Dmp53 által irányított, ionizáló sugárzást követően kialakuló sejtválaszokról (13/A. ábra). Az UVC sugárzás a DNS sérüléseként főként pirimidin dimerek és (6-4) „foto produktumok” kialakulását okozza. Nem ismert részleteiben az az útvonal, amely segítségével UV sugárzás hatására a p53 feltételezhetően hely-specifikus foszforiláció révén aktiválódik (70). A *Drosophila* p53 csakúgy, mint emlős homológja, az UVC sugárzás okozta DNS sérüléseket kijavító NER indukciójában közvetlenül részt vesz (77). Az emlős p53-ról

kimutatták, hogy a DNS javítás megindításában játszott egyik szerepe a hisztonok globális acetilációjának elősegítése, amely révén a reparációban résztvevő fehérjék kromatinhoz való könnyebb hozzáférését segíti (7). Két, a hisztonok módosításában szerepet játszó gént azonosítottam, amelyek Dmp53-tól függően aktiválódnak UVC kezelést követően. A *toutatis* pozitív hatást gyakorol a neuronális gén kifejeződésre és kimutatták, hogy expressziója a szteroidok által kiváltott apoptózisban megemelkedik (78, 130). A *ballchen* fehérje terméke – egy hiszton treonin kináz – a megfelelő kromoszómális struktúra kialakításában vesz részt a meiosis során (63). Feltételezésem szerint a Dmp53 ezen gének indukcióján keresztül aktivál bizonyos kromatin módosításokat, amelyek a DNS javításában résztvevő fehérjék működését segítik (13/B. ábra). Két mikrotubulushoz kötődő proteint kódoló gén – a *Grip75* és *l(1)dd4* – transzkripciója is Dmp53-függő emelkedést mutatott UVC sugárzást követően. Egyes annotációk és irodalmi adatok alapján feltételezhető, hogy mindkét proteinnek szerepe van a sejtciklus lefolyásában (14). Az *ebi*-t szintén mint lehetséges Dmp53 célgént azonosítottam. Fehérje terméke, az Ebi, anti-proliferatív hatású, segíti a sejtciklusból való kilépést differenciációs folyamatokban (25, 39). Humán homológja a β -katenin lebontását végző fehérje komplex tagjaként részt vesz a p53 által indukált sejtciklus leállításban (94), *Drosophilában* a p53 által szabályozott hasonló útvonalat még nem azonosítottak. A Dmp53-ról az eddigi kísérleti adatok alapján azt tartják, hogy az emlős p53-mal ellentétben nem okoz közvetlen sejtciklus leállást (110). A Dmp53 és az *ebi* közti lehetséges kapocs azonban felveti a lehetőségét egy, a fentiekben leírt hasonló útvonal létének. A *Grip75* és *l(1)dd4* Dmp53 általi szabályozása is azt sugallja, hogy a Dmp53-nak mégis lehet valamilyen hatása a sejtciklus menetére (13/B. ábra). A *Drosophila* fejlődésében kulcs szerepet játszó autofágia sok elemében hasonlít az apoptózisra. A Ftz-fl transzkripciós faktor a nyálmirigy autofágiája során az ekdizon hatására az úgynevezett elsődleges sejthalál gének transzkripcióját indukálja, amelyek részt vesznek a másodlagos sejthalál gének – *hid*, *Ark* – aktiválásában. Az Ftz-fl a kaszpáz 3, a sejthalál egyik effektorának expressziós szabályozásában is szerepet játszik (26, 91). Kísérleteim során az *ftz-fl* UVC sugárzás hatására a Dmp53-tól függően aktiválódott. Az általam felállított modell szerint a Dmp53 az *Ark* és *hid* gének kifejeződését közvetlenül és az Ftz-fl-en keresztül is képes aktiválni (13/B. ábra). A rho-1 egy EGFR ligandum, a STAR proteolízisében résztvevő faktor (12). A sejtek közötti térbe kikerült STAR ligandum pedig az EGF receptoron keresztül a Ras aktiválódását eredményezi, ami a sejtek további sorsát befolyásolja. Kurada és munkatársa fejlődő szemben és embrióban a *hid* aktivált Ras általi transzkripciós szabályozására talált bizonyítékot. A fejlődés során a Ras szuppresszálta a *hid* kifejeződését,

antiapoptótikus hatást kifejtve ezáltal (74). Elképzelhető, hogy az UVC okozta DNS károsodások esetén a Ras ezzel ellentétesen közvetlenül, vagy a *hid* aktiválásán keresztül az apoptózis kiváltásában játszik szerepet (13/B. ábra).



13. ábra: Az ionizáló (A) - és UVC sugárzás (B) hatására kialakuló, Dmp53 által irányított sejtválaszok modelljei.

Az emlős Daxx fehérje az apoptótikus válasz egyik regulátora, más szabályzó faktorokkal kölcsönhatásban transzkripciót és szignál transzdukciós utakat irányít. A humán homo-

lógokhoz hasonlóan a *Drosophila* p53 és DLP közvetlen kölcsönhatásban állnak egymással. A két fehérje humán homológjainak kölcsönhatásáról számos tanulmány látott napvilágot, azonban az egymásra gyakorolt hatásokról sokszor ellentmondóak az eredmények. A két *Drosophila* homológ közti funkcionális kapcsolat feltárása során a *DLP* mutánsok – *DLP*^{U26}, *DLP*^{U32}, *DLP*^{U42} – nagy dózisu ionizáló sugárzásra való érzékenységet megvizsgáltam. A *Dmp53* mutánsokkal ellentétben egyik *DLP* törzs sem mutatott fokozott érzékenységet, ami azt jelzi, hogy a DLP-nek nincs kulcsfontosságú szerepe a nagy dózisu ionizáló sugárzás hatására létrejövő *Dmp53*-függő sejtválaszok aktivációjában. Ezt a feltételezést alátámasztja, hogy az ionizáló sugárzások hatására aktiválódó pro-apoptotikus gén, a *reaper*, *Dmp53*-függő szabályozásában és alap expressziós szintjének fenntartásában a DLP-nek nincs szerepe. A DLP fehérje hiányában ugyanis a *reaper* *Dmp53* általi indukciója ugyanúgy lezajlik, mint vad típusú állatokban. A humán Daxx p53 aktivitására gyakorolt moderáló hatása sem érvényesül minden p53 célgén transzkripciós szabályozásában. Például a humán p53 által szabályozott *bax*, *PIG3* és *Aip1*, pro-apoptotikus gének kifejeződésére nincs hatással a Daxx (53). A *reaper*-rel ellentétben egy másik pro-apoptotikus gén, az *Ark*, alap expressziójának fenntartásában a DLP szerepet játszik. Az *Ark* mRNS szintje *dlp* mutánsokban alacsonyabb, a DLP túltermelése esetén pedig magasabb volt, mint a kontroll állatokban. Kimutatták, hogy a humán Daxx kötődik a célgénjeinek promóter régiójában levő acetilált core hisztonokhoz, amelyen keresztül más transzkripciós faktorokkal, koaktivátorokkal és korepresszorokkal együttesen képes az adott promóter differenciált szabályozására. A hiszton deacetilázok promóterre való gyűjtésével a Daxx ilyen módon represszor hatást fejt ki (60). Humán B sejtekben a Daxx, a Pax5 transzkripciós faktorról és a CBP koaktivátorral együtt működve aktivátorként viselkedik (42). Lehetséges, hogy a *Dmp53* és DLP ehhez hasonlóan szabályozzák az *Ark* mRNS szintjét. A humán p53 működését a Daxx általi szabályozza, hogy a p53 transzaktivációs funkcióját moderálja. A Daxx humán p53-ra gyakorolt hatását főleg emlős sejt kultúrákon végzett kísérletekben vizsgálták, a nyert eredmények azonban ellentmondóak. A Daxx a *p21* és *Mdm2* promóterein gátolja, ám egyéb pro-apoptotikus gének esetében nem módosítja a p53 általi génaktivációt (53). Genetikai interakciós kísérletekben a *DLP* kópia számának csökkenésével párhuzamosan a *Dmp53* által kiváltott apoptózis fokozódott. Ez arra enged következtetni, hogy a DLP gátolja a *Dmp53* apoptózist indukáló hatását.

Az ADA2 transzkripciós adapter tartalmú komplexek élesztőben és emberben szekvenancia specifikus transzkripciós faktorokon keresztül részt vesznek gén specifikus transzkripció aktivációban (13, 17, 20, 90, 123, 135). Élesztővel végzett vizsgálatokban kimutatták, hogy a humán p53 transzaktivációs funkciójának betöltéséhez az ADA2/ADA3/GCN5 tartalmú

adaptor komplex közreműködése is szükséges (135). A humán ADA3 sejtkultúrákban a humán p53-mal kölcsönhatásban van, és esszenciális szerepe van a p53 transzkripció aktivitásában és az általa kiváltott apoptózisban (135). A GCN5 hiszton acetil transferáz (HAT) tartalmú adaptor komplexek részeként a *Drosophila* ADA2 fehérjék – dADA2a és dADA2b – is részt vesznek a transzkripció aktivációjában (75, 106). A Dmp53 és dADA2b kölcsönhatását *in vitro* pull-down kísérletekben igazolták (75). A dADA2b tartalmú SAGA komplex és a Dmp53 kapcsolatára utal továbbá, hogy ionizáló sugárzással kezelt *dAda2b* mutáns lárvák imágó korongjaiban az apoptótikus sejtek száma kevesebb, mint a vad típusú lárvákban (112). A SAGA mellett nem régen azonosítottak egy újabb aktivátor komplexet *Drosophilában*, az ATAC-ot. Az ATAC komplexnek tagjai a dGCN5, dADA3, dHCF (host cell factor), Atac1 és egyéb, még azonosítatlan komponensek mellett a dADA2a is (55). *In vitro* kísérletekben a Dmp53 és dADA2a között nem detektáltak kölcsönhatást (75). Kísérleteimben a *reaper* nagy dózisú ionizáló sugárzást követő, Dmp53 általi aktivációjának elmaradását detektáltam *dAda2a* mutáns állatokban. Ezzel párhuzamosan *dAda2a* mutáns lárvák imágó korongjaiban az apoptótikus sejtek száma is szignifikánsan kevesebb volt, mint a vad típusú lárvákban röntgen kezelést követően. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a nagy dózisú ionizáló sugárzást követő, *reaper*-t magába foglaló apoptótikus sejtválasz a Dmp53 és dADA2a/ATAC komplex közreműködését igényli, a dADA2b/SAGA komplex pedig a *reaper*-től függetlenül kialakuló, de a Dmp53 által indukált apoptótikus utak aktiválásában vesz részt (112). Egyes kísérleti adatok arra utalnak, hogy a Dmp53 a dADA2b tartalmú komplexekkel együttműködve, valószínűleg az *Ark*, pro-apoptótikus gén aktivációján keresztül indítja meg a programozott sejtihalált (nem publikált adat). Az ATAC komplex és Dmp53 közötti közvetlen kapcsolat jellemzésére vonatkozó vizsgálatokat nem végeztem. Úgy vélem, hogy az ATAC és Dmp53 közötti kapcsolat több módon is befolyásolhatja a Dmp53 működését. Az emlős p53-ról már kimutatták, hogy számos hiszton módosító aktivitással rendelkező transzkripció koaktivátor- és korepresszor komplexszel képes kölcsönhatásba lépni (87, 107). Ezek a komplexek magát a p53-t módosítva – például a p300 a fehérje karboxi terminálisának számos lizinjét acetilálja – befolyásolják a p53 stabilitását, DNS kötő képességét, sejten belüli lokalizációját és az MDM2 általi degradációját (54, 62, 87, 121). Másrészt, a p53 célgének promóterében a H3 és H4 hisztonok acetilációjával/deacetilációjával járulnak hozzá a transzkripció erősödéséhez, illetve gyengüléséhez (17, 121). Az emlős p53 esetében tapasztaltakhoz hasonlóan elképzelhető, hogy az ATAC komplex a Dmp53 specifikus pozícióban levő lizinjeit acetilálja, ezzel finom konformáció változást okoz a fehérjében és segíti a Dmp53

célgénjének promóteréhez való hatékony kötődését. A másik lehetőség az – ugyancsak az emlős p53-mal analóg módon –, hogy az ATAC komplexet a Dmp53 a célgének promóteréhez kapcsolódva kihorgonyozza, így azok nyitott konformációba kerülését serkenti, ami végső soron a célgének transzkripciójának aktiválásához vezet. Mindkét variáció feltétele a Dmp53 és dADA2a/ATAC közötti kölcsönhatás kialakulása. Ez feltételezhetően nem a dADA2a-n keresztül valósul meg, hiszen irodalmi adatok utalnak arra, hogy a két fehérje közt nincs detektálható kölcsönhatás. A humán p53 és ADA3 kölcsönhatását már leírták. Feltételezik, hogy az ADA3 kofaktorként a p53 és a különböző HAT komplexek közti produktív kölcsönhatásban játszik szerepet (135). Lehetségesnek tartom, hogy a Dmp53 és az ATAC komplex közti interakció a dADA3 fehérjén keresztül alakul ki, ennek bizonyítása azonban további vizsgálatokat igényel.

Eredményeim alapján úgy gondolom, hogy a *Drosophila melanogaster* jól használható modell a p53 fehérje működésének tanulmányozásához. A Dmp53 sejtbeli funkcióiról kapott kísérletes eredmények hasznos információkkal szolgálhatnak az emlős p53 által szabályozott folyamatok részletesebb megismeréséhez.

6. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőimnek Dr. Bálint Évának és Dr. Boros Imrének témámban, szakmai előre menetelemben való lelkiismeretes irányításukért és a lehetőségért, hogy laboratóriumukban végzett tudományos tevékenységemet biztosították. Külön köszönöm Dr. Boros Imrének, hogy rám bízta a kvantitatív real time PCR laboratóriumunkba való bevezetésének feladatát.

Hálával tartozom Dr. Bodai Lászlónak és Lendvai Ágnesnek a kvantitatív real time PCR elsajátításában nyújtott segítségükért. Külön köszönöm Dr. Bodai Lászlónak a DNS microarray és Drosophila kísérletekhez adott hasznos tanácsait. Dr. Komonyi Orbánnak és Dr. Pankotai Tibornak köszönöm a sok hatszemközti tudományos beszélgetést, amelyek során munkámat objektíven bírálták.

Bereczki Orsolyának, Csebella Bakota Adriennek, Nagy Bettinának és Zsindely Nórának köszönettel tartozom őszinte barátságukért és munkámban nyújtott segítségükért.

Hálával tartozom Ökrösné „Kis Katinak” a szövetkultúrák technikák elsajátításában nyújtott áldozatos segítségét.

Köszönöm csoportunk többi tagjának – Anita Ciurciunak, Cristina Popescunak, Edith Vamosnak, Pardi Norbertnek és Tombácz Istvánnak –, hogy „SZBK”-s laboratóriumunkban mindig szívesen fogadtak és ottani munkámat megkönnyítették.

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom szüleimnek és férjemnek szeretetükért, türelmükért, a bizalmukért és hogy minden segítséget megadnak nekem, hogy álmaimat megvalósíthassam.

7. A doktori értekezés összefoglalója

A p53 tumor szuppresszor 1979-es felfedezése óta a rákkutatás egyik legintenzívebben kutatott molekulájává vált, hiszen a p53 génben bekövetkező mutációk a humán rákos elváltozások több mint felében megtalálhatók. A p53 gén csírvonalban bekövetkező mutációja családi felhalmozódást mutató, korai életkorban bekövetkező rákos elváltozásokat okoz, amelyet Li-Fraumeni szindrómaként ismerünk. A p53 fehérje a sejteket érő stressz – mint hipoxia, aktivált onkogének, ionizáló- és UV sugárzás – hatására stabilizálódik és transzkripciós faktorként célgénjeinek kifejeződését aktiválja, vagy represszálja. Ezen gének kifejeződésének szabályozásán keresztül a p53, mint a sejt központi „őre” a genom integritásának fenntartásában és a sejt végső sorsának meghatározásában kritikus szereppel bír. Mutációja a DNS hibák felhalmozódásához és a sérült sejtek kontrollálatlan osztódásához vezethet. A p53 finom működésének megértése, az általa szabályozott célgének azonosítása végső soron a daganatképződés részleteinek feltárását, esetleges rák ellenes terápiák kidolgozását szolgálják.

Normális ütemben osztódó sejtekben a p53 fehérje koncentrációja nagyon alacsony, gyakran kimutathatatlan a fehérje rövid féléletidejének köszönhetően. Folyamatos, poliubiquitinálódás általi degradációját az MDM2 ubiquitin ligázzal alkotott autoregulációs, visszacsatolós szabályozási kör biztosítja. DNS károsodás hatására a Chk1 és Chk2 (checkpoint kinase 1, checkpoint kinase 2) kinázok a p53-t foszforilálják, ami szintjének gyors megemelkedéséhez és transzkripciós faktorként való aktiválódásához vezet. Ehhez hasonlóan aktivált onkogének – Myc, Ras, E2F1 – is képesek a p53 stabilitását indukálni. Az aktivált p53 a sejtmagba transzportálódva transzkripciós faktorként funkcionál és célgénjei expressziójának indukcióján és represszióján keresztül a sejtciklus leállítást, DNS javító folyamatokat és apoptózist aktivál. Utóbbi egy, a transzkripcióra gyakorolt hatásától független útvonalon is képes indukálni a mitokondrium külső membránjának dezintegrációjával, abban az esetben, ha a sejtben transzkripciós blokádnak alakul ki. Hiszton módosító aktivitással rendelkező transzkripciós koaktivátor és korepresszor komplexekkel kialakított interakciója révén a p53 képes célgénjeinek kifejeződését módosítani és a hisztonok globális acetilációjának módosításával DNS javító folyamatokat beindítani. Acetilációján át maga a p53 transzaktivációs működése is finoman szabályozódik és az egyes célgénjei expressziójára kifejtett hatását más transzkripciós- és kofaktorokkal kialakított kölcsönhatásai is befolyásolják.

A daganatok kialakulásában szerepet játszó humán gének két harmadának homológját azonosították ecetmuslicában. A p53 tumor szuppresszor által szabályozott folyamatok pontosabb ismerete fontos a humán daganatok kialakulásának megértésében és terápiás eljárások kidolgozásában. A *Drosophila* genom projekt befejeződésekor végzett összehasonlító vizsgálatok során azonosították a *Drosophila melanogaster p53 (Dmp53)* génjét. A Dmp53 fehérje rendelkezik az humán p53 jellemző doménjeivel. A humán és *Drosophila* p53 a középső, DNS-kötő doménjében mutatja a legnagyobb, 25%-os hasonlóságot, az amino- és karboxi terminális transzaktivációs és oligomerizációs részek konzerváltsága alacsony. A viszonylag kis homológia ellenére a Dmp53 biokémiaiilag nagyon hasonlít az emlős p53-ra. A Dmp53 képes kötődni a humán p53 konszenzus DNS-kötőhelyeihez és arról transzkripciót aktiválni. A Dmp53 emlős p53 fehérjével való hasonlósága alapján főleg a sejtciklus leállításában, apoptózis-, illetve DNS javító folyamatok indukciójában betöltött szerepét tanulmányozták. A Dmp53 *in vivo* működését a vad típusú, illetve a Dmp53 DNS kötő doménjében létrehozott pont mutációk hatására létrejövő, domináns negatív Dmp53 túltermelésén keresztül vizsgálták. A domináns negatív fehérje az emlős homológéhoz hasonlóan, gátolja a vad típusú Dmp53 funkcióit. Az emlős p53-mal ellentétben a *Drosophila* fehérje röntgen sugárzás hatására nem okoz G1 fázisban való sejtciklus leállást, ami azt sugallja, hogy a *Drosophila* imágó korongokban a Dmp53-tól független úton alakul ki ez a sejtválasz. A *Drosophila* Chk2 (DmChk2) ionizáló sugárzás hatására a Dmp53 fehérjét foszforilálja, azonban ez a módosítás a p53 stabilitására nincs hatással, ami arra utal, hogy a Dmp53 aktivitásának szabályozása nem a humán p53 és MDM2 által alkotott autoregulációs, visszacsatolós mechanizmushoz hasonlóan valósul meg. DNS károsító stresszhatásokra – mint a röntgen sugárzás – az aktivált Dmp53 egyes pro-apoptotikus gének – például *reaper* – transzkripciójának aktivációján keresztül apoptózist indukál, azonban a Dmp53 túltermelése önmagában is képes a programozott sejt-halál kiváltására. Egyes DNS javításban részt vevő gének – például *Ku70* és *Ku80* – röntgen sugárzást követő transzkripciójának serkentése a Dmp53 DNS javító folyamatok kiváltásában való szerepére utalnak.

A *Dmp53* mutáns harmadik stádiumú lárvák UVC sugárzásra való érzékenységét vizsgálva azt találtam, hogy – hasonlóan az ionizáló sugárzashoz – az állatok fokozott érzékenységet mutattak, fél letális dózisu a vad típusú *Drosophilák*hoz képest az ötödére csökkent. Az UVC sugárzás fejlődő retinára gyakorolt hatásának vizsgálatokor *Dmp53* mutánsokban a DNS javító folyamatok elmaradását és a kifejlett állatokban a szem ommatida szerkezetének sérülését tapasztalták az apoptózis túlsúlya miatt. A humán p53-hoz való funkcionális hasonlósága

miatt feltételezhető, hogy Dmp53 hiányában a DNS hibáit kijavító folyamatok nem képesek indukálódni, ami az örökítő anyagban bekövetkezett sérülések felszaporodásához vezet. A *Dmp53* mutáns állatok csökkent életképessége tehát feltételezhetően a DNS javító folyamatok elmaradásának köszönhető.

UVC kezelt *w¹¹¹⁸* és *Dmp53* mutáns ecetmuslicák expressziós profiljának DNS microarray kísérletben történő elemzése és összehasonlítása során lehetséges Dmp53 célgéneket azonosítottam. Ismert *Drosophila* pro-apoptotikus gének és az általam azonosított lehetséges célgének UVC és ionizáló sugárzás hatására bekövetkező expresszió változása alapján három Dmp53 célgén csoportot állítottam fel. Az első csoport olyan géneket – *Ark*, *tou*, *ftz-fl*, *ebi* és *CG11982* – tartalmaz, amelyek Dmp53-függő aktivációja csak UVC sugárzást követően következik be. A második csoport – *hid*, *rho*, *ballchen*, *Grip75*, *l(1)dd4*, *CG8319* és *CG5620* – a Dmp53 jelenlétében ionizáló és UVC sugárzás hatására egyaránt indukálódik. Ezen gének termékei feltételezhetően általános szereppel bírnak az örökítő anyag károsodásakor beinduló sejtválaszokban. A harmadik csoportba tartozó gének – *reaper*, *sickle*, *Eiger*, *Ku70* és *Ku80* – kizárólag ionizáló sugárzást követően aktiválódnak a Dmp53 közreműködésével. A humán p53 működésével kapcsolatban leírtak hasonló stresszfüggő, szelektív gén kifejeződés szabályozást például a *p21* és *mdm2* esetében. Az egyes gének Dmp53 általi szelektív aktivációjára több magyarázat is lehetséges. Egyes irodalmi adatok arra utalnak, hogy a gének mérete befolyásolja azok UV sugárzás hatására megváltozó kifejeződésének szabályozását, mivel az UV sugárzás által okozott DNS károsodások a transzkripciót gátolják. Az UV dózistól függően a p53 a kisebb méretű target génjeit nagyobb gyakorisággal aktiválja, hasonló korrelációt eredményeim alapján azonban nem kaptam. Egy másik magyarázat az lehet, hogy a Dmp53 csak az UVC hatására bekövetkező poszttranszlációs módosítások után képes célgénjei transzkripciójának befolyásolására. Ilyen specifikus módosításokat a humán p53 esetében már leírtak. A harmadik feltételezhető magyarázat az, hogy a Dmp53 célgénjeinek kifejeződését más, az UVC hatására aktiválódó olyan transzkripciós faktorokkal együttműködve szabályozza, amelyek a célgének enhanszereiben saját rezponzív elemeikhez képesek kötődni. Ezt a feltételezést a humán p53 konszenzusra emlékeztető, a *reaper* enhanszerében található kötőhelyek hiánya alátámasztja. ugyanis az újonnan azonosított, lehetséges célgének szabályozó régióin bioinformatikai analízist végezve nem találtam szimmetrikus, az emlős konszenzusra jellemző kötőhelyet, csupán „fél- és teljes” p53 kötőhelyeket. A humán p53-ról kimutatták, hogy a konszenzus szekvencia egyetlen kópiájához nem képes kötődni. Mindazonáltal nem valószínű, hogy a kísérletek során azonosított lehetséges célgének a Dmp53 által

aktivált sejtválasz későbbi lépéseit képviselnék, hiszen indukciójuk az UVC sugárzást követően igen korán kimutatható volt. A humán p53 kötőhelyére emlékeztető szekvenciák hiánya azt is jelezheti, hogy a Dmp53 célgénjeinek kifejeződését nem konszenzus kötőhelyeken keresztül is képes befolyásolni. Több irodalmi adat utal arra, hogy a humán p53 nem konszenzus szekvenciákon keresztül gátolja egyes célgénjeinek expresszióját.

A Dmp53 ionizáló sugárzás hatására bekövetkező aktivációja a DmChk2 (checkpoint kinase 2) kináz általi foszforilációján keresztül következik be. Az aktív Dmp53 pro-apoptotikus gének – mint *reaper*, *sickle* és *hid* – transzkripciójának indukciójával apoptotikus választ indít be. A *Ku70* és *Ku80* gének kifejeződésének serkentésén keresztül pedig vélhetően a DNS reparációs folyamatok megindítását kezdeményezi. Nem ismert részleteiben az az útvonal, amely segítségével UV sugárzás hatására a p53 feltételezhetően hely-specifikus foszforiláció révén aktiválódik. Feltételezve, hogy az UVC sugárzás hatására aktiválódott Dmp53 célgénjei transzkripciójának szabályozásán keresztül különböző sejtválasz utakat aktivál, a microarray kísérletben azonosított géneket azokban próbáltam elhelyezni, géntermékek funkciói alapján. A *ballchen* és *toutatis*, vélhetően hisztonok módosításában szerepet játszó gének indukcióján keresztül kromatin módosításokat kezdeményezhet, amelyek a DNS javító folyamatokat lezajlását segítik. Az *Ark* és *hid* pro-apoptotikus gének közvetlen és esetlegesen az *ftz-fl*- és *rho*-n keresztüli aktivációjával UVC sugárzást követően apoptózist képes kiváltani. A kromatin módosítások, az *l(1)dd4* és *Grip75*, sejtciklus lefolyásában vélhetően szerepet játszó gének és a humán *ebi* homológjának szabályozásán keresztül lehetséges, hogy a sejtciklus leállítását kezdeményezheti.

Az emlős Daxx fehérje az apoptotikus válasz egyik regulátora, a transzkripciót és szignál transzdukciós utakat irányítja kölcsönhatásban más szabályzó faktorokkal. A humán homológokhoz hasonlóan a *Drosophila* Dmp53 és DLP közvetlen kölcsönhatásban állnak egymással. A két fehérje humán homológjainak kölcsönhatásáról számos tanulmány látott napvilágot, azonban az egymásra gyakorolt hatásukról írottak sokszor ellentmondanak egymásnak. A *Dmp53* mutánsokkal ellentétben a *DLP* mutáns lárvák nem mutattak fokozott érzékenységet ionizáló sugárzásra, ami azt jelzi, hogy a DLP-nek nincs kulcsfontosságú szerepe a nagy dózisú ionizáló sugárzás hatására létrejövő Dmp53-függő sejtválaszok aktivációjában. Ezt a feltételezést alátámasztja, hogy az ionizáló sugárzások hatására aktiválódó pro-apoptotikus gén, a *reaper*, Dmp53-függő szabályozását és alap expressziós szintjének fenntartását a DLP hiánya nem befolyásolta. A humán Daxx p53 aktivitására gyakorolt moderáló hatása sem érvényesül minden p53 célgén transzkripció szabályozásában. A *reaper*-rel ellentétben, egy másik pro-apoptotikus gén, az *Ark* alap expressziójának fenntartásában eredmé-

nyeim alapján a DLP szerepet játszik. Genetikai interakciós kísérletekben a DLP csökkenő mennyiségének függvényében a Dmp53 túltermelése által kiváltott apoptózis mértéke megemelkedett. Lehetséges, hogy a Dmp53 és DLP a humán homológjaikhoz hasonlóan a kromatin szerkezet befolyásolásával szabályozzák az *Ark* mRNS alap szintjét. Eredményeim arra engednek következtetni, hogy a DLP alapvetően gátolja a Dmp53 apoptózis-indukcióra gyakorolt hatását.

Az ADA2 transzkripciós adapter tartalmú komplexek élesztőben és emberben szekvencia specifikus transzkripciós faktorokon keresztül részt vesznek génspecifikus transzkripció aktivációban. A GCN5 hiszton acetil transferáz (HAT) tartalmú komplexek részeként a *Drosophila* ADA2 fehérjék – dADA2a és dADA2b – is részt vesznek a transzkripció aktivációjában. A Dmp53 és a dADA2b tartalmú SAGA komplex kapcsolatára több bizonyíték is van. Kimutatták, hogy a dADA2b/SAGA komplex a *reaper*től függetlenül kialakuló, de a Dmp53 által indukált apoptotikus utak aktiválásában vesz részt. A közelmúltban azonosított dADA2a tartalmú ATAC komplex szerepét vizsgáltam a Dmp53 általi apoptózis indukcióban. Eredményeim arra engednek következtetni, hogy a nagy dózisú ionizáló sugárzást követő, *reaper* magába foglaló apoptotikus sejtválasz a Dmp53 és dADA2a/ATAC komplex közreműködését igényli, mivel dADA2a hiányában a *reaper* aktivációja elmaradt és ennek következményeként az imágó korongokban az apoptózis csökkent mértékű volt. A dADA2a/ATAC komplex Dmp53 közötti közvetlen kapcsolat jellemzésére kísérleteim nem terjedtek ki. Mindazonáltal elképzelhető, hogy a dADA2a/ATAC komplex a Dmp53 specifikus pozícióban levő lizinjeit acetilálja, amely finom konformáció változást okozva befolyásolja a Dmp53 DNS kötő képességét. A másik lehetőség az, hogy a dADA2a/ATAC komplexet a Dmp53, célgénjének promóterére kapcsolódva kihorgonyozza, így annak nyitott konformációba történő tranzíciójával a célgén transzkripciójának aktiválódását segíti, így befolyásolva a Dmp53 általi transzaktivációt. A humán p53 és hiszton módosító aktivitással rendelkező transzkripciós koaktivátor és korepresszor komplexek közötti interakciók bizonyítottan hasonló utakon járulnak hozzá a p53 működésének szabályozásához. Mindkét variáció feltétele a Dmp53 és dADA2a/ATAC közötti kölcsönhatás kialakulása. Ez feltételezhetően nem a dADA2a-n keresztül valósul meg, hiszen irodalmi adatok arra utalnak, hogy a két fehérje közt nincs detektálható kölcsönhatás. A humán p53 sejt kultúrákban a humán ADA3-mal fizikai interakcióban áll, és alapvető szerepe van a p53 transzkripciós aktivitásában és az általa mediált apoptózisban. Lehetségesnek tartom, hogy a Dmp53 az ATAC komplex közti interakció a dADA3 fehérjén keresztül alakul ki, ennek bizonyítása azonban további vizsgálatokat igényel.

Eredményeim alapján úgy gondolom, hogy a *Drosophila melanogaster* jól használható modell a p53 fehérje működésének tanulmányozásához. A Dmp53 sejtbeli funkciójáról kapott kísérletes eredmények hasznos információkkal szolgálhatnak az emlős p53 által szabályozott folyamatok részletesebb megismeréséhez.

8. Summary

The p53 tumor suppressor gene and its protein product have become the objects of intense study since their discovery in 1979, primarily because more than half of the human tumors contain mutations of this gene. In Li-Fraumeni syndrome, mutations of p53 occurring in the germ line lead to tumor formation in young ages with high familiar frequency. Various types of stress factors, which cause oncogenic alterations and DNA damage, including activated oncogenes, hypoxia, ionizing- and UV irradiation, rapidly activate human p53 which in turn induces or represses the transcription of its target genes as a transcription factor. Through regulation of its targets p53 acts as a “guard” of genome integrity and it plays crucial role in determining the final fate of damaged cells. Mutations of p53 result in the accumulation of DNA damages and unlimited proliferation of the injured cells. Detailed analysis of the functions of p53 and identification of its target genes may lead to a better understanding of tumor formation and development of cancer therapies.

In normal developing cells p53 is a short-lived protein, which is maintained at low, often undetectable levels. Degradation by continuous polyubiquitination of p53 is ensured through an autoregulatory feedback loop, which is based on the interaction of p53 and the MDM2 ubiquitin ligase. Upon DNA damage, p53 is phosphorylated by Chk1 (checkpoint kinase 1) and Chk2 (checkpoint kinase 2) kinases leading to the rapid elevation of p53 level and its activation as transcription regulator. Similarly, activated oncogenes, such as Myc, Ras or E2F1, are able to stabilize p53. Activated p53 is transported to the nucleus where it functions as a transcription factor, inducing or repressing its target genes, activates cell cycle block and accompanying DNA repair or apoptosis. In the case of UV caused transcription blockade, apoptosis also can be induced by p53 in a transcription independent pathway through permeabilization of the mitochondrial outer membrane. Via interactions with a number of transcriptional co-activators and co-repressors: i) p53 is able to modify the expression of its target genes, ii) p53 induces DNA repair by influencing the global acetylation of chromatin, iii) the transactivation function of p53 is modulated by itself. The effect of p53 on the transcription of its target genes can also be regulated by interactions between p53 and other transcriptional factors and co-factors.

Genome analysis studies have shown that two third of the genes implicated in human cancers have counterparts in fruit fly. Getting more detailed information about cellular path-

ways in which p53 is involved is important for the better understanding of tumor formation and developing cancer therapies. After completion of the *Drosophila* genome projects the *Drosophila melanogaster* homologue of p53 was identified based on its sequence similarity to the human counterpart. The *Drosophila melanogaster* p53 (Dmp53) protein possesses the characteristic protein domains of human p53. The two homologue proteins share the highest similarity (25%) in the central DNA-binding domain, while the amino acid conservation of the transactivation and oligomerization domains, located in the amino and carboxy terminus respectively, is lower. In spite of the relatively low sequence homology, biochemically Dmp53 acts in a similar way than its human counterpart. Dmp53 is able to recognize and initiate transcription from the consensus DNA-binding site of human p53 in several reporter assays. Based on the similarity between the two homologues, studies were performed to assess the role of Dmp53 in cell cycle arrest, apoptosis and DNA repair. The *in vivo* functions of Dmp53 were investigated through overexpression of wild type and dominant negative forms of the protein. The dominant negative forms of Dmp53 were generated by introducing point mutations in the DNA-binding domain of the protein which, like in mammals, are capable to block the function of the wild type form. Results of these studies also indicate that *Drosophila* p53, in contrast to human p53, has no effect on G1 cell cycle arrest in imaginal discs. The *Drosophila* homologue of Chk2 (dChk2) is capable to phosphorylate Dmp53 after IR treatment. This modification has no influence on the cellular concentration of Dmp53 indicating that Dmp53 activity is regulated by a mechanism different from the human p53-MDM2 autoregulatory feedback loop. If the cell is exposed to DNA damaging agents, such as ionizing radiation (IR), activated Dmp53 can induce apoptosis via the regulation of the transcription of several proapoptotic genes such as *reaper*, for example. The overproduction of Dmp53 itself is able to induce programmed cell death. Dmp53 stimulates the expression of certain DNA repair genes, *Ku70* and *Ku80*, under X-ray radiation, suggesting the role of Dmp53 in the regulation of DNA repair.

Dmp53 is necessary for the proper response to ionizing radiation, since *Dmp53* deficient flies are radiation sensitive and show genomic instability. Investigating the response of *Dmp53* mutants to UVC radiation, high sensitivity was detected. The half-lethal dose of UVC for *Dmp53* null mutant larvae is only about one-fifth of that of wild type. UVC radiation causes failing of DNA repair and injures the ommatidal structure of the developing retina of *Dmp53* deficient larvae as a consequence of predominant apoptosis. In concert with observation with the human counterpart, lack of Dmp53 may provoke incomplete activation of DNA

repair leading the accumulation of DNA damages. The decreased viability of *Dmp53* null mutants possibly results from the decrease of DNA repair processes.

Possible target genes of Dmp53 were identified by a comparative DNA microarray analysis of the RNA expression profile of UVC treated wild type and Dmp53 mutant larvae. Three groups of potential Dmp53 target genes were identified including known Drosophila proapoptotic genes and newly identified putative Dmp53 targets. The expression of the members of the first group, *Ark*, *tou*, *ftz-f1*, *ebi* and *CG11982*, is up-regulated in a Dmp53-dependent manner only after UVC irradiation. The second group includes *hid*, *rho*, *ballchen*, *Grip75*, *l(1)dd4*, *CG8319* and *CG5620*. These genes are activated Dmp53-dependently by both IR and UVC suggesting their general role in DNA damage responses. The third group represents genes induced by IR only, including genes such as *reaper*, *sickle*, *Eiger*, *Ku70* and *Ku80*. Similar stress-dependent, selective gene regulation by human p53 has been already described in the case of *p21* and *mdm2*. There may be several possible explanations to why Dmp53 activates only a set of its target genes after a specific stress signal while others are unaffected. Published data suggest that gene size influences UV-induced gene expression, because the DNA damages caused by UV inhibit transcription. Transcription of p53 target genes is also inhibited in a UV dose-dependent manner, resulting in the preferential induction of compact p53 target genes. Such correlation has not been detected in my experiments. It is possible that Dmp53 can activate transcription only after its UVC-induced post-translational modification. Such specific modifications of human p53 are already published. It is also possible that transcriptional activation of certain Dmp53 target genes requires other UV-induced transcription factors that bind to response elements in their enhancers regions. This hypothesis is indirectly supported by the observed lack of binding sites which are reminiscent to the human consensus. Results of a bioinformatical analysis performed with the regulatory region of putative Dmp53 target genes did not reveal symmetrical sequences resembling to the mammalian p53 binding site. Since p53 dependent gene activations could be detected early after the UVC treatment it is unlikely that the identified genes are indirect targets of Dmp53. The lack of binding sites may also reflect that Dmp53 is able to activate its target genes through non-consensus binding sites. Several published data demonstrate that human p53 represses the expression of its certain target genes through non-consensus binding sites.

IR induced dChk2-dependent phosphorylation of Dmp53 leads to its activation. Active Dmp53 induces apoptotic response via induction of the transcription of proapoptotic genes, such as *reaper*, *sickle* and *hid*. Activation of the expression of *Ku70* and *Ku80* likely initiates DNA repair processes. The pathway that activates p53 after UV damage is not fully under-

stood, although it probably involves site-specific phosphorylation of p53. Assuming that the UVC-activated Dmp53 regulates different cell responses through influencing the expression of its target genes, the newly identified genes were classified to pathways based on their functions. Enhancing the expression of *ballchen* and *toutatis*, two genes possibly involved in histone modification, Dmp53 may initiate global chromatin modifications facilitating DNA repair. Dmp53 is able to trigger apoptosis by direct and also by indirect activation of the *Ark* and *hid* proapoptotic genes through *ftz-fl* and *rho* after UVC damage. Dmp53 may provoke cell cycle arrest by regulating *l(1)dd4* and Grip75, which are possible participants of cell cycle control, and by activation of the Drosophila homologue of human *ebi*.

Mammalian death domain associated factor 6 (Daxx) is one of the regulators of apoptotic response, which, by interacting with other regulators modulates transcription and signal transduction pathways. Similarly to their human counterparts, Dmp53 and Drosophila Daxx (DLP, Daxx like protein) interact directly. Several groups have reported on the interaction of the human homologues, however the consequences of this relationship are unclear and reports on it are contradictory. In contrast to *Dmp53* mutants, *DLP* deficient flies do not show radio-sensitive phenotype indicating that DLP does not have a key role in the activation of Dmp53-dependent pathways after high dose of ionizing radiation. This assumption is confirmed by the finding that the lack of DLP has no effect on the ionizing radiation induced Dmp53 dependent activation and the basic transcription of the *reaper* proapoptotic gene. The moderating effect of Daxx on the activity of human p53 also does not reveal in the case of several p53 target genes. In contrast with *reaper*, the basic transcription level of another proapoptotic gene, *Ark*, is influenced by DLP. In genetic interaction experiments, in parallel with the reduction of *DLP* level, the level of apoptosis triggered by the overexpression of Dmp53 was elevated. It is possible that like the human counterparts, Dmp53 and DLP regulate the basic transcription of *Ark* by influencing the chromatin structure. Based on the detected results it seems that DLP has a repressing role on Dmp53 mediated responses.

The ADA2 transcriptional adapter containing complexes take part in gene specific transcription activation through interactions with sequence specific transcription factors in yeast and human. The Drosophila ADA2 proteins, dADA2a and dADA2b, are also involved in transcription activation as members of the GCN5, histone acetyltransferase (HAT) containing adaptor complexes. There are several evidences for the existence of relationship between Dmp53 and dADA2b containing SAGA complex. It has already been demonstrated that the dADA2b/SAGA complex participates in the apoptotic pathway induced by Dmp53 which do not include *reaper*. My aim was to investigate the effect of the recently identified dADA2a

containing ATAC complex on the Dmp53 mediated apoptosis. In the lack of dADA2a, the proper induction of *reaper* failed and as a consequence, the apoptotic response was suppressed in imaginal discs after high dose of IR. This finding suggests that the high dose ionizing irradiation-mediated Dmp53 dependent apoptotic pathway that includes the activation of *reaper* requires the contribution of the dADA2a/ATAC complex. These experiments did not provide information on the relationship between Dmp53 and ATAC. It is possible that the dADA2a/ATAC complex is able to acetylate specific lysines in Dmp53 itself inducing fine changes of Dmp53 affecting its ability of DNA binding. Another possibility is that Dmp53 activates transcription via recruiting dADA2a/ATAC onto the promoters of its target genes and facilitating the open conformation of those through histone acetylation. The interaction between human p53 and transcription co-activator and co-repressor complexes possessing histone modification activity has similar detected consequences in the regulation of p53 functions. Both hypothesis suppose physical interaction between Dmp53 and dADA2a/ATAC. It is unlikely that this interaction is formed through dADA2a since there are no biochemical evidences suggesting interaction between Dmp53 and dADA2a. In cell cultures, human p53 is able to interact with human ADA3 which has an essential role in the transcription and apoptosis mediating activity of p53. dADA3, a member of the ATAC complex, may be responsible for the Dmp53-ATAC interaction by a similar manner, this hypothesis however needs to be proven.

Based on my results I suggest that the *Drosophila melanogaster* is a suitable model for examination the functions of p53 protein. More detailed studies on the cellular functions of Dmp53 may serve valuable informations for a better understanding of p53 regulated processes.

9. Irodalmi jegyzék

1. **Abramova NA, Russell J, Botchan M, and Li R.** Interaction between replication protein A and p53 is disrupted after UV damage in a DNA repair-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 7186-7191, 1997.
2. **Abrams JM.** An emerging blueprint for apoptosis in Drosophila. *Trends Cell Biol* 9: 435-440, 1999.
3. **Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M, Henderson SN, Sutton GG, Wortman JR, Yandell MD, Zhang Q, Chen LX, Brandon RC, Rogers YH, Blazej RG, Champe M, Pfeiffer BD, Wan KH, Doyle C, Baxter EG, Helt G, Nelson CR, Gabor GL, Abril JF, Agbayani A, An HJ, Andrews-Pfannkoch C, Baldwin D, Ballew RM, Basu A, Baxendale J, Bayraktaroglu L, Beasley EM, Beeson KY, Benos PV, Berman BP, Bhandari D, Bolshakov S, Borkova D, Botchan MR, Bouck J, Brokstein P, Brottier P, Burtis KC, Busam DA, Butler H, Cadieu E, Center A, Chandra I, Cherry JM, Cawley S, Dahlke C, Davenport LB, Davies P, de Pablos B, Delcher A, Deng Z, Mays AD, Dew I, Dietz SM, Dodson K, Doup LE, Downes M, Dugan-Rocha S, Dunkov BC, Dunn P, Durbin KJ, Evangelista CC, Ferraz C, Ferriera S, Fleischmann W, Fosler C, Gabrielian AE, Garg NS, Gelbart WM, Glasser K, Glodek A, Gong F, Gorrell JH, Gu Z, Guan P, Harris M, Harris NL, Harvey D, Heiman TJ, Hernandez JR, Houck J, Hostin D, Houston KA, Howland TJ, Wei MH, Ibegwam C, et al.** The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185-2195, 2000.
4. **Adimoolam S and Ford JM.** p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 12985-12990, 2002.
5. **Adimoolam S, Lin CX, and Ford JM.** The p53-regulated cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 (cip1, waf1, sdi1), is not required for global genomic and transcription-coupled nucleotide excision repair of UV-induced DNA photoproducts. *J Biol Chem* 276: 25813-25822, 2001.
6. **Aihara H, Nakagawa T, Yasui K, Ohta T, Hirose S, Dhomaie N, Takio K, Kaneko M, Takeshima Y, Muramatsu M, and Ito T.** Nucleosomal histone kinase-1 phosphorylates H2A Thr 119 during mitosis in the early *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 18: 877-888, 2004.
7. **Allison SJ and Milner J.** Remodelling chromatin on a global scale: a novel protective function of p53. *Carcinogenesis* 25: 1551-1557, 2004.
8. **Arai N, Nomura D, Yokota K, Wolf D, Brill E, Shohat O, and Rotter V.** Immunologically distinct p53 molecules generated by alternative splicing. *Mol Cell Biol* 6: 3232-3239, 1986.
9. **Asha H, Nagy I, Kovacs G, Stetson D, Ando I, and Dearolf CR.** Analysis of Ras-induced overproliferation in *Drosophila* hemocytes. *Genetics* 163: 203-215, 2003.
10. **Ashcroft M, Taya Y, and Vousden KH.** Stress signals utilize multiple pathways to stabilize p53. *Mol Cell Biol* 20: 3224-3233, 2000.
11. **Bakalkin G, Selivanova G, Yakovleva T, Kiseleva E, Kashuba E, Magnusson KP, Szekely L, Klein G, Terenius L, and Wiman KG.** p53 binds single-stranded DNA ends through the C-terminal domain and internal DNA segments via the middle domain. *Nucleic Acids Res* 23: 362-369, 1995.
12. **Bang AG and Kintner C.** Rhomboid and Star facilitate presentation and processing of the *Drosophila* TGF- α homolog Spitz. *Genes Dev* 14: 177-186, 2000.

13. **Barbaric S, Reinke H, and Horz W.** Multiple mechanistically distinct functions of SAGA at the PHO5 promoter. *Mol Cell Biol* 23: 3468-3476, 2003.
14. **Barbosa V, Gatt M, Rebollo E, Gonzalez C, and Glover DM.** Drosophila dd4 mutants reveal that gammaTuRC is required to maintain juxtaposed half spindles in spermatocytes. *J Cell Sci* 116: 929-941, 2003.
15. **Barbosa V, Yamamoto RR, Henderson DS, and Glover DM.** Mutation of a Drosophila gamma tubulin ring complex subunit encoded by discs degenerate-4 differentially disrupts centrosomal protein localization. *Genes Dev* 14: 3126-3139, 2000.
16. **Bargonetti J, Manfredi JJ, Chen X, Marshak DR, and Prives C.** A proteolytic fragment from the central region of p53 has marked sequence-specific DNA-binding activity when generated from wild-type but not from oncogenic mutant p53 protein. *Genes Dev* 7: 2565-2574, 1993.
17. **Barlev NA, Candau R, Wang L, Darpino P, Silverman N, and Berger SL.** Characterization of physical interactions of the putative transcriptional adaptor, ADA2, with acidic activation domains and TATA-binding protein. *J Biol Chem* 270: 19337-19344, 1995.
18. **Barlev NA, Liu L, Chehab NH, Mansfield K, Harris KG, Halazonetis TD, and Berger SL.** Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol Cell* 8: 1243-1254, 2001.
19. **Bernards A and Hariharan IK.** Of flies and men--studying human disease in Drosophila. *Curr Opin Genet Dev* 11: 274-278, 2001.
20. **Bhaumik SR and Green MR.** Interaction of Gal4p with components of transcription machinery in vivo. *Methods Enzymol* 370: 445-454, 2003.
21. **Bienz-Tadmor B, Zakut-Houri R, Libresco S, Givol D, and Oren M.** The 5' region of the p53 gene: evolutionary conservation and evidence for a negative regulatory element. *Embo J* 4: 3209-3213, 1985.
22. **Bienz B, Zakut-Houri R, Givol D, and Oren M.** Analysis of the gene coding for the murine cellular tumour antigen p53. *Embo J* 3: 2179-2183, 1984.
23. **Bodai L, Pardi, N., Ujfaludi, Z., Bereczki, O., Komonyi, O., Balint, E., Boros, IM.** DAXX-like protein of Drosophila interacts with Dmp53, and effects longevity and *Ark* mRNA level, 2007.
24. **Boehrer S, Nowak D, Schaaf S, Bergmann M, Brieger A, Hoelzer D, Mitrou PS, Weidmann E, and Chow KU.** In malignant myeloid cells expression of Daxx downregulates expression of p53 and of the inhibitors of apoptosis proteins. *Hematol J* 5: 513-518, 2004.
25. **Boulton SJ, Brook A, Staehling-Hampton K, Heitzler P, and Dyson N.** A role for Ebi in neuronal cell cycle control. *Embo J* 19: 5376-5386, 2000.
26. **Broadus J, McCabe JR, Endrizzi B, Thummel CS, and Woodard CT.** The Drosophila beta FTZ-F1 orphan nuclear receptor provides competence for stage-specific responses to the steroid hormone ecdysone. *Mol Cell* 3: 143-149, 1999.
27. **Brodsky MH, Nordstrom W, Tsang G, Kwan E, Rubin GM, and Abrams JM.** Drosophila p53 binds a damage response element at the reaper locus. *Cell* 101: 103-113, 2000.
28. **Brodsky MH, Weinert BT, Tsang G, Rong YS, McGinnis NM, Golic KG, Rio DC, and Rubin GM.** Drosophila melanogaster MNK/Chk2 and p53 regulate multiple DNA repair and apoptotic pathways following DNA damage. *Mol Cell Biol* 24: 1219-1231, 2004.
29. **Brooks CL and Gu W.** p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Mol Cell* 21: 307-315, 2006.
30. **Candau R, Scolnick DM, Darpino P, Ying CY, Halazonetis TD, and Berger SL.** Two tandem and independent sub-activation domains in the amino terminus of p53 require the adaptor complex for activity. *Oncogene* 15: 807-816, 1997.

31. **Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB, and Siliciano JD.** Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 281: 1677-1679, 1998.
32. **Chang HY, Nishitoh H, Yang X, Ichijo H, and Baltimore D.** Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. *Science* 281: 1860-1863, 1998.
33. **Chen J, Marechal V, and Levine AJ.** Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol Cell Biol* 13: 4107-4114, 1993.
34. **Crawford LV, Pim DC, Gurney EG, Goodfellow P, and Taylor-Papadimitriou J.** Detection of a common feature in several human tumor cell lines--a 53,000-dalton protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 41-45, 1981.
35. **Dang CV and Lee WM.** Nuclear and nucleolar targeting sequences of c-erb-A, c-myc, N-myc, p53, HSP70, and HIV tat proteins. *J Biol Chem* 264: 18019-18023, 1989.
36. **de Laat WL, Jaspers NG, and Hoeijmakers JH.** Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev* 13: 768-785, 1999.
37. **DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, and Old LJ.** Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 2420-2424, 1979.
38. **Dippold WG, Jay G, DeLeo AB, Houry G, and Old LJ.** p53 transformation-related protein: detection by monoclonal antibody in mouse and human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 1695-1699, 1981.
39. **Dong X, Tsuda L, Zavitz KH, Lin M, Li S, Carthew RW, and Zipursky SL.** ebi regulates epidermal growth factor receptor signaling pathways in Drosophila. *Genes Dev* 13: 954-965, 1999.
40. **el-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, and Vogelstein B.** Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* 1: 45-49, 1992.
41. **el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, and Vogelstein B.** WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75: 817-825, 1993.
42. **Emelyanov AV, Kovac CR, Sepulveda MA, and Birshtein BK.** The interaction of Pax5 (BSAP) with Daxx can result in transcriptional activation in B cells. *J Biol Chem* 277: 11156-11164, 2002.
43. **Farmer G, Bargonetti J, Zhu H, Friedman P, Prywes R, and Prives C.** Wild-type p53 activates transcription in vitro. *Nature* 358: 83-86, 1992.
44. **Fields S and Jang SK.** Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* 249: 1046-1049, 1990.
45. **Finlay CA, Hinds PW, and Levine AJ.** The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57: 1083-1093, 1989.
46. **Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, and Levine AJ.** Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol* 8: 531-539, 1988.
47. **Flaman JM, Waridel F, Estreicher A, Vannier A, Limacher JM, Gilbert D, Iggo R, and Frebourg T.** The human tumour suppressor gene p53 is alternatively spliced in normal cells. *Oncogene* 12: 813-818, 1996.
48. **FlyBase C, Swiss-Prot, P. M., InterPro, P. M.** Gene Ontology annotation in FlyBase through association of InterPro records with GO terms. www.flybase.org, 2004.
49. **Fortini ME, Skupski MP, Boguski MS, and Hariharan IK.** A survey of human disease gene counterparts in the Drosophila genome. *J Cell Biol* 150: F23-30, 2000.

50. **Funk WD, Pak DT, Karas RH, Wright WE, and Shay JW.** A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Mol Cell Biol* 12: 2866-2871, 1992.
51. **Giannakakou P, Sackett DL, Ward Y, Webster KR, Blagosklonny MV, and Fojo T.** p53 is associated with cellular microtubules and is transported to the nucleus by dynein. *Nat Cell Biol* 2: 709-717, 2000.
52. **Ginsberg D, Mechta F, Yaniv M, and Oren M.** Wild-type p53 can down-modulate the activity of various promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 9979-9983, 1991.
53. **Gostissa M, Morelli M, Mantovani F, Guida E, Piazza S, Collavin L, Brancolini C, Schneider C, and Del Sal G.** The transcriptional repressor hDaxx potentiates p53-dependent apoptosis. *J Biol Chem* 279: 48013-48023, 2004.
54. **Gu W and Roeder RG.** Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90: 595-606, 1997.
55. **Guelman S, Suganuma T, Florens L, Swanson SK, Kiesecker CL, Kusch T, Anderson S, Yates JR, 3rd, Washburn MP, Abmayr SM, and Workman JL.** Host cell factor and an uncharacterized SANT domain protein are stable components of ATAC, a novel dAda2A/dGcn5-containing histone acetyltransferase complex in *Drosophila*. *Mol Cell Biol* 26: 871-882, 2006.
56. **Gunawardane RN, Martin OC, Cao K, Zhang L, Dej K, Iwamatsu A, and Zheng Y.** Characterization and reconstitution of *Drosophila* gamma-tubulin ring complex subunits. *J Cell Biol* 151: 1513-1524, 2000.
57. **Hanawalt PC.** Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene* 21: 8949-8956, 2002.
58. **Harris N, Brill E, Shohat O, Prokocimer M, Wolf D, Arai N, and Rotter V.** Molecular basis for heterogeneity of the human p53 protein. *Mol Cell Biol* 6: 4650-4656, 1986.
59. **Hekmat-Nejad M, You Z, Yee MC, Newport JW, and Cimprich KA.** Xenopus ATR is a replication-dependent chromatin-binding protein required for the DNA replication checkpoint. *Curr Biol* 10: 1565-1573, 2000.
60. **Hollenbach AD, McPherson CJ, Mientjes EJ, Iyengar R, and Grosveld G.** Daxx and histone deacetylase II associate with chromatin through an interaction with core histones and the chromatin-associated protein Dek. *J Cell Sci* 115: 3319-3330, 2002.
61. **Isoe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, and Croce CM.** Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* 320: 84-85, 1986.
62. **Ito A, Kawaguchi Y, Lai CH, Kovacs JJ, Higashimoto Y, Appella E, and Yao TP.** MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation. *Embo J* 21: 6236-6245, 2002.
63. **Ivanovska I, Khandan T, Ito T, and Orr-Weaver TL.** A histone code in meiosis: the histone kinase, NHK-1, is required for proper chromosomal architecture in *Drosophila* oocytes. *Genes Dev* 19: 2571-2582, 2005.
64. **Iwabuchi K, Li B, Bartel P, and Fields S.** Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* 8: 1693-1696, 1993.
65. **Jassim OW, Fink JL, and Cagan RL.** Dmp53 protects the *Drosophila* retina during a developmentally regulated DNA damage response. *Embo J* 22: 5622-5632, 2003.
66. **Jay G, DeLeo AB, Appella E, Dubois GC, Law LW, Khoury G, and Old LJ.** A common transformation-related protein in murine sarcomas and leukemias. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 44 Pt 1: 659-664, 1980.
67. **Jenkins JR, Chumakov P, Addison C, Sturzbecher HW, and Wade-Evans A.** Two distinct regions of the murine p53 primary amino acid sequence are implicated in stable complex formation with simian virus 40 T antigen. *J Virol* 62: 3903-3906, 1988.

68. **Jin S, Martinek S, Joo WS, Wortman JR, Mirkovic N, Sali A, Yandell MD, Pavletich NP, Young MW, and Levine AJ.** Identification and characterization of a p53 homologue in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 7301-7306, 2000.
69. **Johnson MR, Wang K, Smith JB, Heslin MJ, and Diasio RB.** Quantitation of dihydropyrimidine dehydrogenase expression by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 278: 175-184, 2000.
70. **Kapoor M and Lozano G.** Functional activation of p53 via phosphorylation following DNA damage by UV but not gamma radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 2834-2837, 1998.
71. **Kern SE, Pietenpol JA, Thiagalingam S, Seymour A, Kinzler KW, and Vogelstein B.** Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science* 256: 827-830, 1992.
72. **Knights CD, Catania J, Di Giovanni S, Muratoglu S, Perez R, Swartzbeck A, Quong AA, Zhang X, Beerman T, Pestell RG, and Avantaggiati ML.** Distinct p53 acetylation cassettes differentially influence gene-expression patterns and cell fate. *J Cell Biol* 173: 533-544, 2006.
73. **Kraiss S, Quaiser A, Oren M, and Montenarh M.** Oligomerization of oncoprotein p53. *J Virol* 62: 4737-4744, 1988.
74. **Kurada P and White K.** Ras promotes cell survival in *Drosophila* by downregulating hid expression. *Cell* 95: 319-329, 1998.
75. **Kusch T, Guelman S, Abmayr SM, and Workman JL.** Two *Drosophila* Ada2 homologues function in different multiprotein complexes. *Mol Cell Biol* 23: 3305-3319, 2003.
76. **Lane DP and Crawford LV.** T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278: 261-263, 1979.
77. **Latonen L and Laiho M.** Cellular UV damage responses--functions of tumor suppressor p53. *Biochim Biophys Acta* 1755: 71-89, 2005.
78. **Lee CY, Clough EA, Yellon P, Teslovich TM, Stephan DA, and Baehrecke EH.** Genome-wide analyses of steroid- and radiation-triggered programmed cell death in *Drosophila*. *Curr Biol* 13: 350-357, 2003.
79. **Lee JH, Lee E, Park J, Kim E, Kim J, and Chung J.** In vivo p53 function is indispensable for DNA damage-induced apoptotic signaling in *Drosophila*. *FEBS Lett* 550: 5-10, 2003.
80. **Lee S, Elenbaas B, Levine A, and Griffith J.** p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell* 81: 1013-1020, 1995.
81. **Leng RP, Lin Y, Ma W, Wu H, Lemmers B, Chung S, Parant JM, Lozano G, Hakem R, and Benchimol S.** Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation. *Cell* 112: 779-791, 2003.
82. **Leppard K, Totty N, Waterfield M, Harlow E, Jenkins J, and Crawford L.** Purification and partial amino acid sequence analysis of the cellular tumour antigen, p53, from mouse SV40-transformed cells. *Embo J* 2: 1993-1999, 1983.
83. **Levine AJ.** p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323-331, 1997.
84. **Li H, Leo C, Zhu J, Wu X, O'Neil J, Park EJ, and Chen JD.** Sequestration and inhibition of Daxx-mediated transcriptional repression by PML. *Mol Cell Biol* 20: 1784-1796, 2000.
85. **Li X, Scuderi A, Letsou A, and Virshup DM.** B56-associated protein phosphatase 2A is required for survival and protects from apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 22: 3674-3684, 2002.

86. **Linzer DI and Levine AJ.** Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17: 43-52, 1979.
87. **Liu L, Scolnick DM, Trievel RC, Zhang HB, Marmorstein R, Halazonetis TD, and Berger SL.** p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 19: 1202-1209, 1999.
88. **Mack DH, Vartikar J, Pipas JM, and Laimins LA.** Specific repression of TATA-mediated but not initiator-mediated transcription by wild-type p53. *Nature* 363: 281-283, 1993.
89. **Marchenko ND, Zaika A, and Moll UM.** Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem* 275: 16202-16212, 2000.
90. **Marcus GA, Silverman N, Berger SL, Horiuchi J, and Guarente L.** Functional similarity and physical association between GCN5 and ADA2: putative transcriptional adaptors. *Embo J* 13: 4807-4815, 1994.
91. **Martin DN and Baehrecke EH.** Caspases function in autophagic programmed cell death in Drosophila. *Development* 131: 275-284, 2004.
92. **Mathonnet G, Leger C, Desnoyers J, Drouin R, Therrien JP, and Drobetsky EA.** UV wavelength-dependent regulation of transcription-coupled nucleotide excision repair in p53-deficient human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7219-7224, 2003.
93. **Matlashewski G, Lamb P, Pim D, Peacock J, Crawford L, and Benchimol S.** Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *Embo J* 3: 3257-3262, 1984.
94. **Matsuzawa SI and Reed JC.** Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses. *Mol Cell* 7: 915-926, 2001.
95. **McBride OW, Merry D, and Givol D.** The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 130-134, 1986.
96. **McKay BC, Chen F, Perumalswami CR, Zhang F, and Ljungman M.** The tumor suppressor p53 can both stimulate and inhibit ultraviolet light-induced apoptosis. *Mol Biol Cell* 11: 2543-2551, 2000.
97. **McKay BC, Stubbert LJ, Fowler CC, Smith JM, Cardamore RA, and Spronck JC.** Regulation of ultraviolet light-induced gene expression by gene size. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6582-6586, 2004.
98. **Mercer WE, Nelson D, DeLeo AB, Old LJ, and Baserga R.** Microinjection of monoclonal antibody to protein p53 inhibits serum-induced DNA synthesis in 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 6309-6312, 1982.
99. **Michael D and Oren M.** The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Semin Cancer Biol* 13: 49-58, 2003.
100. **Michaelson JS, Bader D, Kuo F, Kozak C, and Leder P.** Loss of Daxx, a promiscuously interacting protein, results in extensive apoptosis in early mouse development. *Genes Dev* 13: 1918-1923, 1999.
101. **Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, and Moll UM.** p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 11: 577-590, 2003.
102. **Miller C, Mohandas T, Wolf D, Prokocimer M, Rotter V, and Koeffler HP.** Human p53 gene localized to short arm of chromosome 17. *Nature* 319: 783-784, 1986.
103. **Milner J and Milner S.** SV40-53K antigen: a possible role for 53K in normal cells. *Virology* 112: 785-788, 1981.

104. **Morey M, Corominas M, and Serras F.** DIAP1 suppresses ROS-induced apoptosis caused by impairment of the *selD/sps1* homolog in *Drosophila*. *J Cell Sci* 116: 4597-4604, 2003.
105. **Mounkes LC, Jones RS, Liang BC, Gelbart W, and Fuller MT.** A *Drosophila* model for xeroderma pigmentosum and Cockayne's syndrome: haywire encodes the fly homolog of ERCC3, a human excision repair gene. *Cell* 71: 925-937, 1992.
106. **Muratoglu S, Georgieva S, Papai G, Scheer E, Enunlu I, Komonyi O, Cserpan I, Lebedeva L, Nabirochkina E, Udvardy A, Tora L, and Boros I.** Two different *Drosophila* ADA2 homologues are present in distinct GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes. *Mol Cell Biol* 23: 306-321, 2003.
107. **Murphy M, Ahn J, Walker KK, Hoffman WH, Evans RM, Levine AJ, and George DL.** Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev* 13: 2490-2501, 1999.
108. **Nakano K, Balint E, Ashcroft M, and Vousden KH.** A ribonucleotide reductase gene is a transcriptional target of p53 and p73. *Oncogene* 19: 4283-4289, 2000.
109. **Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, Nishimori H, Tamai K, Tokino T, Nakamura Y, and Taya Y.** p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* 102: 849-862, 2000.
110. **Ollmann M, Young LM, Di Como CJ, Karim F, Belvin M, Robertson S, Whittaker K, Demsky M, Fisher WW, Buchman A, Duyk G, Friedman L, Prives C, and Kopczynski C.** *Drosophila* p53 is a structural and functional homolog of the tumor suppressor p53. *Cell* 101: 91-101, 2000.
111. **Oren M and Levine AJ.** Molecular cloning of a cDNA specific for the murine p53 cellular tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 56-59, 1983.
112. **Pankotai T, Komonyi O, Bodai L, Ujfaludi Z, Muratoglu S, Ciurciu A, Tora L, Szabad J, and Boros I.** The homologous *Drosophila* transcriptional adaptors ADA2a and ADA2b are both required for normal development but have different functions. *Mol Cell Biol* 25: 8215-8227, 2005.
113. **Pavletich NP, Chambers KA, and Pabo CO.** The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes Dev* 7: 2556-2564, 1993.
114. **Perlman R, Schiemann WP, Brooks MW, Lodish HF, and Weinberg RA.** TGF-beta-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *Nat Cell Biol* 3: 708-714, 2001.
115. **Peters M, DeLuca C, Hirao A, Stambolic V, Potter J, Zhou L, Liepa J, Snow B, Arya S, Wong J, Bouchard D, Binari R, Manoukian AS, and Mak TW.** Chk2 regulates irradiation-induced, p53-mediated apoptosis in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 11305-11310, 2002.
116. **Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, and Werner T.** MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res* 23: 4878-4884, 1995.
117. **Reynaud E, Lomeli H, Vazquez M, and Zurita M.** The *Drosophila melanogaster* homologue of the Xeroderma pigmentosum D gene product is located in euchromatic regions and has a dynamic response to UV light-induced lesions in polytene chromosomes. *Mol Biol Cell* 10: 1191-1203, 1999.
118. **Rozen S and Skaletsky H.** Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132: 365-386, 2000.
119. **Rubbi CP and Milner J.** p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. *Embo J* 22: 975-986, 2003.

120. **Ryan KM, Ernst MK, Rice NR, and Vousden KH.** Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. *Nature* 404: 892-897, 2000.
121. **Sakaguchi K, Herrera JE, Saito S, Miki T, Bustin M, Vassilev A, Anderson CW, and Appella E.** DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev* 12: 2831-2841, 1998.
122. **Salomoni P and Khelifi AF.** Daxx: death or survival protein? *Trends Cell Biol* 16: 97-104, 2006.
123. **Silverman N, Agapite J, and Guarente L.** Yeast ADA2 protein binds to the VP16 protein activation domain and activates transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 11665-11668, 1994.
124. **Smith ML, Chen IT, Zhan Q, Bae I, Chen CY, Gilmer TM, Kastan MB, O'Connor PM, and Fornace AJ, Jr.** Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* 266: 1376-1380, 1994.
125. **Sogame N, Kim M, and Abrams JM.** Drosophila p53 preserves genomic stability by regulating cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4696-4701, 2003.
126. **Srinivasan R, Roth JA, and Maxwell SA.** Sequence-specific interaction of a conformational domain of p53 with DNA. *Cancer Res* 53: 5361-5364, 1993.
127. **Sutcliffe JE and Brehm A.** Of flies and men; p53, a tumour suppressor. *FEBS Lett* 567: 86-91, 2004.
128. **Tanaka H, Arakawa H, Yamaguchi T, Shiraishi K, Fukuda S, Matsui K, Takei Y, and Nakamura Y.** A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* 404: 42-49, 2000.
129. **Van Hoof C and Goris J.** Phosphatases in apoptosis: to be or not to be, PP2A is in the heart of the question. *Biochim Biophys Acta* 1640: 97-104, 2003.
130. **Vanolst L, Fromental-Ramain C, and Ramain P.** Toutatis, a TIP5-related protein, positively regulates Pannier function during Drosophila neural development. *Development* 132: 4327-4338, 2005.
131. **Venot C, Maratrat M, Dureuil C, Conseiller E, Bracco L, and Debussche L.** The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression. *Embo J* 17: 4668-4679, 1998.
132. **Vousden KH.** p53: death star. *Cell* 103: 691-694, 2000.
133. **Walker KK and Levine AJ.** Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 15335-15340, 1996.
134. **Wang P, Reed M, Wang Y, Mayr G, Stenger JE, Anderson ME, Schwedes JF, and Tegtmeyer P.** p53 domains: structure, oligomerization, and transformation. *Mol Cell Biol* 14: 5182-5191, 1994.
135. **Wang T, Kobayashi T, Takimoto R, Denes AE, Snyder EL, el-Deiry WS, and Brachmann RK.** hADA3 is required for p53 activity. *Embo J* 20: 6404-6413, 2001.
136. **Wang XW, Yeh H, Schaeffer L, Roy R, Moncollin V, Egly JM, Wang Z, Freidberg EC, Evans MK, Taffe BG, and et al.** p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity. *Nat Genet* 10: 188-195, 1995.
137. **Wang Y, Reed M, Wang P, Stenger JE, Mayr G, Anderson ME, Schwedes JF, and Tegtmeyer P.** p53 domains: identification and characterization of two autonomous DNA-binding regions. *Genes Dev* 7: 2575-2586, 1993.
138. **Wu X, Bayle JH, Olson D, and Levine AJ.** The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 7: 1126-1132, 1993.
139. **Xu J, Xin S, and Du W.** Drosophila Chk2 is required for DNA damage-mediated cell cycle arrest and apoptosis. *FEBS Lett* 508: 394-398, 2001.

140. **Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY, and Baltimore D.** Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* 89: 1067-1076, 1997.
141. **Zhao R, Gish K, Murphy M, Yin Y, Notterman D, Hoffman WH, Tom E, Mack DH, and Levine AJ.** Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev* 14: 981-993, 2000.
142. **Zhou L and Steller H.** Distinct pathways mediate UV-induced apoptosis in *Drosophila* embryos. *Dev Cell* 4: 599-605, 2003.
143. **Zhu J, Zhou W, Jiang J, and Chen X.** Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for mediating apoptosis. *J Biol Chem* 273: 13030-13036, 1998.

10. Rövidítések jegyzéke

AD: aktivációs szubdomén
ADA2: alteration/deficiency in activation 2
ADA3: alteration/deficiency in activation 3
ARF: Alternative Reading Frame
Ark: Apaf-1-related killer
ASK1: apoptosis signal-kinase 1
ATAC: ADA two A Containing
ATM: Ataxia-Telangiectasia-Mutated
ATR: Ataxia-Telangiectasia-and-Rad3-Related
ball: ballchen
CBP: CREB binding protein
Cdk: ciklin dependens kináz
CDKN2A/p19: Ciklin-Dependens Kináz Inhibítor 2A/p19
Chk1: checkpoint kinase 1
Chk2: checkpoint kinase 2
Ct: cycle treshold
Daxx: death domain associated factor 6
DLP: Daxx like protein
DmChk1: *Drosophila melanogaster* checkpoint kinase 1
DmChk2: *Drosophila melanogaster* checkpoint kinase 2
Dmp53: *Drosophila melanogaster* p53
EGFR: epidermális növekedési faktor receptor
ftz-f1: fushi tarazu factor 1
Gadd45: growth arrest- and DNA damage inducible 45
GCN5: general control of amino-acid synthesis 5
GGR: Global Genome Repair
HAT: hiszton acetiltranszferáz
HCF: host cell factor
HDAC1: hiszton deacetiláz 1
hid: head involution defective/wrinkled

JNK1: Jun N-terminal kinase 1
l(1)dd4: lethal (1) disc degenerate 4
LD₅₀: fél letális dózis
MDM2: mouse double minute 2
MNK: maternal nuclear kinase
NER: Nucleotide Excision Repair
NHK-1: nucleosomal histone kinase-1
NLS: sejtmagi lokalizációs szignál
PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen
PE: precíz excízió
QPCR: kvantitatív real time PCR
rho-1: rhomboid-1
RPA: replication protein A
rpr: reaper
TBP: TATA Binding Protein
TCR: Transcription Coupled Repair
TFIIH: Transzkripció faktor II H alegysége
TGF-β: transzformáló növekedési faktor-β
tou: toutatis
TRRAP: transformation/transcription domain-associated protein
XPC: xeroderma pigmentosum C

10. Függelék

1. táblázat: A DNS microarray kísérletben Dmp53-függő transzkripció változást mutatott gének listája.

| UVC hatására Dmp53-függő indukciót mutató gének | | |
|---|-------------------------------|--------------------------------------|
| Gén neve ^a | Relatív indukció ^b | Funkció ^a |
| CG11982 | 4,51 | RING finger ubiquitin ligáz |
| sas | 3,57 | receptor aktivitás |
| EG:8D8.6 | 3,04 | GCN5-höz hasonló N-acetyl transferáz |
| m | 3,02 | kutikula struktúrális alkotóelem |
| Grip75 | 2,98 | mikrotubulus kötés |
| CG13953 | 2,63 | nincs információ |
| ballchen | 2,62 | hiszton threonin kináz |
| CG4351 | 2,48 | nincs információ |
| CG11848 | 2,41 | nincs információ |
| CG2839 | 2,39 | cukor kötés |
| CG14446 | 2,39 | nincs információ |
| CG8319 | 2,29 | transzkripciós faktor |
| CG17390 | 2,28 | nukleinsav és Zn-ion kötés |
| CG10680 | 2,28 | nincs információ |
| CG2187 | 2,27 | Na-jodid transzporter |
| CT32505 | 2,27 | nincs információ |
| CG13675 | 2,24 | nincs információ |
| CG7552 | 2,22 | nincs információ |
| eEF1delta | 2,20 | guanil kicserélő faktor |
| CG15572 | 2,16 | nincs információ |
| CG5620 | 2,15 | transzkripciós faktor |
| TM4SF | 2,14 | transmembrane protein |
| D1 | 2,14 | kromoszómális fehérje |
| CG10175 | 2,11 | karboxil-észteráz aktivitás |
| CG15507 | 2,10 | transzkripciós faktor |
| cranky | 2,07 | transzkripciós faktor |
| CG13087 | 2,05 | nincs információ |
| ftz-fl | 2,05 | transzkripciós faktor |
| rho | 2,01 | szerin típusú endopeptidáz |
| CG14532 | 1,99 | nincs információ |
| l(1)dd4 | 1,99 | mikrotubulus kötés |
| CG12870 | 1,99 | mRNS kötés |
| NADH dehydrogenase subunit 1 | 1,98 | NADH dehidrogenáz |
| CG31169 | 1,97 | NAD-függő glicerol-3-P dehidrogenáz |
| CG1545 | 1,95 | nincs információ |
| CG12974 | 1,94 | nincs információ |
| CG32271 | 1,93 | szerin típusú endopeptidáz |
| CG7305 | 1,93 | kis GTPáz regulátor |
| CG33174 | 1,92 | triacyl-glicerol lipáz aktivitás |
| Cam | 1,90 | kalmodulin, Ca-ion kötés |

UVC hatására Dmp53-függő indukciót mutató gének

| Gén neve ^a | Relatív indukció ^b | Funkció ^a |
|-----------------------|-------------------------------|---------------------------------------|
| CG7497 | 1,89 | G-protein kapcsolt receptor aktivitás |
| CG6717 | 1,89 | szerin típusú endopeptidáz |
| Act5C | 1,87 | aktin |
| CG9746 | 1,87 | protein Ser/Thr kináz |
| PP2A-B' | 1,87 | 2a típusú protein foszfatáz regulátor |
| Ptp61F | 1,87 | protein tirozin foszfatáz |
| sda | 1,87 | Zn-ion kötés |
| l(2)k09913 | 1,85 | nincs információ |
| CT33745 | 1,82 | nincs információ |
| Cyp314a1 | 1,82 | ekdizon-20-monooxygenáz aktivitás |
| tou | 1,82 | kromatin kötés |
| CG9699 | 1,81 | GTPáz aktivitás |
| ebi | 1,81 | GTP kötés |
| CG10970 | 1,81 | acil-foszfatáz |
| CG5756 | 1,80 | kitin kötés |

UVC hatására Dmp53-függő repressziót mutató gének

| Gén neve ^a | Relatív indukció ^b | Funkció ^a |
|-----------------------|-------------------------------|---|
| na | 0,36 | kation csatorna |
| CG13159 | 0,35 | nincs információ |
| BG:DS09218.5 | 0,45 | juvenilis hormon sav metil-transzferáz |
| Dgp-1 | 0,46 | GTP kötés, - hidroláz |
| CG5115 | 0,47 | nincs információ |
| Paip2 | 0,47 | polyA kötő proteinnel kölcsönható protein |
| CG32699 | 0,51 | acil-transzferáz |
| Neu5Ac | 0,52 | N-acetil-neuraminsan foszfát szintetáz |
| CG7876 | 0,52 | kitin kötés |
| CG4848 | 0,52 | nincs információ |
| mago | 0,52 | microtubulus citoskeleton organizáció és biogenezis |
| CG10555 | 0,53 | nincs információ |
| CG12912 | 0,54 | nincs információ |
| CG7943 | 0,54 | carrier aktivitás |
| CG8192 | 0,55 | nincs információ |
| CG17912 | 0,55 | DNS és Zn-ion kötés |

^a FlyBase szerint

^b a két mikroarray-n detektált relatív expresszió változások átlaga

12. Publikációs lista

*** Ujfaludi Z, Boros IM, Bálint E.**

Different sets of genes are activated by p53 upon UV or ionizing radiation in *Drosophila melanogaster*.

Acta Biol Hung. 2007;58 Suppl:65-79. IF:0,688

Bors A, Ribiczey P, Köblös G, Brózik A, Ujfaludi Z, Magócsi M, Váradi A, Tordai A, Kovács T, Arányi T.

External cell control polymerase chain reaction: replacing internal standards with an unbiased strategy for quantitative polymerase chain reaction normalization.

Anal Biochem. 2008 Jan 15;372(2):261-3. IF:2,948

*** Bodai L, Pardi N, Ujfaludi Z, Bereczki O, Komonyi O, Balint E, Boros IM.**

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

J Biol Chem. 2007 Dec 14;282(50):36386-93. IF:5,808

Szabó A, Pál M, Deák P, Kiss P, Ujfaludi Z, Pankotai T, Lipinszki Z, Udvardy A.

Molecular characterization of the Rpt1/p48B ATPase subunit of the *Drosophila melanogaster* 26S proteasome.

Mol Genet Genomics. 2007 Jul;278(1):17-29. IF:2,552

*** Pankotai T, Komonyi O, Bodai L, Ujfaludi Z, Muratoglu S, Ciurciu A, Tora L, Szabad J, Boros I.**

The homologous *Drosophila* transcriptional adaptors ADA2a and ADA2b are both required for normal development but have different functions.

Mol Cell Biol. 2005 Sep;25(18):8215-27. IF:6,773

Citációk száma: 10

Fogelgren B, Polgár N, Szauter KM, Ujfaludi Z, Laczkó R, Fong KS, Csiszar K.

Cellular fibronectin binds to lysyl oxidase with high affinity and is critical for its proteolytic activation.

J Biol Chem. 2005 Jul 1;280(26):24690-7. IF: 5,808

Citációk száma: 10

Molnar J, Ujfaludi Z, Fong SF, Bollinger JA, Waro G, Fogelgren B, Dooley DM, Mink M, Csiszar K.

Drosophila lysyl oxidases Dmlox1-1 and Dmlox1-2 are differentially expressed and the active DmLOXL-1 influences gene expression and development.

J Biol Chem. 2005 Jun 17;280(24):22977-85. IF:5,808

Citációk száma: 4

*-gal jelölve a Doktori értekezésben felhasznált publikációk