

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

## A *Drosophila* p53 működésének vizsgálata

Újfaludi Zsuzsanna



Témavezetők:  
Dr. Bálint Éva  
Dr. Boros Imre Miklós

Szegedi Tudományegyetem  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

Szeged  
2008

## Bevezetés

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 hatások – 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, osztódó sejtekben a p53 fehérje koncentrációja nagyon alacsony, gyakran a fehérje kimutathatatlan, rövid félélettidejének 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 leállítását, 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 magának a p53-nak a 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 emberi 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 biokémiaiag 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 indukációjában 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 sejtihal 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.

### **Célkitűzések**

1. A Dmp53 modell alkalmazásával új ismeretek szerzése a p53 tumor szuppresszor genom stabilitásában, sejtciklus szabályozásában és apoptózisban játszott szerepéről
2. Különböző genotoxikus ágensek Dmp53-ra kifejtett hatásának vizsgálata, illetve egy ennek analizésére alkalmas kísérleti rendszer beállítása
3. A csoportunk által azonosított, a Dmp53-mal kölcsönható fehérjék, illetve a dADA2a tartalmú hiszton acetil transferáz komplex (ATAC) és a Dmp53 közti kapcsolat következményeinek vizsgálata

### **Alkalmazott módszerek**

- DNS károsodás kiváltása Drosophila lárvákban UVC és röntgen sugárzással
- Drosophila lárvák UVC fél letális dózisének meghatározása
- Össz RNS izolálás
- Egyes szálú cDNS szintézis
- Kvantitatív real time PCR
- Transzkriptom vizsgálat DNS microarray módszerrel
- Transzkripció faktor kötőhelyek analízise bioinformatikai módszerrel
- Rekombináns DNS technikák: polimeráz láncreakció (PCR), restrikció emésztés, ligálás, DNS tisztítás
- Fehérje-fehérje kölcsönhatás kimutatás élesztő két hibrid módszerrel

- Lárvális szövetekben apoptózis kimutatás acridine orange festéssel
- Genetikai interakciós vizsgálat Drosophilában
- Fehérje túltermelés Drosophilában hő sokk driverrel

### **Eredmények**

#### **A Dmp53 null mutáns ecetmuslicák fokozottan UVC érzékenyek**

A humán p53-hoz hasonlóan a Dmp53-nak 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* mutáns ecetmuslicák fokozottan érzékenyek az ionizáló sugárzásra és genomi instabilitást mutatnak. A *Dmp53* mutáns harmadik stádiumú lárvák UVC sugárzásra való érzékenységét vizsgálva – hasonlóan az ionizáló sugárzáshoz – az állatok fokozott érzékenységet mutattak, fél letális dózisuk a vad típusú Drosophilákhoz képest az ötödére csökkent. 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.

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

A Dmp53 – emlős homológjához hasonlóan – transzkripció aktivátorként viselkedik, működése tehát jól nyomon követhető célgénjei transzkripciójának változását vizsgálva DNS károsodást követően. Drosophilában több apoptózisban szerepet játszó gén ismert, melyek Dmp53-mal való kapcsolatáról viszonylag kevés ismerettel rendelkeznek. A *hid*, *Ark* és *reaper* pro-apoptotikus gének illetve a Dmp53 kapcsolatát vizsgáltam különböző DNS károsító hatásokat – pl.: UVC, röntgen sugárzás – követően. Mindhárom pro-

-apoptotikus gén a Dmp53 jelenlététől függő expressziós változást mutatott. Különböző jellegű DNS károsodások kiváltásakor a *hid*, *Ark* és *reaper* Dmp53 általi aktivációjában eltéréseket tapasztaltam. 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 függött az örökítő anyagban bekövetkezett károsodás jellegétől.

#### **UVC sugárzás hatására számos gén expressziója a Dmp53-tól függően indukálódik**

Az UVC sugárzás hatására bekövetkező Dmp53-függő sejtválaszok részletes tanulmányozásához új, Dmp53 által aktiválódó gének azonosítására alkalmas vizsgálatot végeztem. DNS microarray kísérletben 71 gén mutatott UVC kezelés hatására bekövetkező, Dmp53 jelenlététől függő expressziós változást. Ezek közül 55 transzkripciója megemelkedett 16 gén kifejeződése pedig csökkent. Az eredmények megerősítését egy független kísérleti rendszerrel, QPCR-al végeztem. Ehhez a vizsgálatához azokat a géneket választottam, amelyek a DNS károsodások után kialakuló Dmp53 által irányított sejt válaszokkal – mint apoptózis, DNS javítás – kapcsolatban lehetnek. 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 transzkripciós célgéneknek” tekintettem.

#### **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, majd UVC és ionizáló sugárzás hatására bekövetkező expresszió változásuk alapján a Dmp53 célgéneket két csoportba soroltam. Az *Ark*-hoz hasonlóan a *tou*, *ftz-f1*, *ebi*, *CG5620* és *CG11982* gének ionizáló sugárzás okozta DNS károsodások hatására nem indukálódtak sem *w<sup>1118</sup>*, sem *Dmp53* mutáns lárvákban. 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 ugyanis mind UVC, mind ionizáló sugárzást követően a Dmp53 jelenlétéhez köthetően szignifikánsan indukálódtak. Az adatok szerint az újonnan azonosított, lehetséges Dmp53 célgének esetében is a *hid*, *Ark* és *reaper*, pro-apoptotikus géneknél tapasztalható 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.

#### **A Dmp53 jelenlétében indukálódó gének nem tartalmaznak p53 konszenzus kötőhelyeket**

A *Drosophila* p53 képes az emlős p53 kötőhelyéhez kapcsolódni *in vitro*, és *in vivo* riportter rendszerben az ahhoz közeli promoterről a transzkripciót aktiválni. A *Drosophila* p53 konszenzus kötőhely azonban még nem ismert. Az általam azonosított UVC hatására indukálódó gének Dmp53 általi transzkripciós szabályozása a Dmp53-t kötő szekvenciákon keresztül is megvalósulhat. E feltevés vizsgálatához a 11 fent említett lehetséges Dmp53 célgén promóter régióiban transzkripciós faktor kötőhely analízist végeztem bioinformatikai módszerrel. A promóter szekvenciákban nem találtam szimmetrikus, az emlős konszenzusra jellemző kötőhelyet. Nem valószínű, hogy

ezek a gének a Dmp53 indirekt targetjei és esetleg egy másik, p53 által korán aktivált transzkripciós faktor indukálta kifejeződésüket, mivel aktivációjukat röviddel az UVC kezelés után már ki tudtam mutatni. A Dmp53 esetleg nem konszenzus kötőhelyen keresztül szabályozta expressziójukat.

#### **A Daxx Drosophila homológja, a DLP, a Dmp53 működését szuppressálja és részt vesz az Ark alap expressziójának szabályozásában**

Az emlős Daxx fehérje az apoptotikus válasz egyik regulátora, más szabályzó faktorokkal kölcsönhatásban transzkripciót és szignál transzdukciós utakat irányít. A humán homológokhoz hasonlóan a Drosophila p53 és DLP közvetlen kölcsönhatásban állnak egymással. A két fehérje humán homológjaiknak 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 nagy dózisu ionizáló sugárzásra való érzékenységét megvizsgáltam. A Dmp53 mutánsokkal ellentétben egyik DLP törzs sem mutatott fokozott érzékenységet, ami azt jelzi, hogy a DLP-nek nincs kulcs fontosságú 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 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. 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.

#### **A dADA2a Drosophila transzkripciós adapter szerepet játszik a Dmp53 működésében**

Az ADA2 (alteration/deficiency in activation 2), transzkripciós adapter tartalmú komplexek élesztőben és emberben szekvenált specifikus transzkripciós faktorokon keresztül részt vesznek génspecifikus transzkripció aktivációban. A humán p53 transzaktivációs funkcióinak betöltésében és az általa kiváltott apoptózisban szükséges az ADA2/ADA3/GCN5 tartalmú adaptor komplex közreműködése. 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. A dADA2a a Drosophila ADA2a-t tartalmazó – ATAC (ADA two A Containing) – hiszton acetil transferáz komplex tagja a dGCN5 és dADA3 fehérjével együtt. A Dmp53 és dADA2a kapcsolatát a reaper röntgen sugárzást követő aktivációján keresztül vizsgáltam és azt tapasztaltam, hogy ADA2a hiányában, a Dmp53 null mutánsokhoz hasonlóan a reaper nem indukálódott. Ez arra utal, hogy a Dmp53 és a dADA2a-t tartalmazó ATAC egyaránt részt vesznek a reaper kifejeződésének szabályozásában. Feltételezhető, hogy a reaper aktivációjának hiánya dAda2a mutánsokban a programozott sejtihal lefolyására is hatással van. Az imágó korongokon végzett acridin orange festést követően az apoptotikus sejtek száma dAda2a mutáns lárvákban szignifikánsan kevesebb volt, mint a *w<sup>1118</sup>* állatokéban. A dADA2a fehérje hiányában tehát a Dmp53-függő apoptózis nem megy végbe nagy dózisu ionizáló sugárzást követően. Tehát a reaper transzkripciójának szabályozását és a programozott sejtihal indukációját a Dmp53 vélhetően az dADA2a tartalmú ATAC komplexszel együttműködve végzi.

## Összefoglalás

Eredményeimet összefoglalva megállapítottam, hogy:

1. A Dmp53 fehérje jelenléte és működése szükséges az UVC hatására bekövetkező DNS károsodások utáni túléléshez.
2. Kimutattam, hogy az *Ark*, *hid* és *reaper* pro-apoptotikus gének a Dmp53 jelenlététől függően különböző DNS károsodások esetén eltérő módon aktiválódnak.
3. DNS microarray kísérletben 61 gént azonosítottam, amelyek UVC kezelés hatására bekövetkező, Dmp53 jelenlététől függő expressziós változást mutatnak. Ezek közül 10 gén esetében a Dmp53-függő génkifejeződést független módszerrel, független biológiai mintákat használva megerősítettem, amelyeket az eredmények alapján a továbbiakban Dmp53 által szabályozott „lehetséges transzkripciós célgéneknek” tekintettem.
4. Megállapítottam, hogy UVC és ionizáló sugárzás hatására bekövetkező expressziós változások alapján három csoportba sorolhatók az általam azonosított lehetséges és ismert Dmp53 transzkripciós gének:
  - az első csoportba az *Ark*, *tou*, *ftz-f1*, *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 a Dmp53 jelenlétében ionizáló és UVC sugárzás hatására egyaránt indukálódnak és feltételezhetően általános szereppel bírnak az örökítő anyag károsodásakor beinduló sejtválaszokban
  - a harmadik géncsoportba tratózó gének – *reaper*, *sickle*, *Eiger*, *Ku70* és *Ku80* – kizárólag ionizáló sugárzást követően aktiválódnak a Dmp53 közreműködésével.
5. Bioinformatikai transzkripciós faktor kötőhely analízissel megállapítottam, hogy az újonnan azonosított lehetséges Dmp53 célgének promóter régiói nem tartalmazznak szimmetrikus, az emlős konszenzusra jellemző kötőhelyeket.
6. Genetikai interakciós kísérletek eredményei arra utalnak, hogy a humán Daxx fehérje *Drosophila* homológja, a DLP gátolja a Dmp53 apoptózist indukáló hatását.

7. Kimutattam, hogy a DLP-nek nincs kulcs fontosságú szerepe a nagy dózisu ionizáló sugárzás hatására létrejövő Dmp53-függő sejtválaszok aktivációjában. Ezt megerősítve nem vesz részt az ionizáló sugárzások hatására aktiválódó pro-apoptotikus gén, a *reaper*, Dmp53-függő szabályozásában és alap expressziós szintjének fenntartásában. A DLP ezzel ellentétben részt vesz az *Ark* expressziós szintjének fenntartásában.

8. Megállapítottam, hogy a *reaper* transzkripciójának szabályozását és a programozott sejtihal indukcióját a Dmp53 vélhetően az dADA2a tartalmú ATAC komplexszel együttműködve végzi.

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.

## A dolgozat témaköréhez kapcsolódó közlemények

1. **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
2. 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; 282(50): 36386-93. IF: 5,808
3. 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*. Moll Cell Biol. 2005; 25(18): 8215-27. IF: 6,773

### **További publikációk**

1. 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

2. 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

3. 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

4. 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