

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

**DOKTORI ÉRTEKEZÉS**

**Pardi Norbert**

**Témavezető:**

**Dr. Boros Imre**

**Biológus Doktori Iskola**

Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar

Biokémia és Molekuláris Biológiai Tanszék

Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Központ

Biokémiai Intézet

**2011**

**SZEGED**

Tartalomjegyzék.....	2
1. Bevezetés.....	4
1.1. A humán p53 szerepe és jellemzése.....	4
1.1.1. A p53 felfedezése.....	4
1.1.2. A p53 működésének szabályozása a fehérje poszttranszlációs módosításaival.....	5
1.1.3. A p53 sumoilációs célfehérje .....	8
1.2. A <i>Drosophila melanogaster</i> p53 és szerepe.....	14
2. Célkitűzések.....	17
3. Anyagok és módszerek .....	18
3.1. Fehérje-fehérje kölcsönhatás kimutatása élesztő két-hibrid módszerrel .....	18
3.2. PCR analízis.....	19
3.3. Western analízisek.....	20
3.4. <i>Drosophila</i> törzsek és keresztezések .....	20
3.5. S2 sejtkultúra transzfekció.....	22
3.6. Szárnyklón mozaikok létrehozása, LOH teszt.....	22
3.7. <i>Drosophila</i> lárvális szövetek immunfestése .....	23
3.8. RNS izolálás kvantitatív real-time PCR (Q-RT-PCR) módszerhez.....	23
3.9. Génexpresszió mérés Q-RT-PCR módszerrel .....	23
3.10. Northern analízis .....	24
3.11. Luciferáz aktivitás mérés .....	24
3.12. Immunoprecipitáció .....	25
3.13. GST pulldown kísérletek .....	25
4. Eredmények.....	27
4.1. A Dmp53 kölcsönhat a sumoilációban szerepet játszó fehérjékkel .....	27
4.1.1. Előzetes vizsgálatok .....	27
4.1.2. A Dmp53 C-terminálisa vesz részt a sumoilációs enzimekkel kialakított kölcsönhatásban .....	27
4.1.3. A Dmp53 fehérjében található konszenzus SUMO akceptor hely elrontása nem befolyásolja a kölcsönhatásokat.....	29
4.1.4. A Dmp53 és sumoilációs enzimek közti kölcsönhatás megerősítése GST-pulldown kísérlettel .....	29
4.2. A Dmp53 és a SUMO módosításban résztvevő fehérjéket kódoló gének közötti genetikai kölcsönhatás vizsgálata .....	30
4.2.1. A sumoilációs aktivitás részleges elvesztése csökkenti a Dmp53 DNS javításban betöltött aktivitását.....	30
4.2.2. A sumoilációs enzimek csökkent mennyisége nem befolyásolja a Dmp53-túltermelés okozta szemfenotípust .....	32
4.3. <i>In vivo</i> kísérletek a K302R mutáció Dmp53 működésére kifejtett hatásának vizsgálatára.....	33
4.3.1. A K302R mutációt hordozó Dmp53 transzgenikus állatok létrehozása .....	33
4.3.2. A Dmp53 <sup>K302R</sup> fehérje túltermelés okozta fenotípus jellemzése és összehasonlítása a vad típusú Dmp53 túltermelés okozta fenotípussal .....	34
4.3.3. A Dmp53 és Dmp53 <sup>K302R</sup> fehérje szintjének és poszttranszlációs módosításainak vizsgálata.....	39

4.3.4. A Dmp53 fehérje a sejtmagban helyezkedik el és a K302R mutáció hatására nem változik meg lokalizációja .....	43
4.3.5. Sem a Dmp53-ban létrehozott K302R mutáció sem a DLP fehérje jelenléte nem változtatja meg a Dmp53 transzkripció aktivitását.....	44
5. Az eredmények megvitatása .....	47
6. A doktori értekezés összefoglalója .....	54
7. Summary .....	58
8. Köszönetnyilvánítás .....	62
9. Irodalomjegyzék.....	63

## **1. Bevezetés**

### **1.1. A humán p53 szerepe és jellemzése**

#### **1.1.1. A p53 felfedezése**

A rákbetegség kialakulásának egyik fő okozója a sejtciklus ellenőrzésében szerepet játszó gének hibás működése. Az 1970-es években váltak általánossá azok a módszerek, amelyekkel virális onkogének sejtekbe történő transzformálásának hatását vizsgálták. Az egyik leggyakrabban használt kísérleti eszköz az SV40 majomvírus (simian virus 40) nagy T antigénje volt, amelyről kiderült, hogy önmagában szükséges és elégséges a daganatos sejtranszformáció létrejöttéhez. 1979-ben több közlemény is megjelent, amelyekben egy 53 kDa tömegű celluláris fehérjét írtak le (eleinte celluláris T antigénnek hívták, később p53-nak nevezték el), amely az SV40 vírus nagy T antigénjével kölcsönhat transzformált egérsejtekben [1-4]. Más vizsgálatokban azt találták, hogy többféle, különböző módon transzformált sejtvonalban is felhalmozódik ez a fehérje, akárcsak humán tumorokból származó rákos sejtekben [5]. Az első adat a p53 lehetséges szerepéről az a megfigyelés volt, amikor Mercer és munkatársai p53 ellenanyagot mikroinjektáltak szövettényészetbe és észrevették, hogy a sejtek később lépnek be a sejtciklus S fázisába [6]. Ez a megfigyelés azt valószínűsítette, hogy a p53-nak fontos szerepe van a sejtciklus szabályozásában.

Az 1980-as évek elején a p53 cDNS, majd később a gén klónozása megteremtette a lehetőségét a részletes molekuláris genetikai vizsgálatoknak [7-10]. 1984-ben több független közleményben közölték, hogy rágcsősejtekben a p53 együttműködik az onkogén Ras fehérjével (tumoros sejtekben), növeli a sejtosztódások számát és akár halhatatlanná is képes tenni a sejt kultúrát [11-13]. Ha a gén fehérjekódoló részének bizonyos pozícióiban mutációkat hoztak létre, a p53 onkogén aktivációját figyelték meg [14]. Ezen kísérleti adatok alapján a p53-at egy protoonkogénnek gondolták, a tumoros sejtekben megfigyelt gyakori felhalmozódásából pedig azt a konklúziót vonták le, hogy a megváltozott (onkogén) p53 rák kialakulását eredményezi. 1989-ben kiderült, hogy az eleinte használt p53 cDNS klónok pontmutációkat tartalmaztak, ezért az addig kapott eredményeket át kellett gondolni. Mikor egészséges sejtekből származó p53 cDNS-t fejeztek ki sejtekben, nem találtak onkogén

hatást, sőt az addigiakkal ellentétben, a sejt kultúrában a sejtosztódás gátlását eredményezte a fehérje expressziója [15-17]. Mint további vizsgálatok kimutatták, a p53 inaktiválása nagyon gyakori a rákos daganatokban, ezért az előbbieken vázoltaknak megfelelően, mai ismereteink szerint a p53 gén sokkal inkább tumorszupresszor, mint protoonkogén.

### **1.1.2. A p53 működésének szabályozása a fehérje poszttranszlációs módosításaival**

#### **1.1.2.1. A p53 számos poszttranszlációs módosítás célfehérjéje**

A p53 fehérje a sejtet érő különböző típusú stresszhatásokra adott válaszként képes leállítani a sejt ciklust, szerepet játszik a sejtöregedés szabályozásában és apoptózist kiváltva a sejt pusztulását is előidézhetsi. A p53 aktiválásának rendkívül precíz szabályozása kulcsfontosságú a tumorok kialakulásának megakadályozásához, illetve a normális sejt növekedés fenntartásához. A p53 fehérje stabilizálása és transzkripció aktiválása meghatározó a sejt genotoxikus stresszhatásokkal folytatott küzdelmében. A p53 szabályozása leginkább a fehérjén bekövetkező változatos poszttranszlációs módosításokkal történik: foszforilációval, acetilációval, metilációval, ubiquitinációval, sumoilációval, neddylációval. A következőkben - a teljesség igénye nélkül - sorra veszem a fehérjén végbemenő módosítások legfontosabb funkcióit.

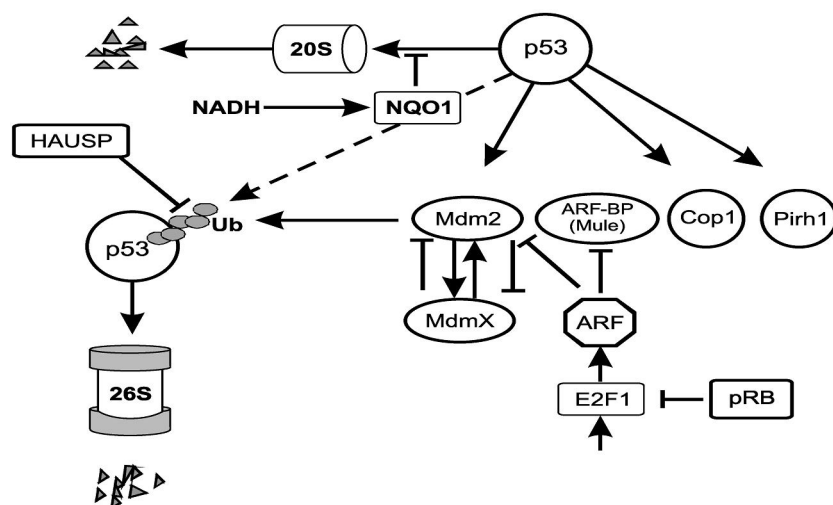
#### **1.1.2.2. A p53 stabilizálásának szabályozása**

Sokáig úgy gondolták, hogy normál sejtekben, amelyek nincsenek stresszhatásnak kitéve, nincs, vagy csak minimális a p53 aktivitás. A p53 gén konstitutívan átíródik, majd a mRNS fehérjére fordítódik. A p53 fehérje alacsony stabilitású, mennyiségét a sejtben az ubiquitin-függő, illetve ubiquitin-független 26S és 20S proteoszóma általi lebontása szabályozza [18]. Mielőtt ezekkel foglalkoznánk, érdemes a p53 szerkezetét megvizsgálni. Az aktív p53 fehérje a sejtekben homotetramer formájában van jelen [19]. A monomer fehérje tartalmaz egy N-terminális domént, amelynek egy része a transzkripció aktivációs domén (1-73 aminosavak), másik fele a prolin-gazdag SH3 régió (63-97 aminosavak). A fehérje középső részén található egy speciális DNS szekvenciákat felismerő és kötő domén (94-312 aminosavak). Ez a régió a fő célpontja az onkogenitást előidéző pontmutációknak. A fehérje

C-terminálisa tartalmaz egy oligomerizációs domént (325-355 aminosavak) és egy bázikus aminosavakban gazdag, úgynevezett basic domént (360-393 aminosavak), amelyek a p53 szabályozásának fontos részei [20].

A p53 fehérje ubiquitin-függő lebontását a 26S proteoszóma végzi, az ubiquitin molekulákat E3 ubiquitin-ligázok kapcsolják a p53-ra. A legrészletesebben tanulmányozott E3 ligáz a Mouse double minute 2 (továbbiakban Mdm2), amely egy p53-szabályozott gén terméke [21, 22]. A p53 mennyiségének növekedése az Mdm2 szint növekedéséhez vezet, amely viszont a p53 26S proteoszóma általi lebontását eredményezi azáltal, hogy az Mdm2 a p53 amino-terminálisához kötődik, majd a tumorszupresszor fehérje karboxil-terminális lizin oldalláncához ubiquitin molekulákat kapcsol. Ennek eredményeként a p53 a sejtmagból a citoplazmába szállítódik és a proteoszómában lebomlik. A p53 Mdm2 általi szabályozása egy autoregulációs visszacsatolós folyamat. Az Mdm2 aktivitásának szabályozásában fontos faktor az MdmX molekula. Ez a fehérje hasonló szerkezetű, mint az Mdm2, de nem rendelkezik E3 ubiquitin-ligáz aktivitással, így a p53-hoz kötődve nem indukálja annak lebontását [23]. Ráadásul, az Mdm2-vel oligomert alkotva, azt stabilizálja, saját degradációját pedig fokozza [24-26]. A p53 sejten belüli mennyiségének finom szabályozásában fontos szerepe van a HAUSP deubiquitináló enzimnek is. Ez a fehérje képes eltávolítani az ubiquitin molekulákat az Mdm2-ről, ezzel stabilizálva azt (és előidézve a p53 lebontását) [27-29]. Ugyanakkor a p53-ról is el tudja távolítani a multiubiquitin láncot, ezzel stabilizálva a fehérje szintjét [30]. Az ARF fehérje Mdm2-höz kötődve képes gátolni annak E3 ubiquitin-ligáz aktivitását, ezzel stabilizálja a p53 szintjét és apoptózist indukál [31]. A közelmúltban más E3 ligázokról (Cop1, Pirh2, ARF-BP/MULE, CHIP) is bebizonyosodott, hogy részt vesznek a p53-szint szabályozásában [32-35]. A Cop1 és Pirh2 ubiquitin ligázok génjei is p53 célgének, hasonlóan az Mdm2-höz, ezeknél is visszacsatolós szabályozás van. A p53 ubiquitin-függő lebontását tehát egy bonyolult rendszert alkotó, több egymással kölcsönható és egymást is szabályozó faktor végzi.

A p53 ubiquitin-független módon is degradálódhat, ezt a folyamatot a 20S proteoszóma végzi [36]. A 20S proteoszómás lebontás olyan fehérjékre jellemző, amelyek úgynevezett struktúrátlan régiókat tartalmaznak. Ez a mechanizmus alkalmas denaturált fehérjék gyors lebontására is [37]. A p53 az amino - és a karboxil-terminálisán is tartalmaz ilyen régiókat, a lebontást a NQO1 molekula szabályozza, ami egy NAD(P)H - függő quinon oxidoreduktáz [38].



**1. ábra: a p53 lebontásának szabályozása a proteoszómában [39]**

A p53 lebontása megvalósulhat ubiquitin-független 20S proteoszómás és ubiquitin-függő 26S proteoszómás degradációval. Ez utóbbi folyamat rendkívül bonyolult, számos E3 ubiquitin ligáz (Mdm2, Cop1, Pirh2, ARF-BP/MULE), illetve ezek gátló fehérjéi vesznek részt benne.

A p53 mennyiségének szabályozása közvetlenül a fehérje ubiquitinálásával és proteoszómában történő lebontásával valósul meg. A folyamatot rendkívül összetetté teszi, hogy a p53-at ubiquitináló faktorok (például az Mdm2) és a p53 is számos más kovalens módosításon megy át, amelyek hatással vannak a fehérje stabilitására. Napjainkban a p53 több, mint 20 különböző aminosaváról ismert, hogy kovalens módosításon mehet keresztül. Ezek a módosítások elsősorban a fehérje N,- és C-terminálisán mehetnek végbe. Az N-terminálison bekövetkező módosítások (például Ser15, Ser20, Thr18 foszforiláció) elsősorban a p53-Mdm2 kötést befolyásolják, ezáltal a fehérje stabilitását határozzák meg [40]. A módosítások típusától függően a p53 különböző transzkripciós koaktivátorokkal és korepresszorokkal hat kölcsön, amelyek meghatározzák a fehérje kötődését a különböző génekben található p53 válasz-elemekhez. A fehérje acetilálása szintén hozzájárul annak stabilizálásához [41] és transzkripciós aktiválásához. A sejtben található deacetiláz enzimek gátlásával az endogén p53 szintje megnövekszik [42]. A sokoldalú Mdm2 meg tudja akadályozni a CBP/p300 fehérjék által végzett p53-acetilációt [42]. A p53 C-terminálisán számos esetben ugyanazok a lizin aminosavak az ubiquitináció és acetiláció célpontjai is, ami azt mutatja, hogy kompetíció van a két módosítás között ezekért a lizinekért. Sőt, azt is kimutatták, hogy a p53 acetiláció gátolja a p53 ubiquitinációt *in vivo* nemcsak az acetilált, hanem a nem acetilált lizineken is [43].

### **1.1.2.3. A p53 stresszhatásokra történő aktiválódása**

A p53 aktiválódását számos, a sejtet ért stresszhatás előidézheti, mint például hipoxia vagy ischémia [44], különböző citokinek, vagy növekedési faktorok hiánya [45, 46], megváltozott adhézis kapcsolatok [47], hibás integrinek [48], hibák a citoszkeletális hálózatban [49-51], poliploid sejtek felhalmozódása [52], a mitotikus orsó hibája [51], hipo- és hipertermia [53, 54]. Ezek a körülmények karakterisztikus módosításokat idéznek elő egyrészt a p53 fehérjén, másrészt abban a rendkívül összetett rendszerben, amely a p53 mennyiségét és aktivitását meghatározza. Napjainkban a DNS károsodás által indukált p53 aktiválódási folyamatok a legjobban ismertek. Ezek közül mutatok be egyet.

Az ionizáló (például  $\gamma$ ) sugárzás elsősorban DNS töréseket okoz, amelyeket szenzor fehérjék- RAD1, RAD9, Hus1 heterotrimerek - ismernek fel. A felfogott jel aktiválja az ATM kinázt, amely célfehérjéket módosít. Foszforilálja például a H2AX hisztont, vagy a p53-at közvetlenül a Ser15 pozícióban, illetve - a Chk2 foszforilálásával - közvetve a Ser20 aminosaván is [55-59].

Az UV sugárzás nagyfokú DNS károsodást okoz. Ez a transzkripció elongáció leállításához vezet azáltal, hogy gátlódik az RNS polimeráz II továbbhaladása a DNS-en. Ebben az esetben az ATR kináz aktiválódik, amely közvetlenül foszforilálja a p53 Ser15 aminosavát és a Chk1 aktiválásával a Ser20 is foszforilálódik [60, 61]. Az RNS polimeráz II megállását a BRCA1 fehérje is érzékeli. Ez a fehérje a C-terminálisán foszforilált polimerázhoz kapcsolódik az elongáció során [62]. A transzkripció blokk létrejöttkor a BRCA1 foszforilálódik, majd a komplextől elszakadva a javító mechanizmusok beindításában játszik szerepet [63].

### **1.1.3. A p53 sumoilációs célfehérje**

#### **1.1.3.1. A sumoiláció folyamata**

A sumoiláció egy, az ubiquitinációhoz hasonló három lépéses folyamat, amelynek eredményeképpen egy kis polipeptid molekula reverzibilisen kötődik a célfehérjéhez. A módosítandó fehérjére kötődő polipeptid a SUMO (small ubiquitin-related modifier) molekula, amelynek génjét 1995-ben *Saccharomyces cerevisiae*-ben azonosították [64]. A

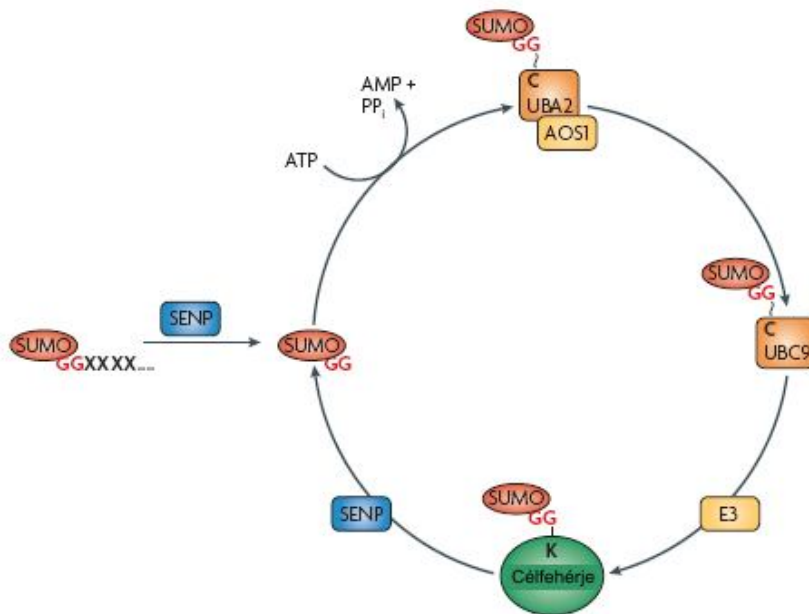


SUMO fehérjék körülbelül 10 kDa nagyságú molekulák, az ubiquitinhez meglehetősen hasonló háromdimenziós szerkezettel (érdekes módon aminosav szekvenciában kevesebb, mint 20% a megegyezés) [65]. Minden SUMO fehérje hordoz egy 10-25 aminosav hosszúságú struktúrálatlan régiót az N-terminálisán, amely más ubiquitin-szerű fehérjékre nem jellemző. A SUMO fehérjéket az eukarióták világában mindenhol megtaláljuk: az élesztő, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* egyetlen SUMO génnel rendelkezik, növényekben és gerincesekben viszont több SUMO gént találunk. A humán genom négy különböző SUMO fehérjét kódol: SUMO1-SUMO4 [66, 67]. A SUMO1-SUMO3 általánosan kifejeződő fehérje, míg a SUMO4 elsősorban a vesében, lépben és a nyirokcsomókban fejeződik ki [66]. A SUMO fehérjék kifejeződésük után érési folyamaton mennek keresztül, ahol SUMO-specifikus proteázok 2-11 aminosavat távolítanak el a fehérje C-terminálisáról.

Élesztő két-hibrid rendszerben kimutatták, hogy a SUMO a humán RAD51, RAD52, FAS és PML fehérjékhez is kötődik [68]. Azt, hogy a SUMO ténylegesen, reverzibilisen kötődik egy fehérjemolekulához, egyidőben két csoport mutatta ki, ők a RanGAP1 (Ran GTPase-activating protein) fehérjén bekövetkező SUMO módosítást azonosították [69, 70]. Az ezt követő tíz évben azonosították a sumoilációs rendszer elemeit, napjainkban pedig már többszáz fehérjéről tudjuk, hogy SUMO módosításon esik át.

Mind az ubiquitinációt mind a sumoilációt egy háromféle fehérjéből álló enzimkaskád hajtja végre. Az ubiquitinációhoz hasonlóan a sumoilációnál is a módosító molekula C-terminális glicin aminosava és a módosítandó fehérje lizin (Lys) aminosavának  $\epsilon$ -amino csoportja között jön létre izopeptid kötés. A folyamat első lépésében az érett SUMO molekulát C-terminálisán az E1 aktiváló enzim heterodimer (AOS1-UBA2) aktiválja [71]. Ez egy ATP igényes folyamat. Eredményeképpen egy SUMO-adenilát köztestermék keletkezik, majd az UBA2 katalitikus cisztein (Cys) aminosava és a SUMO fehérje C-terminális karboxil-csoportja között tioészter kötés jön létre. A SUMO ezt követően az UBC9 E2 konjugáló enzimre kerül, az előző lépéshez hasonlóan itt is tioészter kötést létrehozva a módosítófehérje C-terminális karboxil-csoportja és az UBC9 katalitikus ciszteinje között [72]. Végül az UBC9 a SUMO-t a szubsztráthoz szállítja, ahol létrejön az izopeptid kötés a SUMO molekula C-terminális glicin aminosava és a célfehérje Lys aminosavának  $\epsilon$ -amino csoportja között. Az utolsó lépést E3 ligázok katalizálják. Számos E3 ligáz csoport ismert: SP-RING motívumot tartalmazó E3 ligázok (PIAS család, MMS21, Zip3), RanBP2 E3 ligáz, Pc2 E3 ligáz [73-78]. A legtöbb esetben egyetlen SUMO molekula kötődik a célfehérjéhez,

de megfigyelték poli-SUMO lánc létrejöttét is élesztő, illetve emlős rendszerekben. Ezek funkciója, hogy ubiquitinációs szignálként szolgálnak a módosított fehérjén [79, 80].



## 2. ábra: a sumoiláció sematikus mechanizmusa [81]

Az éretlen SUMO fehérje C-terminálisáról szintézise után szentrin-specifikus proteázok (SENP) hasítanak le egy néhány aminosav hosszúságú peptidet, ezáltal létrehozva a funkcióképes SUMO molekulát. A SUMO-t az UBA2-AOS1 fehérje heterodimer aktiválja ATP energiájának felhasználásával. Ezt követően az UBC9 konjugáló enzimhez kötődik az aktivált SUMO, majd E3 ligáz enzimek kapcsolják a célfehérje lizin aminosavához. A sumoiláció megfordítható folyamat: a szentrin-specifikus proteázok képesek eltávolítani a SUMO-t a célfehérjéről.

A sumoiláció megfordítható folyamat, a szubsztrátról a SUMO molekulát specifikus proteázok távolítják el. Jelenleg egyetlen SUMO-specifikus proteázt kódoló géncsalád ismert, amelynek géntermékét élesztőben Ulp-nek (Ulp1 és Ulp2), humánban szentrin-specifikus proteáznak (SENP1-SENP6) nevezik [82, 83]. Ezek a fehérjék azon túlmenően, hogy képesek a SUMO molekula célfehérjéről történő eltávolítását elvégezni, C-terminális hidroláz aktivitásuk miatt az újonnan szintetizált SUMO fehérjék érésében is szerepet játszanak.

A SUMO molekula kapcsolódása egy fehérjére csak adott pozícióban mehet végbe, a SUMO egy lizin aminosavhoz kötődik. A konszenzus SUMO akceptor hely megtalálása azután vált lehetővé, hogy számos sumoilálódó fehérjén a sumoilációs lizin környezetét térképezték [84-86]. A sumoilációs akceptor helyet négy aminosav alkotja:  $\psi$ KXE (ahol  $\psi$  egy hidrofób aminosav, K lizin, X bármilyen aminosav, E glutaminsav).

### 1.1.3.2. A SUMO-módosítás biológiai funkciója

Bár a sumoilációban szerepet játszó enzimek azonosítása viszonylag gyorsan megtörtént, a módosítás tényleges biológiai szerepéről hiányosak ismereteink. Számos fehérjéről leírták, hogy sumoilálódik, de sok esetben nem tudjuk, hogy mi a módosítás szerepe. Az is ismert, hogy sokszor egy adott fehérjének csak kis része (a teljes mennyiség néhány százaléka) esik át módosításon, mégis jelentős változás következhet be. Jelenleg a sumoiláció néhány fontos biológiai funkciója már ismert, ezeket veszem most sorra.

Számos sumoilációs célfehérje nagyon fontos szereppel bír a génexpresszió szabályzásában. Találunk köztük transzkripciós aktivátorokat, represszorokat, koaktivátorokat, korepresszorokat. A módosítás jelenléte általában transzkripciós gátlást idéz elő. Ez alapvetően két módon lehetséges. Az egyik lehetőség, hogy sumoilált transzkripciós faktorok kötődnek egy adott promóterhez és ezáltal képesek represszálni bizonyos géneket. Az is előfordulhat, hogy a PML nukleáris testek (promyelocytic leukaemia nuclear body, PML-NB) felépítésében résztvevő fehérjék (PML, Sp100, Daxx, p53) SUMO-módosítása miatt következik be PML-szabályzott gének gátlása [87]. Számos transzkripciós faktor szabályzása a PML nukleáris testekkel történő kölcsönhatással valósul meg, illetve ezen struktúrák összeszerelődéséhez is bizonyos felépítő fehérjék (például a PML fehérje) SUMO-módosítása szükséges. A PML sumoiláltsági fokától függően számos módon képes transzkripció szabályzásra. Bár a legtöbb SUMO-módosított transzkripciós faktor gátló hatást fejt ki, vannak fehérjék (HSF1, HSF2, Tcf-4) amelyek sumoilált formában transzkripciós aktiválást idéznek elő [88-90].

A sumoiláció fontos szerepet játszik a magasabbrendű kromoszómaszerkezet és a kromoszómaszegregáció kialakításában. A sumoiláció hiányos *S. pombe* törzsek például életképesek, de nagyon lassan nőnek, érzékenyek DNS károsító vegyületekre, hibás mitózisuk van és meghosszabbodott telomerrel rendelkeznek [91-93]. Az ecetmuslica egyik E3 ligázát a *DmPias*-t, mint a pozíció effektus variegáció szupresszorát azonosították [94]. A *DmPias* mutánsoknál szintén kromoszómaszegregációs problémák, telomer hibák figyelhetők meg [94].

A DNS-javító mechanizmusokban résztvevő fehérjék közül is bizonyított néhányról, hogy a SUMO-módosítás fontos a megfelelő működésükhöz. A timin DNS glikoziláz (TDG) a rosszul párosodott DNS-ből képes timin eltávolítására. Funkciója pontos betöltéséhez sumoilálódnia kell [95]. Az élesztő posztreplicációs javító mechanizmusaiban részt vevő

PCNA (proliferating cell nuclear antigen) molekula működésének szabályzásában a SUMO-módosításnak nagyon fontos szerepe van [96].

A humán RanGAP1 is sumoilációs célfehérje. Ez a faktor a sejtmag és a citoplazma közötti transzportfolyamatokban játszik fontos szerepet. Sumoilált állapotban az NPC-hez (nuclear pore complex) kapcsolódik és ez a sejtmagi transzport elengedhetetlen lépése [69]. Az is előfordulhat, hogy egy fehérje sumoilált, illetve módosítatlan formája különböző sejten belüli elhelyezkedést mutat, mintegy a SUMO-módosítást használva fel a citoplazma és sejtmag közötti transzportjához [97].

A gyulladásoz folyamatokra adott válaszreakciók fontos faktora az NFκB transzkripciós faktor, amelynek aktivációjához az IκBα fehérje (amely NFκB inhibitor) ubiquitin-függő lebontására van szükség. Azonban, ha az IκBα sumoilálódik, akkor nem bomlik le, mert ugyanazon a lizin aminosavon történik a SUMO és ubiquitin általi módosítása is [98]. Emlős sejtekben a SUMO túltermelése nem csak az IκBα-t stabilizálja, hanem az NFκB-függő transzkripciót is gátolja [98].

#### **1.1.3.3. A sumoiláció szerepe a humán p53 fehérjén**

A p53 szabályozásának fontos elemei a fehérje C-terminálisán végbemenő poszttranszlációs módosítások. Rodriguez és munkatársai 1999-ben mutatták ki, hogy a humán p53 a SUMO módosítás egyik célfehérjéje [99]. U2OS sejteket kezelték UV sugárzással, majd azokat összegyűjtve Western analízissel a p53 módosítatlan, és SUMO1-módosított formáját azonosították. Ezt követően a fehérjének deléciós mutáns változatait hozták létre, és megállapították, hogy a sumoiláció a C-terminálison történik. Végül olyan konstrukciókat készítettek, ahol a fehérje C-terminálisának egy-egy lizin aminosavát argininre (K→R) változtatták, így kimutatták, hogy a humán p53 386-os pozícióban található lizinje a SUMO módosítás célpontja.

Miután kiderült, hogy a p53 sumoilációs célfehérje, rögtön adódott a kérdés, hogy mi lehet a SUMO módosítás szerepe a p53-on. Luciferáz-tesztel Rodriguez és munkatársai azt találták, hogy a fehérje módosított formája erős transzkripció aktiváló képességgel rendelkezik [99]. Azt is megállapították, hogy a K386R mutáns sumoilálódni nem, de ubiquitinálódni képes, ezért a p53-nál nincs kompetíció e két poszttranszlációs módosítás között. Ezt az eredményt Müller és munkatársai is megerősítették, akik sejtkultúrában Mdm2

túltermelés esetén drámai emelkedést tapasztaltak az ubiquitinált p53 mennyiségében, de a sumoilált forma mennyisége nem változott [100]. A SUMO-módosítás p53 transzkripciójára gyakorolt hatásával kapcsolatos eredmények azonban ellentmondásosak, mert Kwek és munkatársai nem találtak különbséget a módosított és módosítatlan fehérje transzkripció aktivitása között [101]. További ellentmondások vannak a PIAS1 E3 SUMO-ligáznak a p53 transzaktiváló hatására gyakorolt szerepével kapcsolatban: Schmidt és Müller a PIAS1 gátló hatását mutatták ki [102], míg Megidish és munkatársai p53-transzaktivációs növekedést mutattak ki PIAS1 hatására, ami p53-függő blokkot váltott ki a sejtciklus G1 fázisában [103]. Még jobban összezavarja a képet, hogy mindkét csoportnál hasonló eredmények születtek akkor is, ha a PIAS1 sumoilációs aktivitásához szükséges RING domén hiányzott a fehérjéből [102, 103]. Ez ugyanis azt mutatja, hogy bár a PIAS1 módosítja a p53 transzaktiváló hatását, de a sumoilációtól függetlenül. Kwek és munkatársai azt is bizonyították, hogy a p53 fehérje lokalizációja nem változik meg SUMO-módosítás hatására [101]. Kimutatták azt is, hogy az ubiquitinációhoz hasonlóan, a p53 hiperfoszforilált állapota megakadályozza a fehérje SUMO módosítását [100]. Valószínűleg a sumoiláció ahhoz is szükséges, hogy a p53 kifejtse apoptotikus aktivitását, mert a K386R mutáns fehérje kevésbé tud apoptózist kiváltani, mint a sumoilálódni képes vad típusú fehérje [100].

A p53 szabályzásában a sumoiláció fontos szerepet tölt be, de a fenti eredményekből az is látszik, hogy a SUMO-módosítás mellett számos más faktor is elengedhetetlen a fehérje precíz működéshez. Újabb közlemények arra mutatnak rá, hogy az Mdm2 nemcsak a p53 proteoszómás lebontását irányítja, hanem befolyásolja a sumoilációját is [104, 105]. Sejtkultúrán végzett transzfekciós kísérletben az Mdm2-t kötni képtelen p53 mutáns csak kismértékben tudott sumoilálódni [105]. Ha viszont túltermelték az Mdm2-t, jelentősen nőtt a SUMO-módosított p53 frakció, ezt a növekedést az ARF túltermelése tovább fokozta [105]. Az is világossá vált, hogy az Mdm2-nek kötődnie kell a p53-hoz és tartalmaznia kell nukleáris lokalizációs szignál (NLS) szekvenciát, hogy a p53 sumoilációját fokozza [105]. Ez alapján azt mondhatjuk, hogy az Mdm2 belép a sejtmagba, ott kötődik p53-hoz és így tudja elősegíteni a fehérje módosítását. A folyamat azonban ennél bonyolultabb: az ARF szintén fokozza a SUMO-módosított p53 mennyiségét. Ehhez N-terminálisával kötődnie kell az Mdm2-höz, C-terminálisa pedig szükséges a p53 sumoiláció növeléséhez [105]. Az ARF és Mdm2 által fokozott p53 SUMO-módosítás csak akkor következik be, ha a p53 tartalmaz nukleáris lokalizációs szignál (NoLS) szekvenciát is, azaz a sejtmagvacskába képes szállítódni [105]. Az előbb említett eredmények alapján úgy tűnik, hogy az ARF-Mdm2 kölcsönhatás elősegíti a sejtmagvacskában a sumoilációs faktorok összeszerelődését, amelyek

mind az Mdm2, mind a p53 sumoilációját végzik. Carter és munkatársai eredményei alapján a p53 szállításához szükséges az Mdm2 E3 ligáz aktivitású doménje. A Pias E3 SUMO ligáz doménje fokozza a szállítást, de csak Mdm2 jelenlétében [104]. A Pias és az Mdm2 jelenlétében a p53 kis frakciója sumoilálódik. Viszont egy olyan Mdm2 mutáns, amely csak monoubiquitinálni képes a p53-at, sokkal jobban tudja fokozni a p53 SUMO-módosítást [104]. Valószínűleg az Mdm2-által kiváltott monoubiquitináció elősegíti a p53-on más módosítások, például a sumoiláció létrejöttét. Li és munkatársai kimutatták, hogy a p53-at nemcsak a SUMO1, hanem a SUMO2 és SUMO3 (ezek szekvenciája 96%-ban azonos) is képes módosítani [106]. Ennek vélhetően más szerepe is van, mint a SUMO1 általi módosításnak. A munkacsoport bizonyította, hogy a SUMO2/3 általi sumoiláció hidrogén-peroxid kezelés által előidézett oxidatív stressz hatására növekszik, míg a SUMO1 módosítás aránya nem változik [106]. Belátták, hogy a SUMO2/3 kötődése a p53-hoz a sejtöregedést is befolyásolja, és növeli a p53 transzkripciós aktivitását [106]. Kimutatták azt is, hogy a SUMO2/3 a SUMO1-hez hasonlóan a p53 386-os lizinjéhez képes kötődni [106].

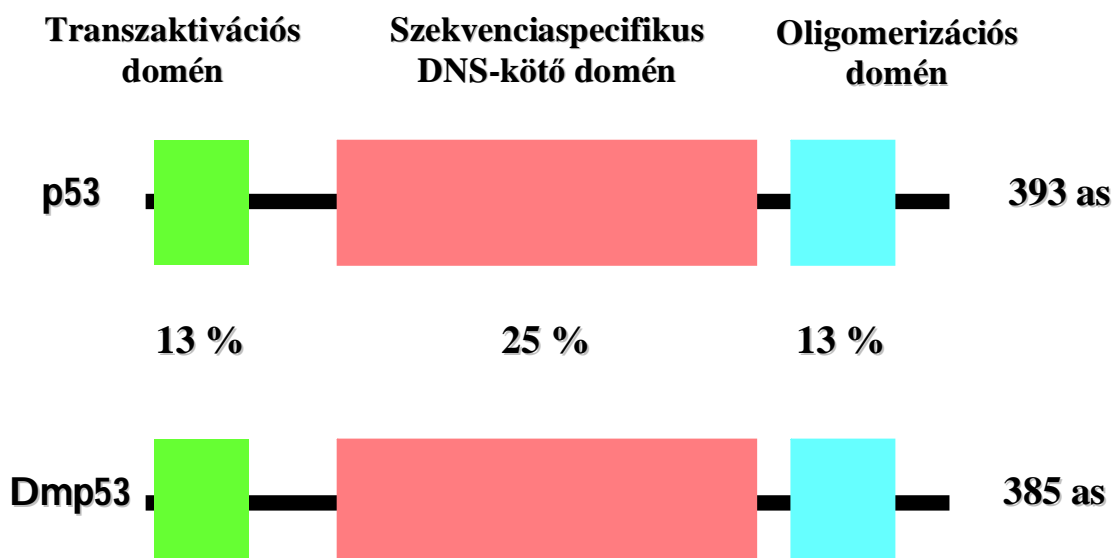
A p53 sumoilációjának felfedezése óta eltelt egy évtizedben számos közlemény foglalkozott a fehérjén végbemenő módosítás szerepének tisztázásával. Sikertelen bizonyos kérdésekre megnyugtató választ adni, de azt is láthatjuk, hogy néhány esetben ellentmondásos eredmények születtek, amelyek szükségessé teszik további alapos vizsgálatok végrehajtását.

## **1.2. A *Drosophila melanogaster* p53 és szerepe**

A p53 tumor szuppresszor szerepének pontos megértése rendkívül fontos, hiszen a humán daganatok több mint 50%-nál kimutatták, hogy ez a gén (is) mutációt szenvedett. A közelmúltban számos gyakran alkalmazott modellorganizmusban, - zebrahalban [107], egérben [108], *C. elegans*-ban [109, 110], ecetmuslicában [111-113] - azonosították e fontos gén ortológját. A p53 vizsgálata ezekben a szervezetekben eddigi ismereteinkhez jelentősen hozzájárul és új elemekkel egészíti ki.

A *Drosophila melanogaster* p53 (*Dmp53*) azonosítását a *Drosophila* genom projektben ismertté vált csaknem teljes szekvencia tette lehetővé. 2000-ben három független amerikai csoport azonosította a gént, amely a harmadik kromoszóma jobb karján a 94D10 citológiai régióban található [111-113]. A génről képződő mRNS 3,8 kilobázis hosszúságú, 8 exonból, 7 intronból és nem transzlálódó részekből áll. Erről íródik át a fehérje „A” izoformája. A fehérjének létezik egy „B” izoformája is, amelynek mRNS-e 4,4 kilobázis

hosszúságú és 9 exonból áll. Az „A” izoforma első, illetve a „B” izoforma első két exonja eltér egymástól, de a többi 7 exon megegyezik. A Dmp53 fehérje „A” izoformája 385 aminosavból áll, felépítése hasonló humán megfelelőjéhez: egy rövidebb N-terminális transzaktiváló doménnel kezdődik, majd van egy hosszú DNS-kötő domén (amely egyébként a legnagyobb homológiát mutatja a humán fehérje megfelelő régiójával), végül egy rövid C-terminális domén következik (a humánhoz hasonlóan oligomerizációs és basic doménnel) [111-113].



**3. ábra: a humán (p53) fehérje doménszerkezete és *Drosophila* p53 (Dmp53) fehérje doménszerkezete hasonló**

Az ábrán látható színes egységek a p53 fehérjék fő doménjeit és azok százalékban kifejezett hasonlóságát mutatják.

A Dmp53 *in vivo* apoptotikus aktivitását először a fehérje szemben történő ektopikus expressziójával mutatták ki [111-113]. Brodsky és munkatársai a *reaper* (*rpr*) gént Dmp53 célgénként azonosították [111]. A *rpr* egy pro-apoptotikus gén, amely - többek között - röntgensugárzás hatására aktiválódik. A *rpr* szabályozó régiójában találtak egy sugárzással indukálható válasz elemet, amely megegyezett a p53-válasz elem konszenzus szekvenciájával. Úgy tűnik, hogy a *Drosophilában* a genotoxikus stressz és a hatására bekövetkező apoptózis között sikerült fontos összekötő kapcsolatot találni azáltal, hogy a Dmp53-at, mint a *rpr* egyik szabályozóját azonosították. JM Abrams munkacsoportja állította fel azt a modellt, mely szerint a különböző genotoxikus stresszhatások (például röntgensugárzás miatti DNS károsodás) Dmp53-at aktivál, amely aztán pro-apoptotikus

géneket kapcsol be (a *reaper* mellett a *hidr*ól és a *grim*ről is bebizonyosodott, hogy Dmp53 célgén) [114, 115], amelyek aztán az anti-apoptotikus géneket gátolják, az apoptózishoz vezető kaszpáz kaszkádot pedig beindítják.

A DNS-kötő doménben létrehozott mutációk az ecetmuslica fehérjénél domináns negatív hatású fehérje képződéséhez vezetnek. A mutáns fehérje DNS-kötő képessége gátolt [112, 113]. Az emlős p53-mal ellentétben, a vad típusú Dmp53 túltermelése nem idézte elő a sejtciklus G1 fázisban történő leállítását [113]. Ennek az eredménynek megfelelően azt találták, hogy az emlős p21 (amelyen keresztül a p53 képes leállítani a sejtciklust) *Drosophila* ortológja - a dacapo - nem aktiválódott ionizáló sugárzás hatására [116]. Ezek alapján úgy tűnik, hogy ecetmuslicában a sejtciklus sugárzás indukálta leállítása nem a p53-tól függ [112, 113]. Korábban részletesen tárgyaltam, hogy az emlős p53 mennyiségének szabályzásában az Mdm2-nek nagyon fontos szerepe van. Mivel ecetmuslicában ennek a fehérjének nem találtak ortológját, nyilvánvaló, hogy a Dmp53 más módon szabályzódik. Brodsky és munkatársai leírták, hogy a *Drosophilában* is azonosított Chk2 kináz (DmChk2) foszforilálja a Dmp53-at [117], más munkacsoportok pedig azt is megállapították, hogy a DmChk2 és a *Drosophila* ATM (DmATM) szükséges az ionizáló sugárzás által kiváltott apoptózishoz [118, 119]. Megállapították azt is, hogy az ATR ecetmuslica ortológja szintén szerepet játszik a DNS károsodásra adott p53-válaszban [119]. Úgy tűnik viszont, hogy az emlős Chk1 ecetmuslica ortológja, a Grp, a DmChk2-vel ellentétben nem befolyásolja a Dmp53 által kiváltott apoptózist *Drosophila* szemben [120].

A humán p53 ecetmuslica ortológját kilenc éve írták le. Az azóta eltelt időszak alatt a Dmp53 számos funkcióját megtudtuk, de természetesen számos kérdés még tisztázatlan. Megállapíthatjuk, hogy a Dmp53 különböző stresszhatásokra (például ionizáló sugárzás) adott válaszként apoptózist idéz elő. Egyelőre nincs rá egyértelmű kísérletes bizonyíték, hogy a fehérje a sejtciklus leállításában (például a p21-en keresztül) részt vesz. Mivel a *Drosophilában* nincs az Mdm2-nek megfelelő fehérje, a Dmp53 szabályzása nem az emlős rendszerben kiválóan jellemzett Mdm2/MdmX rendszeren keresztül valósul meg. Jelenlegi tudásunk alapján a Dmp53 a foszforilációját végző DmChk2/DmATM rendszer szabályzása alatt áll.



## 2. Célkitűzések

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

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

1. Célul tűztem ki annak meghatározását, hogy az élesztő két-hibrid kísérletből Dmp53-kölcsönható partnerként azonosított - a sumoilációban szerepet játszó - DmUba2 (SUMO-aktiváló), DmUbc9 (SUMO-konjugáló) és DmPias (SUMO-ligáz) fehérjék a Dmp53 mely régiójával lépnek kölcsönhatásba.
2. Céлом volt a Dmp53 és a SUMO-módosításban részt vevő fehérjéket kódoló gének közötti genetikai kölcsönhatás vizsgálata.
3. Célul tűztem ki a Dmp53 konszenzus sumoilációs helyet megváltoztató mutáció hatásának vizsgálatát a fehérje *in vivo* működésére.

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1. Fehérje-fehérje kölcsönhatás kimutatása élesztő két-hibrid módszerrel

A nagyléptékű könyvtár transzformációhoz a Dmp53 N-terminális nélküli részét (Dmp53 $\Delta$ N) Dr. Bálint Éva klónoztta EcoRI-BamHI enzimekkel a pBTM116 vektorba, amely triptofán szelekciós markert és LexA DNS-kötő szekvenciát tartalmaz. A Dmp53 $\Delta$ N fragmentet a pOT2-Dmp53 vektorból a Dmp53F1 és Dmp53R1 primerekkel, PCR technikával szaporította fel. Az élesztőbe először ezt a csali plazmidot transzformálta, majd a csali tartalmazó törzsbe a pACT2 plazmidba klónozott *Drosophila* embrionális cDNS könyvtárat is bejuttatta. A pACT2 plazmid leucin szelekciós markert és GAL4 transzaktivációs domént tartalmaz. A pBTM116-Dmp53C, pBTM116-Dmp53C1, pBTM116-Dmp53C2, pBTM116-Dmp53 $\Delta$ N<sup>K302R</sup> konstrukciók cDNS fragmentjeit PCR technikával készítettem el, sorban a következő primerek felhasználásával: Dmp53F3-Dmp53R1, Dmp53F3-Dmp53R2, Dmp53F4-Dmp53R1 valamint Dmp53F1-Dmp53R1-Dmp53KR1-Dmp53KR2. A primerszekvenciák a következők:

Dmp53F1: GGGAATTCTTGCAGGGATTAAACTCCG

Dmp53F3: GCGAATTCAGCAAGAAGCGCAAGTCC

Dmp53F4: GAATTCGGCATGATTAAGGAGGCGGC

Dmp53R1: CGGGATCCTCATGGCAGCTCGTAGGC

Dmp53R2: GGATCCAATCATGCCCTCGATGCTCT

Dmp53KR1: ATTGCTATAAGGACGGAGGACAC

Dmp53KR2: CCTCCGTCCTTATAGCAATGCACC

Valamennyi fragmentumot EcoRI-BamHI enzimekkel klónoztam a pBTM116 plazmidba. A pBTM116-Dmp53 $\Delta$ N $\Delta$ C konstrukciót úgy állítottam elő, hogy a pBTM116-Dmp53 $\Delta$ N plazmidot StyI-BamHI enzimekkel hasítottam, majd Klenow enzimmal feltöltöttem, végül a feltöltött végeket ligáltam.

Az élesztő transzformációhoz *Saccharomyces cerevisiae* L40 törzset (*MATa his3 $\Delta$ 200 trp1-90 leu2-3, 2-11 ade2 LYS2::lexA-HIS3 URA3::lexA-lacZ*) használtam a Clontech

Matchmaker élesztő két-hibrid rendszerhez mellékelt protokollja alapján. A transzformáns élesztő telepeket a megfelelő szelektív minimál táptalajra (1,2 g élesztő nitrogén bázis, 5 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 10 g borostyánkősav; 6 g NaOH; 0,55g Trp<sup>-</sup>, Ura<sup>-</sup>, Leu<sup>-</sup>, Lys<sup>-</sup>, His<sup>-</sup> Complete Supplement Mixture - kiegészítő keverék; 20 g agar; 100 ml 20% glükóz; 4 ml 25mg/ml adenin/1 liter) szélesztettem és 3 napig 30 °C-on növesztettem. A transzformálást követően felnőtt élesztő telepek  $\beta$ -galaktozidáz aktivitását hagyományos kolónia filter módszerrel és szemi-kvantitatív méréssel teszteltem. A kolónia filter módszernél minimál táptalajt tartalmazó lemezen növesztettem az élesztő telepeket, majd pozíciójukat megtartva nitrocellulóz filterre (Millipore) rögzítettem őket a lemezről, amelyet 10 másodpercig tartó folyékony nitrogénes feltárás követett. A nitrocellulóz filtert 0,2 mg/ml X-gal tartalmú Z puffer oldattal (60 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 40 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 10 mM KCl; 1 mM  $\text{MgSO}_4$ ; 50 mM  $\beta$ -merkaptotanol; pH 7,0) átitattam és 2 óra hosszáig 30 °C-os inkubátorba helyeztem. A szemi-kvantitatív  $\beta$ -galaktozidáz mérésnél folyékony minimál médiumban növesztettem az élesztő sejteket ( $\text{OD}_{600} = 0,5-0,8$ -ig), majd minden mintából 1,5 ml sejtet Eppendorf csőbe mértem, centrifugáltam, végül Z pufferben szuszpendáltam és folyékony nitrogénben feltártam. Ezt követően 0,5 mg/ml ONPG tartalmú Z puffert adtam a feltárt sejtekhez és 3 óra hosszáig 30 °C-os inkubátorba helyeztem a mintákat. Végül spektrofotométeren megmértem a minták optikai denzitását 420 nanométeren és  $\beta$ -galaktozidáz egységben kiszámoltam az aktivitásokat az alábbi formula alapján:  $\text{OD}_{420}/t \times V \times \text{OD}_{600}$ , ahol t az inkubáció során eltelt idő percben, V egy koncentráció faktor (értéke 0,5),  $\text{OD}_{600}$  az élesztősejtek optikai denzitása 600 nanométeren,  $\text{OD}_{420}$  a minták optikai denzitása 420 nanométeren.

### 3.2. PCR analízis

A reakciókhoz a 3.1. pontban említett primereket használtam. A denaturációt 1 percre 94 °C-on végeztem. A hibridizáció 55 °C-on 1 percre, a polimerizáció 72 °C-on 1 percre tartott. 35 ciklust hajtottam végre. A reakció 50  $\mu\text{l}$ -es végtérfogatban történt. A reakcióelegy összetétele: 5  $\mu\text{l}$  10x koncentrációjú Taq PCR puffer, 4  $\mu\text{l}$  25 mM  $\text{MgCl}_2$ , 4  $\mu\text{l}$  2,5 mM dNTP, 2-2  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{M}$  primer, 1  $\mu\text{l}$  Taq DNS polimeráz (Fermentas), 1  $\mu\text{l}$  templát DNS.

### 3.3. Western analízisek

A fehérje preparátumok készítéséhez egy 1,5 ml-es Eppendorf csőben 10 db lárvát 100 µl 2x SDS mintafelvívő pufferben (0,1 M Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% glicerín; 0,2 M DTT; 0,2% brómfenolkék) 5 percig forraltam, homogenizáltam, majd újbóli 5 perc forralás után lecentrifugálva (5 perc 13000 rpm) a tiszta oldatot új csőbe mértem át. Az így elkészített mintákat -20 °C-on tároltam.

Az SDS fehérje gélelektroforézishez Biorad futtató- és blottoló-egységet használtam. A fehérjeminták futtatását, Coomassie-festését és a blottolást a gyártók által ajánlott módon végeztem. A blottoláshoz Immobilon-P PVDF membránt (Millipore) használtam.

Az egyes mintákból általában 10-10 µl-t (1db L3 lárvának megfelelő mennyiség) választottam el SDS fehérje gélelektroforézissel 10%-os gélben, majd a fehérjéket PVDF membránra vittem át.

A membránt ezután blokkoltam 5% sovány tejport tartalmazó TBST oldatban (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,05% Tween-20) 60 percig szobahőmérsékleten rázogatva. Az ellenanyagot hígítottam TBST oldatban, és ebben inkubáltam a membránt egy éjszakán keresztül 4 °C-on. Ezután ötször 10 percig mostam TBST-vel szobahőmérsékleten. A membránt 1 órán keresztül TBST oldatban 40000-szeresére hígított, peroxidázzal kapcsolt másodlagos ellenanyaggal (DAKO) inkubáltam szobahőmérsékleten. Ezt követően ötször 10 percig mostam TBST-vel. A membránt Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) oldatban inkubáltam 5 percig, majd zsugorfóliába csomagolva, autoradiográfiás kazettában röntgen filmet helyeztem rá.

A kísérletekhez használt ellenanyagok: anti-Dmp53 d-200 (Santa Cruz Biotechnology) 1:500 hígításban, anti-*Drosophila* smt3 [121] 1:1000 hígításban, anti-*Drosophila* smt3 C-term (Abgent) 1:1000 hígításban, M2 anti-FLAG (Sigma, USA) 1:20000 hígításban és anti-α tubulin DM1A (Sigma, USA) 1:10000 hígításban.

### 3.4. *Drosophila* törzsek és 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/ 1liter) 25 °C-on tartottam fenn. A *Dmp53*<sup>5A-1-4</sup> törzset Yikang S. Rong (NIH, Bethesda, USA) laboratóriuma bocsátotta rendelkezésemre. A törzs *Dmp53* null mutáns, a génben levő delécio miatt. A Dmp53-at

ektopikusan túltermelő *P[UASp53]* transzgenikus törzs Michael W. Young laboratóriumából származik. A pUAST-Dmp53<sup>K302R</sup> konstrukciót hordozó (a Dmp53<sup>K302R</sup> fehérjét ektopikusan túltermelő) törzset Dr. Bodai László állította elő úgy, hogy a pUAST-Dmp53<sup>K302R</sup> konstrukciót *yw*; *Dmp53*<sup>5A-1-4</sup> embriókba injektálta. A pUAST-Dmp53<sup>K302R</sup> konstrukciót a következőképpen hoztam létre: a pGAD424-Dmp53 valamint a pBTM116-Dmp53ΔN<sup>K302R</sup> konstrukciókat StuI-BamHI enzimekkel emésztettem és a pBTM116-ből kivágott (és a pontmutációt hordozó) Dmp53 fragmentet átklónoztam a pGAD424-be (így megkaptam a teljes hosszúságú, pontmutációt hordozó Dmp53-at). A pGAD424-Dmp53<sup>K302R</sup> -ből EcoRI-BglII enzimekkel klónoztam át a Dmp53<sup>K302R</sup>-at pUAST vektorba. A pUAST-attBDmp53 és pUAST-attBDmp53<sup>K302R</sup> konstrukciókat úgy hoztam létre, hogy a Dmp53, illetve Dmp53<sup>K302R</sup> fragmenteket pGAD424-ből EcoRI-BglII enzimekkel klónoztam a pUASTattB vektorba. A pUAST-attBDmp53 és pUAST-attBDmp53<sup>K302R</sup> konstrukciókat injektáltam a ΦX-51D (*y w* M{eGFP.vas-int.Dm}ZH-2A; M{RFP.attP}ZH-51D; +; +) és ΦX-86Fa (*y w* M{eGFP.vas-int.Dm}ZH-2A; +; M{RFP.attP}ZH-86Fa; +) *Drosophila* törzsekbe. A Dmp53, illetve Dmp53<sup>K302R</sup> túltermeléséhez felhasznált „driver” törzsek a következők voltak: *P[act-GAL4]*, *P[en-GAL4]*, *P[vg-GAL4]*, *P[da-GAL4]*, *P[GMR-GAL4]*. A felhasznált törzsek homozigóták voltak, ezért valamennyi kikelt állat hordozta a transzgén, illetve a „driver” egy-egy kópiáját.

A domináns negatív hatású Dmp53-nak a Dmp53<sup>K302R</sup> túltermelő állatok fenotípusára kifejtett hatásának vizsgálatakor az alábbi keresztezést végeztem: *yw*; *P{UAS-Dmp53<sup>K302R</sup>}*2 hímeket kereszteztem *w*; *P{UAS-Dmp53<sup>H159N</sup>}*; *P[act-GAL4]* / *TSTL* szüzekkel.

A sumoilációs enzimek csökkent mennyiségének a Dmp53 szemben történő túltermelésére gyakorolt hatásának vizsgálatakor az alábbi keresztezéseket végeztem: *P{w<sup>+mC</sup>=GAL4-ninaE.GMR}12*; *P{UAS-Dmp53.Ex}* szüzeket kereszteztünk *w* vagy *yw*; *P{ry<sup>+t7.2</sup>=PZ}lwr<sup>05486</sup>/y<sup>+</sup>CyO* vagy *yw*; *P{w<sup>+mC</sup>=lacW}smt3<sup>k06307</sup>/y<sup>+</sup>CyO* vagy *yw*; *P{ry<sup>+t7.2</sup>=PZ}lwr<sup>05486</sup>* *P{w<sup>+mC</sup>=lacW}smt3<sup>k06307</sup>/y<sup>+</sup>CyO* vagy *yw*; *P{ry<sup>+t7.2</sup>=PZ}Su(var)2-10<sup>03697</sup>/y<sup>+</sup>CyO* hímekekkel.

A kromoszómális instabilitás mérésére használt LOH (Loss of Heterozigosity) tesztnél a következő keresztezéseket végeztem: *w* vagy *yw*; *P{ry<sup>+t7.2</sup>=PZ}lwr<sup>05486</sup>/y<sup>+</sup>CyO* vagy *yw*; *P{w<sup>+mC</sup>=lacW}smt3<sup>k06307</sup>/y<sup>+</sup>CyO* vagy *yw*; *P{ry<sup>+t7.2</sup>=PZ}lwr<sup>05486</sup>* *P{w<sup>+mC</sup>=lacW}smt3<sup>k06307</sup>/y<sup>+</sup>CyO* vagy *yw*; *P{ry<sup>+t7.2</sup>=PZ}Su(var)2-10<sup>03697</sup>/y<sup>+</sup>CyO* hímekek kereszteztünk *mwh<sup>1</sup>* *Dmp53*<sup>5A-1-4</sup> szüzekkel.

### 3.5. S2 sejt kultúra transzfekció

A Dmp53 és Dmp53<sup>K302R</sup> fehérjéket Schneider 2 (S2) Drosophila sejt kultúrában is vizsgáltam. A transzfekciót a  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -os módszerrel végeztem. A transzfekciót 3 cm átmérőjű Petri csészében végeztem, amelyekben a kiindulási sejtszám  $3 \times 10^6$  db sejt/ml volt. Az S2 sejtek tápoldata: gyári Schneider médium (Sigma) + 10% Foetal calf serum (FCS) oldat + 0,05 mg/ml ampicillin + 0,1 mg/ml sztreptomicin. A sejteket 24 °C-on növesztetem, majd a transzfekció előtt három órával lecseréltem rajtuk a táptalajt. A transzfektálni kívánt DNS-t összekevertem 25 µl 2,5 M  $\text{CaCl}_2$  oldattal, majd UP vízzel 250 µl-re egészítettem ki. A mintákat lassan kevertetve hozzásepegtettem 250 µl HEPES oldathoz, majd 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltam. Az így kapott 500 µl DNS oldatot a sejtekre csepegtettem. 16 óra elteltével 2 x 3 ml gyári Schneider médiummal mostam a sejteket, majd 3 ml tápoldatot mértem rájuk. A sejteket még 24-48-72 óráig növesztetem 24 °C-on, majd összegyűjtöttem, lecentrifugáltam 2000 rpm-en 5 percig, majd a felső fázist eltávolítottam. Ezután felfuszpendáltam őket 50 µl 1x PBS-ben, és 50 µl 2x SDS mintafelvívő puffert adtam hozzá. Öt percig forraltam a mintákat, majd Western analízist végeztem rajtuk. A transzfekciók során használt plazmidokat az 1. táblázat tartalmazza. A pAFW-Dmp53 és pAFW-Dmp53<sup>K302R</sup> plazmidokat két lépésben állítottam elő: EcoRI-NotI enzimekkel a pUAST-Dmp53, illetve pUAST-Dmp53<sup>K302R</sup> konstrukciókból kivágtam őket, majd ugyanezen enzimekkel pENTR3C vektorba klónoztam őket. A második lépésben a Gateway rendszerben használt LR reakcióba vittem a pENTR3C-Dmp53 és pENTR3C-Dmp53<sup>K302R</sup> plazmidokat, ahol a rekombinációs reakció során átépültek a Dmp53 fragmentek a pAFW vektorba. A pAFW-DLP plazmidot is két lépésben állítottam elő: a pET28c-DLP konstrukcióból EcoRI-XhoI enzimekkel kivágtam, és a pENTR1A vektor ugyanezen két hasítóhelye közé klónoztam. A második lépésben a Gateway rendszerben használt LR reakcióba vittem a pENTR1A-DLP plazmidot, ahol a rekombinációs reakció során átépültek a fragment a pAFW vektorba.

### 3.6. Szárnyklón mozaikok létrehozása, LOH teszt

A Loss of Heterozygosity (LOH) kísérletben a recesszív *multiple wing hairs (mwh)* fenotípus megjelenését vizsgáltam röntgen sugárzás hatására. Vándorló L3 stádiumú lárvákat alacsony dózisu röntgensugárzással kezeltem (250 rad, 1 krad/perc). A kikelt állatok szárnyait

rögzítettem Canada balsam/methyl salicilate (Sigma) 1:1 arányú keverékével majd mikroszkóp alatt számoltam a szárnyklónok számát.

### **3.7. *Drosophila* lárvális szövetek immunfestése**

A lárvákat 100 µl PBS oldatban felboncoltam, majd 20 percre PBSTF oldatba (100 µl 10x PBS; 120 µl 37%-os paraformaldehid; 780 µl desztillált víz) helyeztem. A fixáló eltávolításához 500 µl-es PCR csőben 10 percig forgatva háromszor mostam PBS oldattal. Ezután a mintákat 20 percig permeabilizáltam PBS + 0,3 % TWEEN-20 oldatban. A szöveteket 60 percig blokkoltam 100 µl PBST-FCS (100 µl 10x PBS; 100 µl Foetal Calf Serum; 1 µl TWEEN-20; 780 µl desztillált víz), majd az elsődleges ellenanyagot tartalmazó 100 µl PBST-FCS oldatban forgatva 10-12 óráig 4 °C-on tároltam a mintát. Az ellenanyag eltávolítására hatszor 100 µl PBST oldattal 5 percig mostam, majd hozzáadtam az 500x hígított Alexa555 másodlagos ellenanyagot, és 2 órán keresztül sötétben inkubáltam. A mintákat négy alkalommal PBST oldattal 10 percig mostam, majd tárgylemezre helyeztem és lefedtem.

### **3.8. RNS izolálás kvantitatív real-time PCR (Q-RT-PCR) módszerhez**

L2 stádiumú *Drosophila melanogaster* lárvákból össz RNS-t izoláltam QIAGEN RNeasy Kit segítségével, a gyártó utasításait követve. Egy-egy minta elkészítéséhez 50 állatot használtam fel. Az RNS koncentrációját NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer) készülékkel határoztam meg.

### **3.9. Génexpresszió mérés Q-RT-PCR módszerrel**

Génspecifikus primereket terveztem primer 3 és Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) programokat használva. A szintetizált primerekkel a Q-RT-PCR reakciókat a használandó primer koncentrációra optimalizáltam. A Q-RT-PCR reakciókat ABI 7500 Real Time System (Applied Biosystems) készüléken végeztem. A polimeráz láncreakcióban 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 (az utolsó két lépést 40 cikluson át ismételttem). A *18S RNS* endogén (bemérési) kontroll esetében TaqMan próba segítségével detektáltam a PCR terméket, TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems) reagenst használva. A primerek és a TaqMan próbák szekvenciái a következők voltak: 18S forward: GCCAGCTAGCAATTGGGTGTA, 18S reverse: CCGGAGCCCCAAAAGCTT, 18S probe: TATGGCTCTCTCAGTCGCTTCCGGG, Dmp53 forward: GCTTGGGGCACGTACATATT, Dmp53 reverse: ACATGAGCCGGTCTGTAACC.

### 3.10. Northern analízis

A kísérletekhez először össz RNS-t izoláltam L2 stádiumú *Drosophila* lárvákból TRIzol LS reagens (Invitrogen) felhasználásával, a gyártó javaslatai alapján. Egy-egy minta elkészítéséhez 10 állatot használtam fel. Az izolált RNS-ekből 5-5µg-ot futtattam 1%-os formaldehides agaróz gélben, majd Hybond-N membránra (Amersham) vittem át őket éjszakán át tartó kapilláris transzferrel. Másnap a membránt 3 óra hosszáig szárítottam szobahőmérsékleten, majd UV fénnel keresztköttöttem az RNS-eket. A pBTM116-Dmp53ΔN konstrukcióból EcoRI-BamHI enzimekkel kivágtam a fragmentet és <sup>32</sup>P-vel (α-dCTP) jelöltem „random priming” reakcióban. A jelölt fragmentet Sephadex G75 oszlopon tisztítottam, majd 65 °C-ra előmelegített hibridizációs pufferbe (0,5% SDS, 5x Denhardt puffer, 6x SSC [az 1x SSC 0,15 M NaCl valamint 0,015 M Na-citrát] és hordozó DNS [100 µg/ml koncentrációban]) öntöttem. A hibridizációs reakció során a membránt 65 °C-os hibridizációs pufferben inkubáltam éjszakán át. Ezt követően 65 °C-on mostam a membránt 0,5% SDS–2x SSC, majd 0,5% SDS–1x SSC, végül 0,5% SDS–0,5x SSC oldatban 30-30 percig, végül zsugorfóliába csomagolva, autoradiográfiás kazettában röntgen filmet helyeztem rá és -80 °C-on 2 napig exponáltam.

### 3.11. Luciferáz aktivitás mérés

3x10<sup>6</sup> számú *Drosophila* S2 sejtet 6 lyukú lemezre helyeztem, és a pAFW-Dmp53 vagy pAFW-Dmp53<sup>K302R</sup> plazmidot kotranszfektáltam a *reaper* gén p53 válasz elemét hordozó pGL3-Luc plazmiddal. Carrier DNS-ként a pH624 plazmidot használtam. A transzfekciót a kalcium-foszfátos módszer alapján végeztem. A sejteket 48 órával a



transzfekció után mostam PBS-sel, összegyűjtöttem, feltártam, majd lemértem a luciferáz aktivitást Promega luciferase assay kit-et (Promega) használva, a gyártó utasításait követve. A transzfekció hatékonyságának meghatározásához a zöld fluoreszcens fehérjét termelő pKeteL-EGFP plazmidot is kotranszfektáltam a luciferáz riportert tartalmazó plazmiddal és a GFP pozitív sejtek számát FACS technikával detektáltam.

### 3.12. Immunoprecipitáció

A kísérletet S2 sejtextraktumon hajtottam végre, a kiindulási sejtszám  $10^7$  volt. A transzfekciót pAFW-Dmp53 vagy pAFW-Dmp53<sup>K302R</sup> plazmidokkal végeztem. A transzfekciót követően 48 órával mostam, majd összegyűjtöttem a sejteket, és lízispufferben (0,1% SDS; 0,2% NaDoc; 0,5% NP40; 150 mM NaCl; 50 mM TrisHCl pH 8,0) feltártam őket (1 óra, 4 °C-on történő inkubálás). A feltárási idő alatt a protein A sepharose (Sigma) gyöngyöket ekvilibráltam lízispufferrel, majd egy részéhez anti-DmSmt3 (Abgent) ellenanyagot adtam, a másik részéhez pedig az S2 sejt lizátumot, és 2 órán át 4 °C-on inkubáltam. Ezt követően a gyöngyöket centrifugáltam (2000rpm 2 perc), a lizátumot pedig az anti-DmSmt3 ellenanyagot kötő gyöngyökhöz adtam, és éjszakán át 4 °C-on rázogatva inkubáltam. Másnap a gyöngyöket lízispufferrel mostam, majd 2x SDS mintafelvívő puffert adtam hozzá, forraltam, és Western analízist hajtottam végre, ahol a filter előhívását M2 anti-FLAG (Sigma, USA) ellenanyaggal végeztem.

### 3.13. GST pulldown kísérletek

A *DmUba2* (511-700 aminosavak között), *DmUbc9* (11-159 aminosavak között), és *DmPias* (307-533 aminosavak között) géneket BamHI-XhoI enzimekkel kivágtam pACT2 plazmidból, majd pET28c-be klónoztam. A Dmp53C fragmentet EcoRI-SalI enzimekkel klónoztam át pGAD424 plazmidból pGEX4T1 plazmidba. A pGEX4T1-Dmp53C konstrukciót BL21 kompetens sejtekbe transzformáltam, majd 16 °C-on egy éjszakán át indukáltam a fehérjetermelést 1mM IPTG-vel. Másnap a sejteket lecentrifugáltam (10 perc, 4000rpm), és szonikációs pufferben (50 mM NaCl; 50 mM TrisHCl pH 7,9; 2 mM EDTA; 0,5 mM DTT) felfuszpendáltam, majd 10-szer 20 másodpercig, 20 másodperces szüneteket tartva ultrahanggal feltártam. A fehérje (GST-Dmp53C) tekintélyes része a felülúszóban volt, ezért centrifugálás (5 perc, 13000rpm) után ezzel dolgoztam tovább. A GST-Dmp53C fehérje

tisztítását Gluthatione Sepharose High Performance kit-tel (Amersham Biosciences) végeztem, a gyártó utasításait követve. Ezzel párhuzamosan a pET28c-Uba2, pET28c-Ubc9, pET28c-Pias konstrukciókról  $^3\text{H}$  leucinnal jelölt fehérjét készítettem a Promega cég T7-coupled reticulocyte lysate system kit-jét használva, a gyártó utasításai szerint. 22  $\mu\text{l}$  *in vitro* transzlált Daxx-like protein (DLP) fehérjét összekevertem 10  $\mu\text{l}$  gyöngyön kötött GST-Dmp53C fehérjével, majd 100  $\mu\text{l}$ -re egészítettem ki pull-down (PD) pufferrel (20 mM TrisHCl pH7,5, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA pH 8,0, 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1% Nonidet P40), és 4 °C-on 2 óra hosszáig inkubáltam. Ezt követően négyszer mostam 0,1% Nonidet P40-et tartalmazó PD pufferrel, majd egyszer Nonidet P40-et nem tartalmazó PD pufferrel. Az utolsó mosást követően 2xSDS mintapufferben vettem fel a mintákat, 5 percig forraltam, majd SDS fehérje gélelektroforézist végeztem. A gél fluorográfiás folyadékban (Amersham Biosciences) áztattam 30 percig, majd megszáritottam (40 perc, 80 °C), és zsugorfóliába csomagolva, autoradiográfiás kazettában röntgen filmet helyeztem rá.

## 4. Eredmények

### 4.1. A Dmp53 kölcsönhat a sumoilációban szerepet játszó fehérjékkel

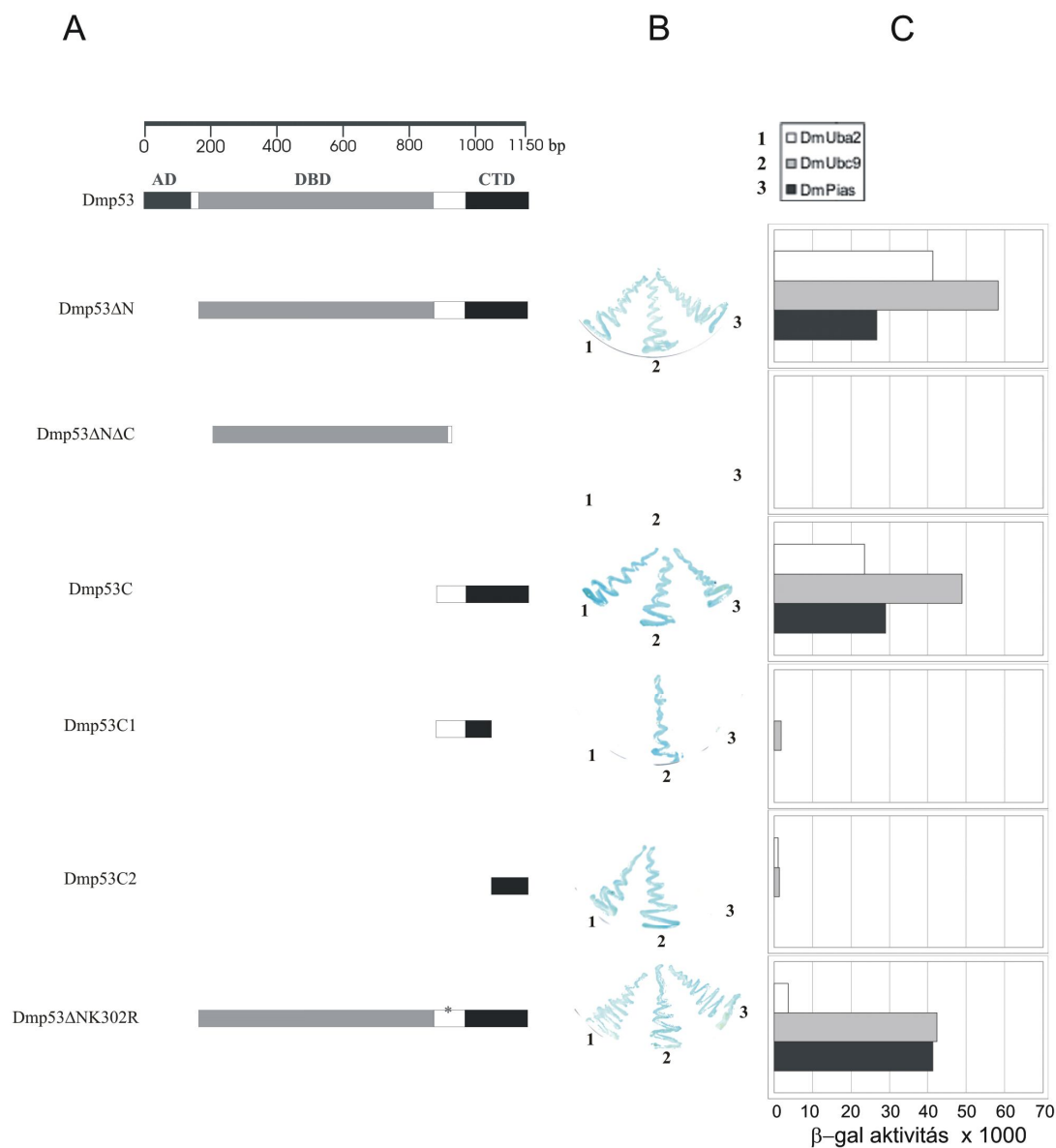
#### 4.1.1. Dmp53 kölcsönható partnerek azonosítása élesztő két-hibrid módszerrel

Csoportunk élesztő két-hibrid szűrést alkalmazva Dmp53 kölcsönható partnereket azonosított. Ehhez az N-terminális nélküli Dmp53-at klónoztuk a pBTM116 plazmidba, a teljes Dmp53-at hordozó pOT2 plazmidból. A kísérlet során azért használtuk az N-terminális nélküli Dmp53-at, mert a fehérje N-terminális régiója transzaktiváló tulajdonsággal rendelkezik, ezért a teljes hosszúságú Dmp53-mal végzett szűrés során fals eredmények sokaságát kaptuk volna, hiszen a Dmp53 önmagában is indukálta volna a  $\beta$ -galaktozidáz gén kifejeződését. Ezért a pBTM116-Dmp53 $\Delta$ N konstrukcióval végeztük el az élesztő két-hibrid szűrést *Drosophila melanogaster* pACT2 embrionális cDNS könyvtáron. Számos kölcsönható partnert találtunk, melyeket a BLAST program segítségével azonosítottunk a *Drosophila* genomban. Közülük a sumoilációban szerepet játszó E1 SUMO-aktiváló enzim-alegység, a DmUba2; az E2 SUMO-konjugáló DmUbc9 - amelyet lesswright-nak (lwr) neveznek -; valamint az E3 SUMO-ligáz DmPias - amelyet Su(var)2-10-nek hívnak - fehérjékkel folytatott vizsgálatok szerepelnek dolgozatomban.

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

A Dmp53 kölcsönható régióinak pontos meghatározásához a fehérje deléciós mutáns formáit állítottam elő: rendelkezésre állt az N-terminális nélküli fehérjét (Dmp53 $\Delta$ N) kódoló génszakasz, elkészítettem a gén N-és C-terminális nélküli (Dmp53 $\Delta$ N $\Delta$ C) darabját, majd azt a darabot, ami csak a C-terminálist kódolja (Dmp53C), végül ez utóbbit is két részre bontottam, Dmp53C1-re (ez kódolja az oligomerizációs domént) és Dmp53C2-re (ez kódolja az basic domént) (4/A. ábra). A fragmenteket pBTM116 plazmidba klónoztam, majd a korábban pozitív kölcsönhatást mutató sumoilációs enzimek génjeinek részeit tartalmazó pACT2 konstrukciókkal együtt kotranszformáltam őket L40 élesztő törzsbe. A kapott eredményeket a

4. ábrán foglaltam össze: valamennyi vizsgált fehérje a Dmp53 C-terminálisával lép kölcsönhatásba (4/B. ábra). A Dmp53-DmUba2 kölcsönhatáshoz a basic domén szükséges, a DmUbc9 külön-külön az oligomerizáció, illetve a basic doménnel is interakcióba lép, míg a Dmp53-DmPias kölcsönhatáshoz a teljes hosszúságú C-terminális domén elengedhetetlen (4/B. ábra). Az eredményeket szemi-kvantitatív  $\beta$ -galaktozidáz teszttel is megerősítettem (4/C. ábra). Ez utóbbi kísérlet azt is bizonyította, hogy ha nem áll rendelkezésre a teljes hosszúságú Dmp53 C-terminális régió, akkor a kölcsönhatások jelentősen gyengülnek (sőt a DmPias-szal meg is szűnnek).



#### **4. ábra: a Dmp53 C-terminális doménjén keresztül hat kölcsön a sumoilációs enzimekkel.**

A: A Dmp53 szerkezeti felépítése és az élesztő két-hibrid kísérletekhez használt Dmp53 deléciós mutáns fragmentek: N-terminális transzkripció aktivációs domén (AD), szekvenciaspecifikus DNS-kötő domén (DBD), C-terminális tetramerizációs domén (CTD)  
B, C: a hagyományos, illetve a szemi-kvantitatív  $\beta$ -galaktozidáz teszt eredménye alapján a Dmp53 teljes hosszúságú C-terminális doménje szükséges a DmPias fehérjével kialakított kölcsönhatáshoz, míg a DmUba2 az oligomerizációs, a DmUbc9 pedig külön-külön az oligomerizációs, illetve a basic doménnel is interakcióba tud lépni.

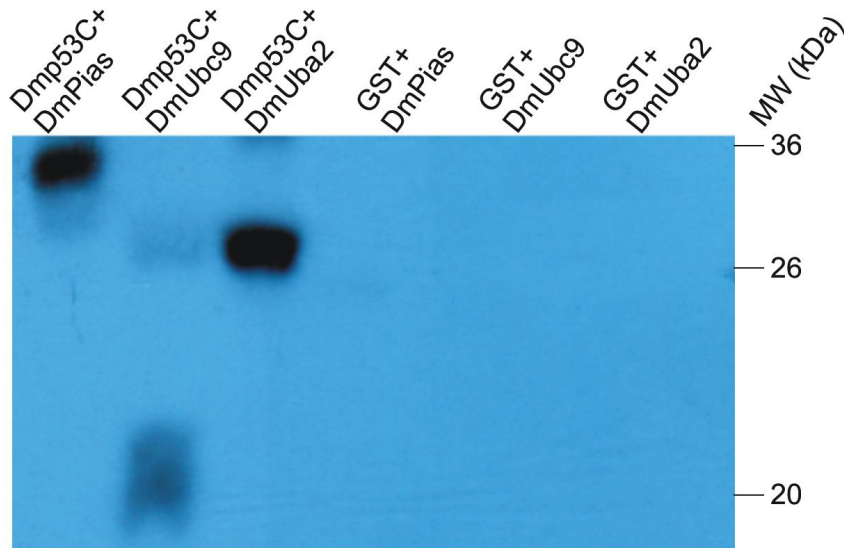
#### **4.1.3. A Dmp53 fehérjében található konszenzus SUMO akceptor hely elrontása nem befolyásolja a kölcsönhatásokat**

A SUMO módosítás a célfehérje meghatározott lizin aminosaván következik be. Számos sumoilációs lizin környezetét megvizsgálva az is nyilvánvalóvá vált, hogy felállítható egy, a módosításra jellemző konszenzus szekvencia. A Dmp53 teljes szekvenciáját átvizsgálva egy olyan helyet találtam, amely tökéletesen megfelel a sumoilációs konszenzus szekvenciának. Ennek kulcsfontosságú lizin aminosava a 302-es pozícióban található. PCR-rel végrehajtott helyspecifikus mutagenézissel a 302-es lizint argininre cseréltem (K302R), majd a fragmentet pBTM116 vektorba klónoztam. A restrikciós enzimekkel végrehajtott tesztelés során megfelelőnek bizonyuló klónban szekvenálással ellenőriztem a mutáció meglétét. Élesztő két-hibrid kísérletben azt találtam, hogy a mutáció nem befolyásolja az interakciókat, valamennyi sumoilációs fehérje továbbra is kölcsönhatásba lép a Dmp53-mal (4/B. ábra), habár a szemi-kvantitatív  $\beta$ -galaktozidáz tesztben kapott eredmény szerint a Dmp53-DmUba2 kölcsönhatás jelentősen meggyengül (4/C. ábra).

#### **4.1.4. A Dmp53 és sumoilációs enzimek közti kölcsönhatás megerősítése GST-pulldown kísérlettel**

Az élesztő két-hibrid rendszer alkalmas fehérje-fehérje kölcsönhatás kimutatására, de - különösen transzkripciós faktorok vizsgálata esetén - előfordulhat, hogy félrevezető eredményt kapunk. Ezért az ebben a rendszerben kapott eredményeket érdemes más módszerrel is megerősíteni. Ehhez GST-pulldown kísérleteket végeztem, amelyekben - az

élesztő két-hibrid rendszerben kapott eredményekhez hasonlóan - a Dmp53 C-terminális része kölcsönhatást mutatott a DmUba2, DmUbc9 és DmPias fehérjékkel (5. ábra).



**5. ábra: a Dmp53 C-terminális doménje vesz részt a sumoilációs enzimekkel történő kölcsönhatásban**

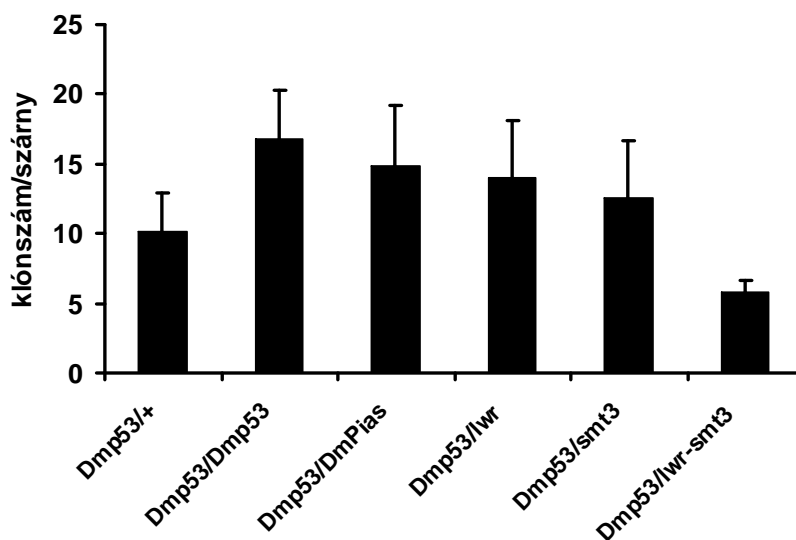
Balról jobbra az első három minta: az *in vitro* transzlált sumoilációs enzimek kötődése a Dmp53 C-terminális részéhez. Kontrollként a GST fehérjét használtam, amely nem hat kölcsön a sumoilációs fehérjékkel (balról jobbra az utolsó három minta). A DmPias, DmUbc9 és DmUba2 fehérjék tömege 25 kDa, 16 kDa, illetve 21 kDa.

## 4.2. A Dmp53 és a SUMO módosításban részt vevő fehérjéket kódoló gének közötti genetikai kölcsönhatás vizsgálata

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

A p53 egyik funkciója a genomban történő hibák felismerése és a javító mechanizmusok aktiválása (a p53 mutációk jelenlétének egyik fontos indikátora például az ionizáló sugárzást követően megemelkedő mutációs ráta). A genomban történő hibák felhalmozódásának mérésére alkalmas a LOH (Loss Of Heterozigosity assay) technika. A kísérlet során, a *Drosophila* szárnyon az *mwh* gén termékének hiányában kialakuló több szörszálalat eredményező fenotípus megjelenését vizsgáljuk. Ezt a rendszert használtam annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy vajon a muslicákban a sumoilációs aktivitás

csökkenése hatással van-e a *Dmp53* mutátor fenotípusára. Ehhez először *mwh/+* heterozigóta állatokat hoztam létre, amelyekben a kísérlet érzékenyítése céljából a *Dmp53* gén egy kópiája szintén eltávolításra került. Ezen az *mwh* és *Dmp53* heterozigóta háttéren hoztam létre olyan állatokat, amelyek *Su(var)2-10* (*DmPias*), vagy *lwr* (*DmUbc9*) vagy *smt3* (*DmSUMO*) heterozigóta mutánsok voltak (a sumoilációs génekre nézve homozigóta mutáns állatok elpusztulnak). A röntgensugárzás hatására bekövetkező mitotikus rekombináció következményeként *mwh* homozigóta klónok jönnek létre, amelyek a szárnyakon fenotípusuk alapján azonosíthatóak. A klónok száma alapján lehet következtetni a DNS hibajavítás hatékonyságára. Vad típusú állatokban (ahol a *Dmp53* jól működik) kevés klónt kapunk, *Dmp53* homozigóta mutáns muslicákban pedig megnövekszik a klónok száma. Ha a sumoiláció befolyásolja a *Dmp53* DNS károsodás javító képességét, akkor a klónok száma megváltozik a kontroll állatoknál kapott klónok számához képest. A kísérletsorozatban L3 lárva stádiumú állatokat 250 rad dózisú röntgensugárzással kezeltem, és a kikelő állatok szárnyszőrén létrejött fenotipikus változásokat vizsgáltam. Negatív, illetve pozitív kontrollként *mwh* heterozigóta háttéren *Dmp53* heterozigóta és homozigóta mutáns állatokat használtam. Azt az eredményt kaptam, hogy a sumoilációs gének egyik kópiájának elvesztése növeli a *Dmp53* mutátor fenotípusát (nőtt a klónok száma), ami azt sugallja, hogy a sumoiláció hiánya, vagy csökkent mértékű megvalósulása csökkenti a *Dmp53* DNS károsodások kijavítását biztosító aktivitását. Érdekes módon azonban a kísérletsorozatban a *lwr-smt3* dupla heterozigóta mutánsoknál a klónok számának csökkenését tapasztaltam, ami meglepő a *Su(var)2-10*, *lwr*, illetve *smt3* egyszeres heterozigóta mutánsoknál kapott eredményekkel összevetve (6. ábra).



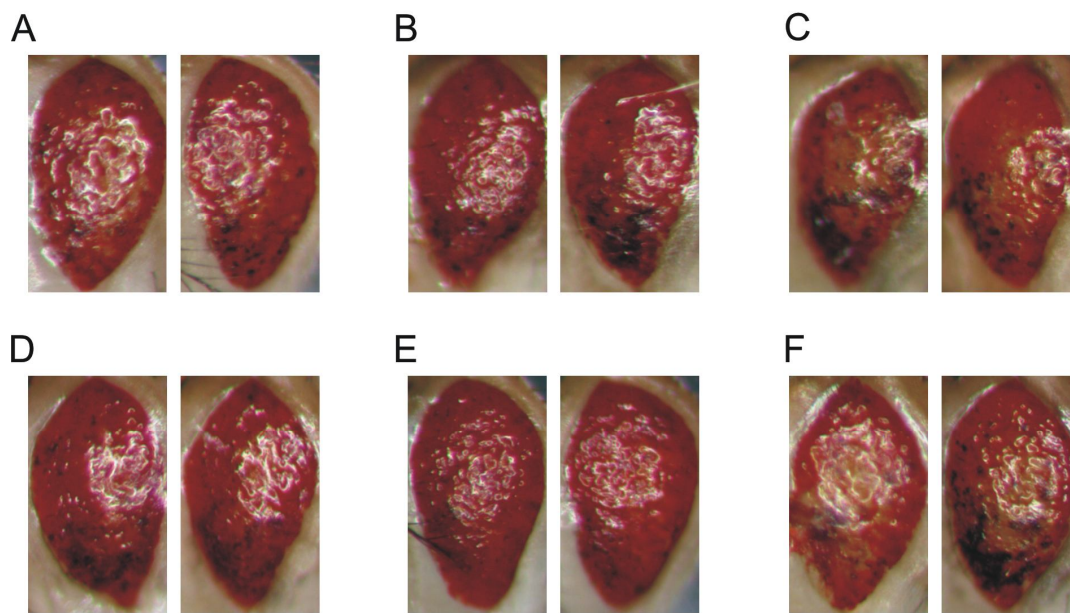
#### **6. ábra: a sumoilációs génnek egyik kópiájának elvesztése csökkenti a Dmp53 DNS javító aktivitását**

A sumoilációs génnek egyik kópiájának elvesztése LOH rendszerben a szárnyklónok számának növekedéséhez vezet. A *lwr-smt3* dupla heterozigóta mutánsoknál a klónok számának csökkenése figyelhető meg. Negatív, illetve pozitív kontrollként *mwh* heterozigóta háttéren *Dmp53* heterozigóta (*Dmp53/+*) és homozigóta (*Dmp53/Dmp53*) mutáns állatokat használtam. A diagram a szárnyankénti átlagos klónok számát mutatja három kísérletben, mintánként összesen több mint 20-20 szárny értékelése alapján. A vizsgált genotípusokat az ábra jelzi. Az oszlopokon feltüntettem a szórás értékeket.

#### **4.2.2. A sumoilációs enzimek csökkent mennyisége nem befolyásolja a Dmp53-túltermelés okozta szemfenotípust**

A Dmp53 állatokban történő túltermelése apoptózishoz vezet, amelynek fenotípusos megjelenése jól észrevehető. Megvizsgáltam, hogy a Dmp53 szemben történő túltermelése által okozott fenotípus hogyan változik, ha a *Su(var)2-10*, *lwr*, illetve *smt3* génnek csak egyetlen kópiában vannak jelen, vagyis a fehérjék csökkent mennyiségben termelődnek. A Dmp53 szemben történő túltermeléséhez a GMR-GAL4 drivert használtam. Kísérleteimben a rendelkezésre álló *lwr*, *smt3*, *lwr-smt3*, illetve *Su(var)2-10* heterozigóta mutáns állatok egyedeit kereszteztem a vad típusú Dmp53-at a GMR-GAL4 által túltermelő állatokkal, majd az utódok fenotípusait vizsgáltam (7. ábra C-F). Célszerűnek tartottam a GMR-GAL4 használatát, mert ennek segítségével a Dmp53-at az állatok szemében tudtam túltermelni, és a szemfenotípusok súlyosságát vizsgálva a sumoilációs fehérjék csökkent mennyiségének hatása jól nyomon követhető. A kísérleteket 29 °C-on végeztem, hogy a gyenge genetikai kölcsönhatásokat is könnyebben észrevehessem. Kontrollnak olyan Dmp53-at túltermelő állatokat használtam, amelyek vad típusú (7/A ábra), vagy Dmp53 null mutáns háttéren (7/B ábra) termelték túl a fehérjét. A két ábrarész összevetéséből jól látszik, hogy az endogén Dmp53 mennyisége elhanyagolható a túltermelt fehérjéhez képest, hiszen nem okoz látható fenotípus változást. Vizsgálataim során azt az eredményt kaptam, hogy a sumoilációs enzimek csökkent mennyisége nem befolyásolja lényegesen a Dmp53 túltermelés okozta durva szem fenotípust.





**7. ábra: a sumoilációs enzimek csökkent mennyisége nem befolyásolja a Dmp53 túltermelés okozta durva szem fenotípust,**

Az A és B ábrarész demonstrálja, hogy a Dmp53-at Dmp53 null mutáns háttéren túltermelő állatoknak (B) és a Dmp53 túltermelő valamint endogén Dmp53-at is tartalmazó állatoknak (A) ugyanolyan a fenotípusa. A csökkent mennyiségű lwr (C ábrarész), smt3 (D ábrarész), lwr-smt3 (E ábrarész), illetve Su(var)2-10 (F ábrarész) fehérjék hatása a Dmp53 szemben történő túltermelésére.

### **4.3. *In vivo* kísérletek a K302R mutáció Dmp53 működésére kifejtett hatásának vizsgálatára**

#### **4.3.1. A K302R mutációt hordozó Dmp53 transzgenikus állatok létrehozása**

Élesztő két-hibrid kísérlettel megállapítottam, hogy a Dmp53 kölcsönhat a sumoilációban szerepet játszó fehérjékkel, majd azonosítottam egy olyan helyet a Dmp53 fehérjében, amely potenciális célpontja lehet SUMO módosításnak. A konszenzus SUMO-akceptor hely kulcsfontosságú lizin aminosavát argininre cseréltem, és élesztő két-hibrid rendszerben azt találtam, hogy a pontmutáció nem befolyásolja az interakciókat. Ezért a mutáció hatásának *in vivo* vizsgálatára Dmp53 transzgenikus állatokat hoztunk létre. A vad típusú Dmp53-at túltermelő állatokat Michael W. Young laboratóriumából kaptuk. A Dmp53<sup>K302R</sup> fehérjét túltermelő állatok előállítására a pUAST-Dmp53<sup>K302R</sup> transzgént

embriókba injektáltuk, majd a kikelő transzgenikus állatokból homozigóta törzset hoztunk létre. Először mindössze egyetlen törzset sikerült előállítani, ezeknél az állatoknál a transzgén a 2. kromoszómán helyezkedett el. Később remobilizáltuk a transzgént és egy 3. kromoszómás törzset is készítettünk. Ezeket a transzgenikus törzseket a hagyományos P-elem inszerciós technikával hoztuk létre, amelyre jellemző, hogy a transzgén inszerciójának helye véletlenszerű. Ebből következik, hogy a transzgénről termelődő fehérje mennyiségét a genomi környezet befolyásolja. Munkánk kezdetekor ez az általánosan alkalmazott módszer állt rendelkezésünkre. Később megjelent az úgynevezett  $\phi$ C31 transzgén-integrációs rendszer [122], amelynek előnye, hogy helyspecifikus transzgén integrációt tesz lehetővé, amely megbízhatóbb összehasonlító vizsgálatokat tesz lehetővé. A munka második fázisában a módszernek az optimalizált változatát használtam helyspecifikus inszerciók létrehozásához [123]. Előállítottunk *Dmp53* és *Dmp53<sup>K302R</sup>* transzgént hordozó törzseket, amelyeknél a beépülés a muslica 2. vagy a 3. kromoszómájának ugyanabba a régiójába történt.

#### **4.3.2. A *Dmp53<sup>K302R</sup>* fehérje túltermelés okozta fenotípus jellemzése és összehasonlítása a vad típusú *Dmp53* túltermelés okozta fenotípussal**

##### **4.3.2.1. A *Dmp53* és *Dmp53<sup>K302R</sup>* fehérje szövetspecifikus és általános túltermelés okozta fenotípusok összehasonlítása**

A szakirodalomból jól ismert, hogy a *Dmp53* túltermelése apoptózis kialakulásához vezet [124, 126]. Vizsgálataim során arra voltam kíváncsi, hogy a fehérjét túltermelve látok-e fenotípus különbséget a vad típusú, illetve mutáns *Dmp53*-at expresszáló állatok között. Kísérleteimben az UAS-GAL4 rendszert használva általános és szövetspecifikus driverek segítségével hajtottam meg a transzgéneket, és a kapott fenotípusokat 25 °C-on, illetve az intenzívebb transzgén kifejeződés érdekében 29 °C-on vizsgáltam. Eredményeimet az 1. táblázatban valamint a 8. és 9. ábrán foglaltam össze. Jól látható, hogy akár a 2., akár a 3. kromoszómás random inszercióval létrehozott mutáns *Dmp53*-at túltermelő törzset használtam, erőteljesebb fenotípusokat kaptam, mint a vad típusú fehérjét túlexpresszáló törzsnél. Általános drivereket használva súlyosabbak a fenotípusok, mint szövetspecifikus driverek alkalmazása esetén. Az act-GAL4 és da-GAL4 által történő expresszió nagyon erőteljes hatású: a vad típusú *Dmp53*-at túltermelő állatoknak felel ki, míg a mutáns

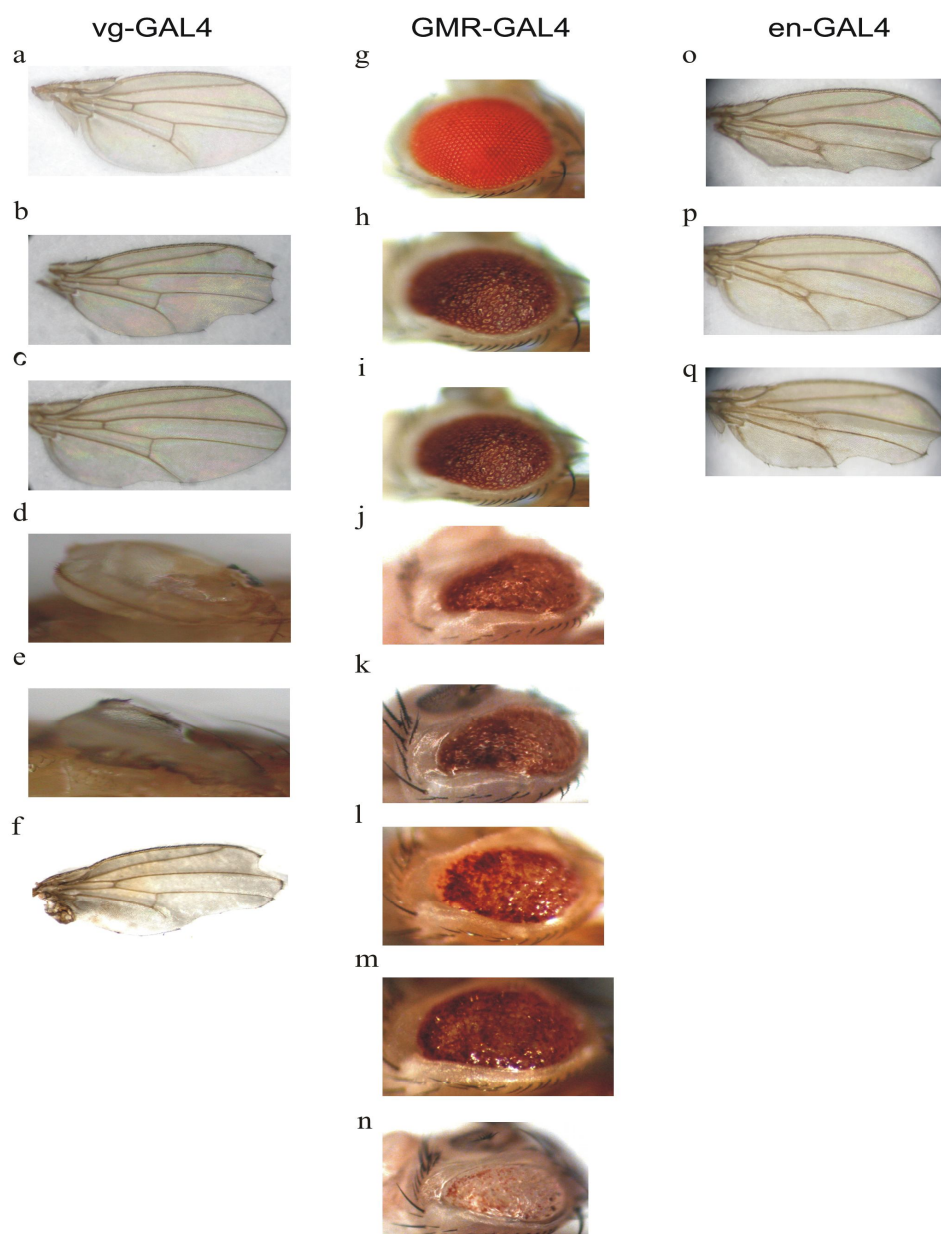
fehérjét kifejező állatok nagy része L2, illetve L3 stádiumban elpusztul (1. táblázat). A vg-GAL4 és en-GAL4 szövetspecifikus drivereket használva csipkézett szárny fenotípusokat kaptam, a mutáns Dmp53-at túltermelő állatok pedig sok esetben nem is kelnek ki, hanem korai fejlődési stádiumokban elpusztulnak (1. táblázat és 8. ábra).

GAL4 Driver	Driver kifejeződési mintázat	Fenotípusok		
		pUAST-Dmp53	pUAST-Dmp53 <sup>K302R</sup> (2. kromoszómás)	pUAST-Dmp53 <sup>K302R</sup> (3. kromoszómás)
actin5c (act)	általános	Letális farát adult stádiumban, 26%-os penetranciával n=185	75% letális L2, 25% L3 lárva stádiumban n=110	
		Letális különböző fejlődési stádiumokban	Letális L1-L2 lárva stádiumban	
daughterless (da)	általános	Letális farát adult stádiumban, 39%-os penetranciával n=132	90% letális L2 lárva stádiumban, 10% letális L3 lárva stádiumban n=115	68% letális L3 lárva stádiumban 32% letális előbáb stádiumban n=122
		Letális farát adult és báb stádiumban	Letális L1-L2 lárva stádiumban	
vestigial (vg)	Szárny diszkusz	Csipkézett szárnyak nőstény: 4% penetranciával hím: 77% penetranciával n=96	Csipkézett szárnyak	
		Csipkézett szárnyak nőstény: 9% penetranciával hím: 100% penetranciával n=93	hím: elpusztulnak farát adult stádiumban nőstény: 6% penetranciával csipkézett szárny n=85	
engrailed (en)	A szegmentek poszterior oldalán	nőstény: normál szárny hím: csipkézett szárny	hím: letális bábállapotban nőstény: csipkézett szárny	
		hím: Letális korai fejlődési stádiumokban nőstény: csipkézett szárnyak 38% penetranciával	Letális L1-L2 lárva stádiumban	
gmr	Szem diszkusz	Durva szem, a hímeknél erőteljesebben	Nagyon durva, kisméretű szem	Nagyon durva, kis méretű szem
		Durva szem, a hímeknél erőteljesebben	hím: letális bábállapotban nőstény: nagyon durva szem n=115	

**1. táblázat: a Dmp53 általános vagy szövetspecifikus túltermelése által okozott fenotípusok a random inszercióval létrehozott törzseken**

A táblázatban összefoglalt adatokból jól látható, hogy az általános kifejeződésű driverek súlyos fenotípusokat okoznak akár a vad típusú, akár a mutáns Dmp53-at túltermelő állatoknak, legtöbb esetben pedig a szövetspecifikus kifejeződésnek is jól érzékelhető hatása van. A Dmp53<sup>K302R</sup> fehérje túltermelése súlyosabb fenotípusokat okoz, mint a vad típusú protein túltermelése. 29 °C-on (szürke mezőkkel jelölve) erőteljesebb hatást látunk. „n” az állatok számát jelöli.

Ha a GMR-GAL4 driverrel a szemben fejeztettem ki a fehérjét, akkor is a mutáns állatoknál észleltem erőteljesebb hatást (1. táblázat és 8. ábra).

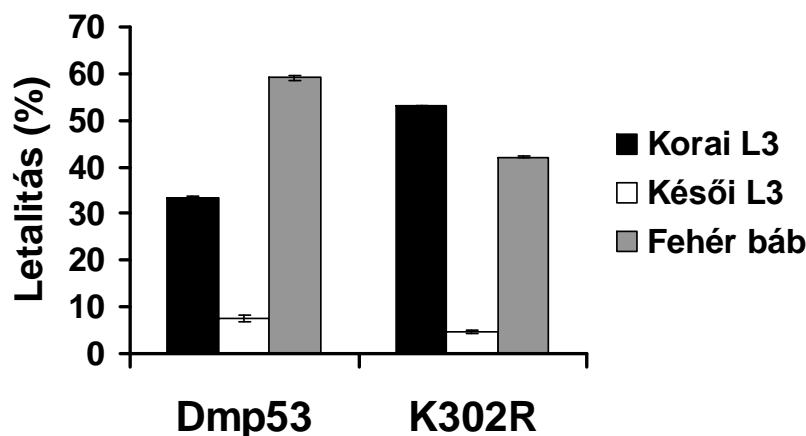


**8. ábra: a Dmp53 és Dmp53<sup>K302R</sup> fehérjék szövetspecifikus túltermelése által okozott fenotípusok, a random inszertálódott transzgén hordozó állatokban**

Balról az első oszlopban a fehérjét 25 °C-on, a vg-GAL4 driverrel túltermelő állatok fenotípusai láthatóak: a: vad típusú szárny; b: UAS-Dmp53 hím; c: UAS-Dmp53 nőstény; d: UAS-Dmp53<sup>K302R</sup> hím; e: UAS-Dmp53<sup>K302R</sup> nőstény; f: 2 kópia UAS-Dmp53 nőstény. A középső oszlopban GMR-GAL4 driver használatával, h-k 25 °C-on, l-n 29 °C-on kapott fenotípusok láthatóak: g: vad típusú szem h: UAS-Dmp53 hím; i: UAS-Dmp53 nőstény; j: UAS-Dmp53<sup>K302R</sup> hím; k: UAS-Dmp53<sup>K302R</sup> nőstény; l: UAS-Dmp53 hím; m: UAS-Dmp53 nőstény; n: UAS-Dmp53<sup>K302R</sup> nőstény. Az utolsó oszlopban az en-GAL4 driver használatával 25 °C-on kapott fenotípusok láthatóak: o: UAS-Dmp53 hím; p: UAS-Dmp53 nőstény; q: UAS-Dmp53<sup>K302R</sup> nőstény.

Megfigyelhető, hogy a hím állatok minden esetben súlyosabb fenotípusokat mutattak, mint a nőstények.

Amikor a helyspecifikus integrációval létrehozott törzseken vizsgáltam a Dmp53 túltermelés okozta fenotípusokat, sokkal kevésbé volt drámai a különbség a Dmp53, illetve Dmp53<sup>K302R</sup> fehérjéket túltermelő állatok között még da-GAL4 általános driver alkalmazása esetén is (9. ábra). A Dmp53<sup>K302R</sup> fehérjét túltermelő állatok nagyobb része az L3 lárv stádium korábbi szakaszában pusztul el, ahol az anterior spirákulum nevű képlet (amelynek kitűrése a lárv stádium végét jelzi) még nem jelenik meg. Ezzel szemben, a vad típusú fehérjét termelő állatok zöme az egyedfejlődés korai báb (fehér báb) stádiumáig él.

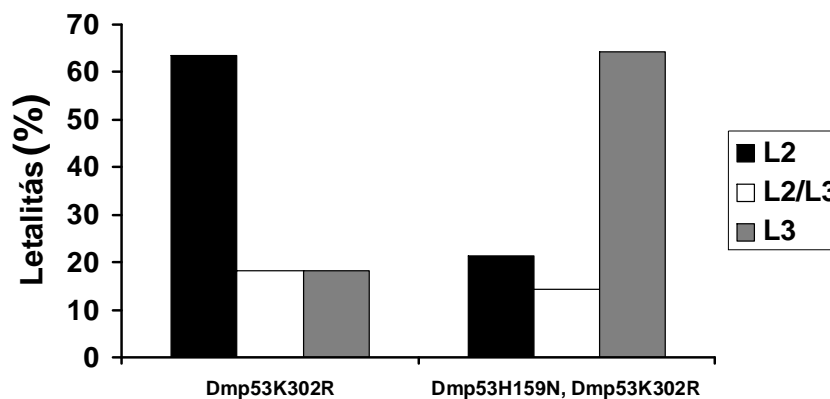


**9. ábra: A 3. kromoszómára helyspecifikusan integrálódott da-GAL4 driverrel meghajtott Dmp53, illetve Dmp53<sup>K302R</sup> transzgén hordozó állatok letálfázisa**

A kísérletben 3x80 állat fejlődése volt nyomon követve. A diagram azt mutatja, hogy az összes állat hány százaléka pusztult el az adott fejlődési stádiumban. Az ábrán a szórásértékeket is feltüntettem.

#### 4.3.2.2. A random inszercióval létrehozott $Dmp53^{K302R}$ mutáns állatokban a fehérje nagyobb mennyiségben van jelen

A random inszercióval létrehozott transzgenikus állatokon tapasztalt megfigyeléseim alapján a  $Dmp53^{K302R}$  fehérjét túltermelő állatok súlyosabb fenotípust mutatnak a vad típusú fehérjét túltermelő társaikhoz képest. Felvetődik a kérdés, hogy vajon a fehérje mennyisége határozza-e meg a fenotípusokat? Ennek eldöntésére két kísérletsorozatot hajtottam végre. Az elsőnél olyan muslicákat hoztam létre, amelyek két kópia vad típusú  $Dmp53$ -at tartalmaznak. A kérdés az volt, hogy ha ezeknél az állatoknál túltermeljük a fehérjét, akkor a két kópia miatti nagyobb mennyiségű fehérje erősíti-e a fenotípusokat. Azt az eredményt kaptam, hogy vg-GAL4 driverrel túltermelve a vad típusú fehérjét, súlyosodik a szárnyfenotípus (36. oldal, 8. ábra „f” kép, érdemes összevetni a „c” képpel, ami az egy kópiát tartalmazó állatokról készült). A másik kísérletnél egy speciális domináns negatív mutáns  $Dmp53$ -at tartalmazó muslicatorzset használtam fel: a  $Dmp53^{H159N}$  mutáns a DNS-kötő doménjében található pontmutáció miatt nem képes DNS-hez kötődni. Ha mind a  $Dmp53^{H159N}$ -et mind a  $Dmp53^{K302R}$ -et túlhajtottam act-GAL4 driverrel, akkor azt tapasztaltam, hogy enyhültek a fenotípusok a kontroll csoporthoz viszonyítva, ahol csak a  $Dmp53^{K302R}$ -et termeltettem túl (10. ábra). Ez a kísérlet is azt sugallja, hogy a  $Dmp53^{K302R}$  fehérjét túltermelő állatokban látott fenotípusok a termelt  $Dmp53$  miatt alakulnak ki (a fenotípus  $Dmp53$ -specifikus).



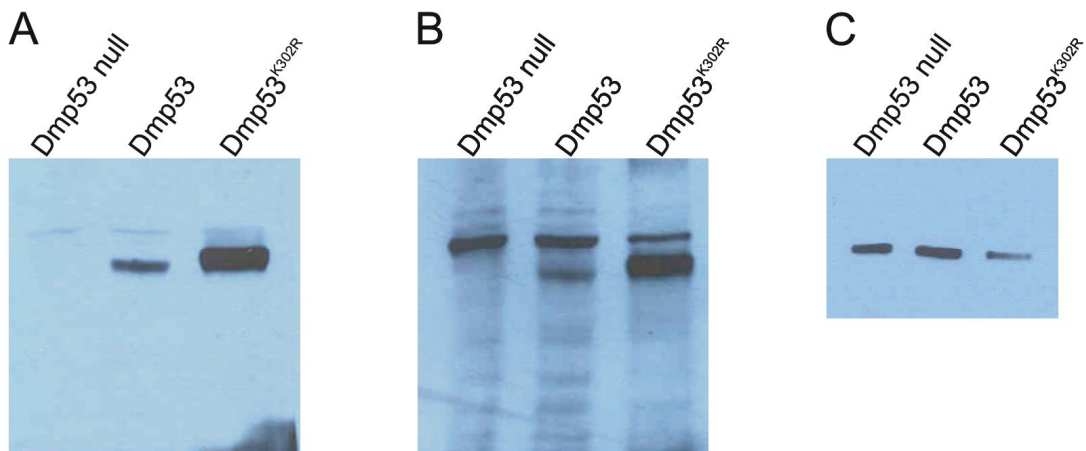
**10. ábra: a domináns negatív  $Dmp53^{H159N}$  és a  $Dmp53^{K302R}$  mutáns fehérje együttes túltermelése enyhíti a  $Dmp53^{K302R}$  fehérje túltermelése által okozott fenotípusokat**

A  $Dmp53^{K302R}$  fehérje önmagában, act-GAL4 driver segítségével történő túltermelése esetén az állatok zöme L2 lárva stádiumban pusztul el, míg a domináns negatív mutáns és a  $Dmp53^{K302R}$  fehérje együttes termelése eltolja a letálfázist, és az állatok zömében L3 stádiumban pusztulnak el. A kísérletben 3x40 állat fejlődése volt nyomon követve. A diagram azt ábrázolja, hogy az összes állat hány százaléka pusztult el az adott fejlődési stádiumban.

#### 4.3.3. A Dmp53 és Dmp53<sup>K302R</sup> fehérje szintjének és poszttranszlációs módosításainak vizsgálata

##### 4.3.3.1. A Dmp53 és Dmp53<sup>K302R</sup> fehérje expressziója szintjének és módosításainak vizsgálata

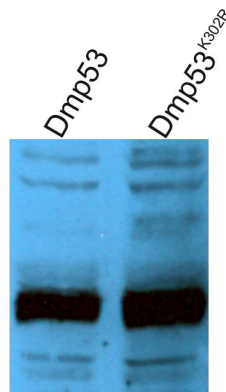
Miután megvizsgáltam a Dmp53 túltermelés okozta fenotípusokat transzgenikus állatokban, Western analízissel ellenőriztem a fehérje mennyiségét (11/A ábra). Vad típusú állatokból az endogén Dmp53 - valószínűleg a fehérje alacsony mennyisége miatt - Western analízissel nem detektálható. Ezért a random inszercióval előállított Dmp53 és Dmp53<sup>K302R</sup> túltermelő állatokat da-GAL4 drivertörzzsel kereszteztem, majd L2 stádiumú lárvákat gyűjtöttem. Ezekből fehérjepreparátumot készítettem, majd Western kísérletet végeztem. Kontrollként Dmp53 null mutáns állatokból készített mintát használtam. A meghajtott, pontmutáns transzgént hordozó állatokban a fehérje nagyobb mennyiségben van jelen. Ez a magasabb fehérjeszint okozhatja a mutáns állatokban az erőteljesebb fenotípusokat is. Ugyanezen mintákból (ugyanezen a filteren) megpróbáltam a Dmp53 SUMO-módosított formáját is detektálni, de nem volt kimutatható (11/B ábra), a Dmp53-at reprezentáló csík fölött látható jel aspecifikus, mert a Dmp53 null mutáns állatokból származó mintában is látható. A filtert anti-tubulin ellenanyaggal is előhívtam annak kimutatására, hogy az egyes mintákból azonos mennyiségeket vittem fel, és a Dmp53 mennyiségében tényleges eltérés van az egyes állatcsoportok között (11/C ábra).



**11. ábra: a random integrálódott transzgént tartalmazó Dmp53<sup>K302R</sup> transzgenikus állatokban a termelt Dmp53 fehérje nagyobb mennyiségben van jelen, mint a vad típusú fehérjét túltermelő állatokban**

Dmp53 null, UAS-Dmp53, UAS-Dmp53<sup>K302R</sup> állatokból származó fehérje kivonatokat tartalmazó filtert A: anti-Dmp53 ellenanyaggal B: anti-Dmsmt3 ellenanyaggal és C: anti- $\alpha$  tubulin ellenanyaggal hívtam elő.

Ellenőriztem a fehérjék mennyiségét azokban a muscicatrörzsekben is, amelyekben a Dmp53 és a Dmp53<sup>K302R</sup> transzgén helyspecifikusan integrálódott, és nem találtam jelentős különbséget köztük. Annak fényében, hogy ezeknél a törzseknél a fenotípusokban is sokkal kisebb különbséget találtam, a kapott eredmény nem meglepő.



**12. ábra: a helyspecifikusan integrálódott transzgént tartalmazó törzsekben a Dmp53<sup>K302R</sup> és a vad típusú fehérje mennyiségének összehasonlítása**

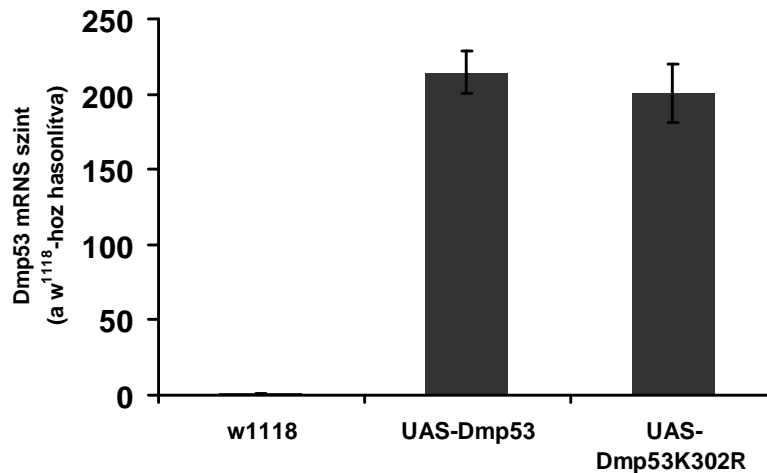
Dmp53-at (1) és Dmp53<sup>K302R</sup>-at túltermelő (2) állatokból származó fehérje kivonatokat tartalmazó filtert anti-Dmp53 ellenanyaggal hívtam elő.

**4.3.3.2. A Dmp53 mRNS szintjének vizsgálata a random inszerciós transzgenikus állatokban**

Kísérleteimben azt találtam, hogy a Dmp53<sup>K302R</sup> pontmutáns fehérjét túltermelő állatokban megemelkedett a fehérje szintje, ezért ezeknél a legyeknél súlyos fenotípusok figyelhetők meg. Adja magát a kérdés: vajon csak a genomi környezet eltérése miatt termelődik több fehérje, vagy stabilizálódik a mutáns fehérje? A hagyományos P-elem inszerciós technikával létrehozott transzgenikus *Drosophila* törzsekben a genomi környezet különbözőképpen befolyásolhatja a génkifejeződés intenzitását. Ennek vizsgálatára Q-RT-PCR és Northern blot technikákat alkalmaztam, amelyek alkalmasak arra, hogy a génről képződő mRNS mennyiségét meghatározzam.



A Q-RT-PCR-hez minden mintából L2 stádiumban levő lárvákat gyűjtöttem, majd össz-RNS-t tisztítottam. Mint a 13. ábra mutatja, a meghajtott 2. kromoszómás Dmp53<sup>K302R</sup> mutáns állatokban nem magasabb (sőt kissé alacsonyabb) a képződő mRNS szintje, mint a vad típusú fehérjét túltermelő társaikban. Ez azt jelenti, hogy a mutáció miatt a transzkriptum mennyisége nem növekszik meg, tehát a korábbi kísérletekben látott fehérjeszint növekedés a Dmp53<sup>K302R</sup>-at túltermelő transzgenikus állatokban nem a genomi környezet befolyásoló hatása miatt van.

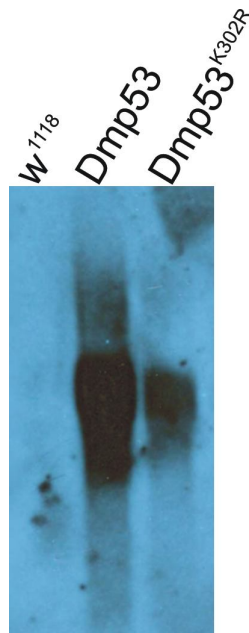


**13. ábra: a Q-RT-PCR kísérlet alapján a random inszerciós, Dmp53<sup>K302R</sup>-at túltermelő állatokban közel azonos a képződő mRNS szintje, mint a vad típusú fehérjét túltermelő társaikban**

Az ábrán a vad típusú és K302R mutáns Dmp53-at túltermelő törzsekben képződő Dmp53 mRNS mennyisége látható a w<sup>118</sup> kontroll törzshöz viszonyítva. A kísérletet háromszor ismételt meg, az ábrán a szórást is feltüntettem.

A Northern blothoz L2 stádiumban levő lárvákból tisztított össz-RNS-t használtam, a kísérlet eredménye a 14. ábrán látható. A Northern blot esetén a Q-RT-PCR eredményével egybevágó volt tapasztaltam. Az utóbbi kísérlet is azt mutatja, hogy a K302R mutációt hordozó Dmp53-at túltermelő állatokban nem magasabb a transzgenről képződő mRNS mennyisége, mint a vad típusú fehérjét túltermelő társaikban, tehát a fehérje a mutáció következtében halmozódik fel. Nem tudtam kimutatni a Dmp53 mRNS-t a w<sup>118</sup> törzsnél (14. ábra, balról az első oszlop), vagyis az endogén Dmp53 mRNS szintje nagyon alacsony a sejtekben, ami nem meglepő, hiszen a humán megfelelőjéről tudjuk, hogy csak stresszhatásra emelkedik meg a mennyisége. Ennek megfelelően az sem meglepő, hogy a Western analíziseim során az endogén Dmp53 nem volt kimutatható, csak a túltermelő állatoknál

tudtam a fehérjét detektálni. Az endogén Dmp53 kimutatásához érzékenyebb ellenanyag alkalmazása szükséges, amely azonban jelenleg kereskedelmi forgalomban nem kapható.



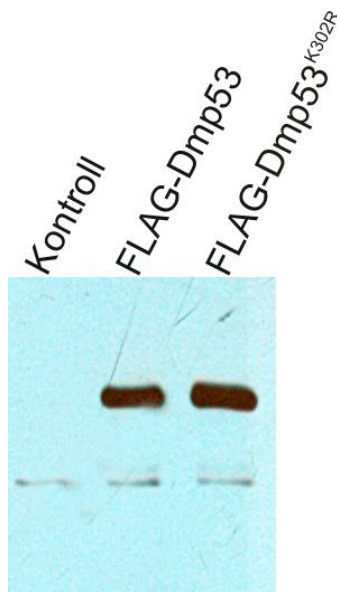
**14. ábra: Northern analízis alapján a random inszerciós Dmp53<sup>K302R</sup> mutáns állatokban alacsonyabb a képződő mRNS szintje, mint a vad típusú fehérjét túltermelő társaikban**

Balról jobbra haladva az 1. oszlopban az látható, hogy az endogén Dmp53 mRNS szint rendkívül alacsony, Northern analízissel nem kimutatható. A 2. oszlopban a vad típusú fehérjét túltermelő állatokban mérhető Dmp53 mRNS mennyisége látható, ami magasabb, mint a Dmp53<sup>K302R</sup> fehérjét túltermelő állatokban mérhető mRNS (3. oszlop).

#### 4.3.3.3. A Dmp53 és Dmp53<sup>K302R</sup> fehérje expressziójának és módosításának vizsgálata S2 sejtekben

Megvizsgáltam, hogy kimutatható-e, hogy a Dmp53 ténylegesen a 302. lizinjén keresztül sumoilálódik. Először ecetmuslica egyedeken végzett Western analízis segítségével próbáltam kimutatni a módosítást (11. ábra). A kísérlet nem járt pozitív eredménnyel, aminek oka valószínűleg a sejtekben nagyon kis mennyiségben jelenlevő Dmp53 fehérje, amelynek endogén formáját nem is tudtam detektálni. A túltermelt fehérje jól kimutatható, de módosítás ezen sem detektálható (11. ábra). A sumoiláció vizsgálatára gyakran használják a módosítás sejt kultúrában történő kimutatását. Én is megpróbáltam a SUMO-módosítás S2 sejtekben történő kimutatását. Ehhez olyan plazmidokat hoztam létre, amelyek segítségével a Dmp53 és Dmp53<sup>K302R</sup> fehérjék 3-szoros FLAG címkével ellátott formáit tudtam sejtekben termeltetni. Első lépésben megvizsgáltam, hogy a túltermelt fehérjén Western blottal kimutatható-e

módosítás. Az analízis szerint poszttranszlációs modifikációra utaló, megváltozott mobilitású fehérjeforma nem detektálható (15. ábra). Ezt követően immunoprecipitációval próbálkoztam: nagyobb mennyiségű S2 sejtet transzfektáltam, és ebből próbáltam meg kicsapni a Dmp53-at. E kísérlet többszöri ismétlésével sem kaptam olyan eredményt, ami a fehérje módosítására utalna.



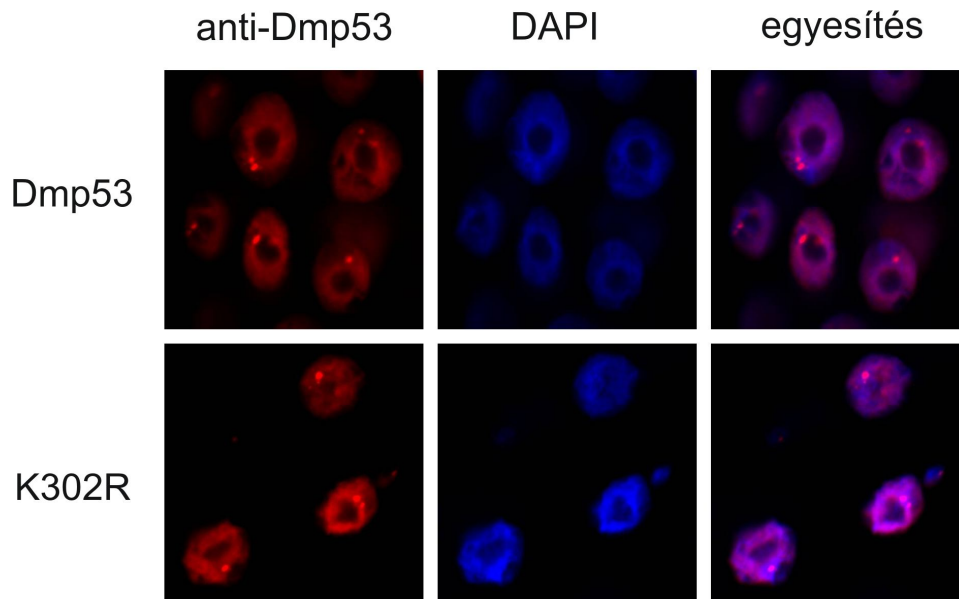
**15. ábra: Az S2 sejtekben túltermelt FLAG-Dmp53 fúziós fehérjén nem lehetett poszttranszlációs módosítást detektálni**

Balról jobbra haladva: túltermelt Dmp53-at nem tartalmazó (kontroll) minta, Dmp53 fehérje túltermelés, Dmp53<sup>K302R</sup> fehérje túltermelés. A filtert M2 anti-FLAG ellenanyaggal hívtam elő.

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

A sumoiláció egyik ismert hatása lehet a módosított fehérje sejtbeli elhelyezkedésének megváltoztatása. Ezért megvizsgáltam, hogy van-e különbség a vad típusú és a mutáns Dmp53 fehérje sejtben belüli elhelyezkedésében. Ehhez rendelkezésemre álltak a vad típusú, illetve a K302R mutáns Dmp53-at túltermelő transzgenikus muslicák (a kísérletben a helyspecifikus inszerciós törzseket használtam), valamint anti-Dmp53 ellenanyag is. Mindkét állatcsoportban act-GAL4 driverrel túltermeltettem a fehérjét, és L3 fejlődési stádiumban lévő lárvákból preparált nyálmirigyeken immunfestést hajtottam végre. Kísérleteimben azt az

eredményt kaptam, hogy mind a vad típusú, mind a K302R mutáns fehérje a sejtmagban helyezkedik el, tehát a mutáció eredményeképpen nem változik meg lokalizációja (16. ábra).



**16. ábra: a Dmp53 és Dmp53<sup>K302R</sup> fehérje is a sejtmagban helyezkedik el**

A képen L3 fejlődési stádiumban levő act-GAL4 driverrel kifejeztetett Dmp53, illetve Dmp53<sup>K302R</sup> túltermelő állatok nyálmirigy sejtjei láthatóak, anti-Dmp53 ellenanyaggal, illetve DAPI-val festve. Mind a vad típusú, mind a mutáns fehérje a perinukleoláris térben helyezkedik el, ahol kis szubnukleáris testecskék felépítésében vesznek részt.

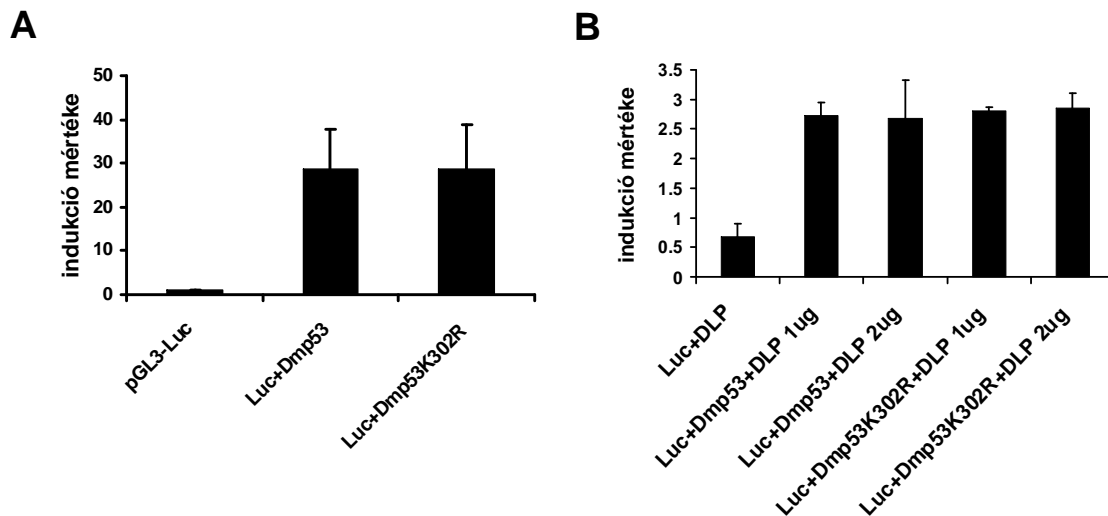
#### **4.3.5. Sem a Dmp53-ban létrehozott K302R mutáció sem a DLP fehérje jelenléte nem változtatja meg a Dmp53 transzkripció aktivitását**

A p53 nagyszámú gén transzkripcióját szabályozza azzal, hogy képes specifikus p53 válaszelemekhez kötődni és ezáltal fokozni vagy csökkenteni az adott gén transzkripcióját. A sumoiláció számos esetben megváltoztatja a módosított fehérje transzkripció aktivitását.

Ha a Dmp53 302. pozícióban található lizin aminosava ténylegesen a SUMO-módosítás célpontja, akkor a szakirodalmi adatok ismeretében várható, hogy az aminosav megváltoztatása a Dmp53 transzkripció aktivitásának módosulását is maga után vonja. Ennek vizsgálatára luciferáz aktivitásmérést végeztem S2 embrionális *Drosophila* sejteken. A luciferáz riportert tartalmazó pGL3-Luc plazmidba klónoztam a *reaper* gén p53 válaszelemét, majd a plazmidot a Dmp53-at vagy Dmp53<sup>K302R</sup>-at kifejező plazmidokkal

együtt S2 sejtekbe juttatva a Dmp53 és Dmp53<sup>K302R</sup> transzkripcióra gyakorolt hatását tudtam mérni. A kísérletben azt az eredményt kaptam, hogy a K302R mutációt hordozó Dmp53 transzkripció aktivitása nem változott meg lényegesen (17/A ábra). Amennyiben a 302. lizin valóban sumoilációs hely, ez az eredmény azt jelenti, hogy a SUMO-módosítás a Dmp53 transzkripció aktivitására nincs számottevő hatással.

A Daxx (death domain associated factor 6) fehérje a humán p53 egyik moduláló kofaktora. A két fehérje képes kapcsolódni egymáshoz, és a Daxx részt vesz a p53 transzkripció aktivitásának szabályozásában, bár a folyamat mechanizmusáról rendelkezésre álló adatok ellentmondásosak [124-126]. Korábbi (a dolgozatban nem szereplő) kísérleteimben azt találtam, hogy a Daxx fehérje *Drosophila melanogaster* ortológja, a Daxx-like protein (DLP), kölcsönhat a Dmp53-mal. Ezért S2 sejtekben megvizsgáltam, hogy a DLP van-e bármilyen hatással a Dmp53 transzaktiváló képességére. A már fentebb ismertetett pGL3-Luc plazmiddal együtt kotranszfektáltam DLP-t, valamint vagy Dmp53-at, vagy Dmp53<sup>K302R</sup> fehérjét kifejező plazmidokat. A 17/B ábrán összefoglalt eredmények alapján a DLP nincs lényeges hatással sem a vad típusú, sem a K302R mutáns fehérje transzkripció aktiváló képességére.



**17. ábra: sem a Dmp53-ban létrehozott K302R mutáció sem a DLP fehérje jelenléte nem változtatja meg a Dmp53 transzkripció aktivitását**

A: az első oszlopban a kontroll minta látható, ahol csak a pGL3-Luc plazmidot transzfektáltam. A következő két oszlop a vad típusú és K302R mutáns Dmp53 transzaktiváló képességét mutatja. B: Az első oszlop bizonyítja, hogy a DLP nem aktiválja a pGL3-ban található p53 válasz elem hatására a luciferáz riportert. Az következő négy oszlopban azokat az eredményeket tüntettem fel, ahol 1 vagy 2 µg DLP-t kifejező plazmidot is kotranszfektáltam a vad típusú vagy mutáns Dmp53-at és a luciferáz riportert kifejező plazmidok mellé. A transzfektált DNS mennyisége (a DLP kivételével) minden mintánál 1-1 µg volt. A kísérleteket háromszor végeztem el, az ábrákon a szórás értékeket is feltüntettem.

## 5. Az eredmények megvitatása

A *p53* tumor szuppresszor gén mutációja a különböző típusú daganatos sejtek jelentős részében, több mint 50%-ában megtalálható, ezért a molekuláris biológiai kutatások egyik központi elemévé vált, és 30 évvel ezelőtti felfedezése óta több tízezer publikáció foglalkozott vizsgálatával. A génről képződő fehérje kis mennyiségben van jelen normál állapotú sejtekben, de a sejtet érő különböző stresszhatásokra (DNS károsodás, hipoxia [44], hipo- és hipertermia [53, 54], stb...) aktiválódik, és stabilizálása miatt mennyisége megnövekszik. A fehérje számos fontos funkcióval rendelkezik: a stresszhatásokra adott válaszként képes leállítani a sejtciklust, a sejtet ért súlyos károsodások esetén apoptózist idéz elő, gátolja az érképződést tumorokban, és szerepet játszik a sejt differenciálódás indukciójában. A *p53* számos funkciója közül egyik legfontosabb a transzkripcióban betöltött sokoldalú szerepe: a fehérje képes specifikus *p53* válasz elemekhez kötődni, és ezáltal fokozni vagy csökkenteni bizonyos gének transzkripcióját. Közvetlenül a transzkripciós faktorok gátlásával transzkripciós blokkot is ki tud váltani [127, 128]. A *p53* számos funkciója révén központi szerepet játszik a genom integritásának megőrzésében, ezért mintegy a genom őrangyalaként működik.

A *Drosophila melanogaster p53 (Dmp53)* gént 2000-ben három független amerikai csoport azonosította [111-113]. A *Dmp53*-ról azóta számos közlemény jelent meg, melyekben kimutatták, hogy a fehérjének részben hasonló szerepe van, mint a humán ortológjának. A *Dmp53 in vivo* apoptotikus aktivitását a fehérje szemben történő ektoikus expressziójával mutatták ki [111, 113]. Az emlős *p53*-mal ellentétben a vad típusú *Dmp53* túltermelése nem idézte elő a sejtciklus G1 fázisban történő leállítását [113]. Mivel a *Drosophilában* nem ismert Mdm2 ortológ, feltételezhető, hogy a *Dmp53* a humán fehérjétől eltérő módon szabályozódik. Szabályzásában szerepet játszik a DmChk2 kináz, amely a *Dmp53* foszforilálásán keresztül [117] a DmATM molekulával együtt szükséges az ionizáló sugárzás által kiváltott apoptózishoz [118, 119]. Megállapították azt is, hogy az ATR ecetmuslica ortológja, szintén szerepet játszik a DNS károsodásra adott *p53*-válaszban [119].

A *p53* szabályozásában kulcsfontosságúak a fehérje N- és C-terminálisán bekövetkező poszttranszlációs módosítások: foszforiláció, metiláció, acetiláció, ubiquitináció, sumoiláció. Munkánk kezdetekor számos *Dmp53* kölcsönható fehérjét azonosítottunk, köztük a sumoilációban szerepet játszó faktorokat is. Mivel a humán *p53* a SUMO-módosítás

célfehérjéje, és sumoilációs enzimeket azonosítottunk, mint Dmp53 kölcsönható partnereket, valamint a Dmp53 szekvenciában potenciális sumoilációs helyet találtam, célként tűztem ki, hogy meghatározzam vajon a fehérje ténylegesen SUMO célpont-e és ha igen, mi a módosítás *in vivo* szerepe.

Vizsgálataink kezdetekor élesztő két-hibrid kísérletben azt találtuk, hogy a Dmp53 kölcsönhat a DmUba2 E1 SUMO aktiváló, a DmUbc9 E2 SUMO konjugáló és a DmPias E3 SUMO ligáz enzimekkel. Ugyanezt a rendszert használva megállapítottam, hogy a Dmp53 C-terminális doménje vesz részt az ezekkel a fehérjékkel kialakított kölcsönhatásban. A C-terminális funkcionálisan két részre bontható: a fehérje tetramerizációját biztosító oligomerizációs, és az úgynevezett basic doménre. A Dmp53-DmUba2 kölcsönhatáshoz a basic domén szükséges, a DmUbc9 külön-külön az oligomerizációs, illetve a basic doménnel is interakcióba lép, míg a Dmp53-DmPias kölcsönhatás kialakításában a teljes hosszúságú C-terminális domén részt vesz. Az élesztő két-hibrid rendszerben kapott eredményeket GST-pulldown kísérlettel erősítettem meg, amely ugyancsak azt mutatta, hogy a Dmp53 C-terminálisával hat kölcsön a sumoilációs enzimekkel.

A Dmp53 szekvenciájában egy sumoilációs konszenzus szekvenciának tökéletesen megfelelő aminosavrészt találtam. A szekvenciában található kulcsfontosságú lizint PCR-rel végrehajtott helyspecifikus mutagenézissel argininre cseréltem (K302R), majd élesztő két-hibrid kísérletben vizsgáltam, hogy a mutáció befolyásolja-e az interakciókat az előbbieken bemutatott kölcsönható fehérjékkel. Azt az eredményt kaptam, hogy valamennyi sumoilációs fehérje kölcsönhatásba lép a K302R mutáns Dmp53-mal is. Ennek magyarázata lehet, hogy a DmUba2, DmUbc9 és DmPias fehérjék nem kötődnek a Dmp53 302-es lizinjének környezetében levő aminosav részletéhez, így az aminosav csere nem változtatja meg a kölcsönhatásokat.

Az *ecetmuslica* modell lehetőséget kínált a Dmp53 és a sumoilációs enzimeket kódoló gének közötti genetikai kölcsönhatás vizsgálatára. A kísérletekben a DNS károsodás hatására indukálódó javítási folyamatok hatékonysága alapján kíséreltem meg a sumoiláció szerepét kimutatni a Dmp53 működésében. A p53 szerepe a DNS károsodás által indukált javítási folyamatok aktiválásában jól ismert [55-59]. Ez a funkció konzerválódott, mert *Drosophilában* végzett kísérletek is azt mutatták, hogy a genotoxikus stresszhatások (például röntgensugárzás okozta DNS károsodás) Dmp53-at aktiválnak, amely aztán pro-apoptotikus géneket (*reaper*, *híd*, *grim*) kapcsol be [114, 115]. Brodsky és munkatársai leírták, hogy a *Drosophilában* is azonosított Chk2 kináz (DmChk2) foszforilálja a Dmp53-at [117], mások pedig azt találták, hogy a DmChk2 és a *Drosophila* ATM (DmATM) szükséges az ionizáló



sugárzás által kiváltott apoptózishoz [118, 119]. Megállapították azt is, hogy az ATR ecetmuslica ortológia szintén szerepet játszik a DNS károsodásra adott p53-válaszban [119]. Ecetmuslicában a genomban történő hibák felhalmozódásának mérésére alkalmas a LOH rendszer, amelyben a *Drosophila* szárnyon az *mwh* gén termékének hiányában kialakuló fenotípust vizsgáljuk. Ezt a rendszert használtam annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy vajon a muslicákban a sumoilációs gének egyik kópiájának elvesztése hatással van-e a *Dmp53* mutátor fenotípusára. *mwh* és *Dmp53* heterozigóta háttéren hoztam létre olyan állatokat, amelyek *Su(var)2-10*, vagy *lwr*, vagy *smt3* vagy *lwr-smt3* heterozigóta mutánsok, és azt vizsgáltuk, hogy ezekben röntgensugárzás hatására a szárnyklónok száma hogyan változik. Eredményeim szerint a sumoilációs gének egyik kópiájának elvesztése növeli a *Dmp53* mutátor fenotípusát (nőtt a klónok száma), ami azt sugallja, hogy a sumoiláció hiánya vagy csökkent mértékű megvalósulása csökkenti a *Dmp53* DNS károsodások kijavítását biztosító aktivitását. Érdekes módon a kísérletsorozatban a *lwr-smt3* dupla heterozigóta mutánsoknál a klónok számának csökkenését tapasztaltam. Ez ellentmondásban áll a *Su(var)2-10* vagy *lwr* vagy *smt3* egyszeres heterozigóta mutánsoknál kapott eredményekkel, ami esetleg azzal magyarázható, hogy a *lwr-smt3* dupla heterozigóta mutáns állatoknál más faktorok is befolyásolták a *Dmp53* aktivitását. Tovább bonyolítja a képet, hogy amikor az alacsonyabb géndózis hatását vizsgáltam a *Dmp53* szemben történő túltermelésére, a *lwr* vagy *smt3* vagy *lwr-smt3* vagy *Su(var)2-10* gének egyetlen kópiája ugyanolyan hatású, mintha mindkét kópia jelen lenne, tehát az egyik génkópia elvesztése nem okoz lényeges szemfenotípus-változást a *Dmp53* túltermelés esetén. A LOH rendszerben, illetve ez utóbbi kísérletben kapott eredmények látszólagos ellentmondásban vannak. Azonban ez feloldható azzal, ha belegondolunk, hogy a két módszer a *Dmp53* valamelyest eltérő, más közreműködőkön keresztül megvalósuló aktivitását méri. A LOH rendszer valószínűleg érzékenyebb a SUMO módosításra, ezért az *smt3*, *lwr*, illetve *Su(var)2-10* gének jelenléte, illetve hiánya látható fenotípus különbségeket okoz.

A *Dmp53* további *in vivo* vizsgálatát a fehérje transzgenikus állatokban történő vizsgálatával folytattam. Vizsgálataim során azt szerettem volna megtudni, hogy a fehérjét túltermelve látható-e fenotípus különbség a vad típusú, illetve a *Dmp53*<sup>K302R</sup> fehérjét expresszáló állatok között. Kísérleteimben két *Dmp53*<sup>K302R</sup> fehérjét túltermelő törzset használtam, egyik a 2., a másik pedig a 3. kromoszómára beépült transzgént tartalmazott. Akár a 2., akár a 3. kromoszómás mutáns *Dmp53*-at termelő törzset használtam, erőteljesebb fenotípusokat kaptam, mint a vad típusú fehérjét expresszáló törzsnél. Általános drivereket használva (amelyek az állatban mindenhol kifejezik a fehérjét) erőteljesebbek a fenotípusok,

mint szövetspecifikus driverek esetén (ezek csak adott szervben, szövetben expresszálják a fehérjét). Megfigyeltem, hogy a hím állatok minden esetben erőteljesebb fenotípusokat mutattak, mint a nőstények. Ennek egyik lehetséges magyarázata lehet a *Drosophilában* ismert dóziskompenzációs mechanizmus: a hím állatok X kromoszómáján található gének aktívabban működnek a nőstényekéhez képest. Az állatokba bevitt transzgénjeink tartalmazzák a *miniwhite* gént, amely (pontosabban a *white*) az X kromoszómán helyezkedik el. Valószínűleg a *white* gén szabályozó régiója befolyásolja a transzgenikus konstrukcióban levő más gének transzkripcióját is, ezért a hímeknél (amelyeknél fokozottabb a transzkripció) súlyosabb fenotípusokat tapasztaltam.

Megfigyeléseim alapján tehát a Dmp53<sup>K302R</sup> fehérjét túltermelő, random inszerciós állatok erőteljesebb fenotípust mutatnak a vad típusú fehérjét túltermelő társaikhoz képest. Feltételezésem szerint a fenotípusok megfigyelt erősebbé válásának oka a magasabb Dmp53 fehérjeszint. Ennek bizonyítására olyan transzgenikus állatokat állítottam elő, amelyek két kópia vad típusú Dmp53-at túltermelő konstrukciót tartalmaznak, így nagyobb mennyiségű fehérjét tudnak termelni. Ha ezekben az állatokban expresszáltattam a fehérjét, akkor azt tapasztaltam, hogy a nagyobb mennyiségű fehérje erősebb fenotípusokat eredményez, hasonló, mint amelyet a Dmp53<sup>K302R</sup> túltermelő állatoknál figyeltem meg. Ugyanakkor, azoknál a muslicáknál, amelyek a Dmp53-nak egy domináns negatív formáját (Dmp53<sup>H159N</sup>), valamint a Dmp53<sup>K302R</sup>-t is termelték, azt tapasztaltam, hogy a fenotípusok enyhülést mutattak, vagyis a vad típusú, kevesebb fehérjét tartalmazó állatokhoz lettek hasonlóbbak. Ez a két kísérlet azt bizonyítja, hogy a Dmp53 transzgenikus állatoknál látott fenotípusok erőteljességét a Dmp53 fehérje, pontosabban annak mennyisége határozza meg.

Szerettem volna közvetlenül is bizonyítani, hogy a megváltozott fehérjemennyiség a megfigyelt fenotípusváltozások oka. Ehhez Western analízissel ellenőriztem az állatokban a Dmp53 mennyiségét. Azt tapasztaltam, hogy a Dmp53<sup>K302R</sup> pontmutáns fehérjét túltermelő állatokban a fehérje nagyobb mennyiségben van jelen, sokkal több van belőle, mint a vad típusút expresszáló társaikban. Ugyanezen mintákból a Dmp53 SUMO-módosított formáját nem tudtam kimutatni. Ennek több oka is lehet. Az endogén Dmp53 normál sejtekben olyan alacsony mennyiségben van jelen, hogy ezzel a módszerrel gyakorlatilag kimutathatatlan [129]. Elképzelhető, hogy még a Dmp53 túltermelése esetén is a fehérjének csak kis mennyisége módosul, aminek detektálására a rendelkezésre álló ellenanyag érzékenysége nem elegendő.

Vajon minek az eredménye a nagyobb fehérjemennyiség a Dmp53<sup>K302R</sup> állatokban? A fehérje stabilizálódik a mutáns fehérjét termelő állatokban, vagy a mRNS is nagyobb

mennyiségben található meg? Ennek tisztázására a P-elem inszerciós rekombinációs technikával létrehozott törzseken olyan kísérletek elvégzésére volt szükség, amelyek alkalmasak arra, hogy a génről képződő mRNS mennyiségét meghatározzam: a Northern analízis és a Q-RT-PCR megfelelnek erre a célra. Mindkét kísérletben azt az eredményt kaptam, hogy a  $Dmp53^{K302R}$  transzgénről nem íródik át több mRNS, mint a  $Dmp53$  transzgénről. Ennek alapján feltételezhető, hogy a  $Dmp53^{K302R}$  transzgenikus állatokban stabilizálódik a fehérje, és ez okozza az erőteljesebb fenotípusokat.

Azzal a céllal, hogy az eltérő kromoszómális környezetnek a transzkripció intenzitást módosító hatását kiküszöbölhessem, olyan  $Dmp53$  és  $Dmp53^{K302R}$  transzgént hordozó törzseket állítottam elő, amelyeknél a beépülés a muslica 2. vagy a 3. kromoszómájának ugyanabba a régiójába történt. Ezekkel a törzsekkel is megvizsgáltam, hogy a fehérje túltermelése eredményezi-e a látott fenotípus különbségeket a  $Dmp53$ , illetve a  $Dmp53^{K302R}$  transzgént tartalmazó állatok között. A korábban tapasztaltakhoz képest ebben az esetben sokkal kisebb mértékű különbséget tapasztaltam. Az egymásnak ellentmondó eredményekre nehéz magyarázatot találni. A P-elem inszerciós módszerrel létrehozott transzgenikus törzsekben két független rendszerben is ellenőriztem a  $Dmp53$  mRNS mennyiségét, és a fenotípus vizsgálat is számos független kísérletben történt. Annak oka, hogy a különböző módon létrehozott transzgénekkel kapott adatok egymásnak ellentmondanak talán a képződött fehérje mennyiségében kereshető. Elképzelhető, hogy a  $Dmp53$  hatása a fehérje egy adott szintjén túl már korántsem arányos a mennyiségével, a vele együtttható vagy a hatását módosító partnerek mennyisége okozta korlátok miatt. Ebben az esetben a nagy mennyiségben túltermelt vad típusú és mutáns  $Dmp53$  egyaránt okozhatnak olyan hatásokat, amelyeket a kisebb mennyiségben termelődő fehérjék esetén nem tapasztalunk. A kísérletek megerősítik a megállapítást, hogy a P-elem inszerciós technikával létrehozott törzsek vizsgálata esetén érdemes legalább 4-5 független inszerciót megvizsgálni, és csak akkor elfogadni az eredményeket, ha mindegyik hasonló fenotípust mutat. Másrészt e megfigyelések indokolják a  $\phi C31$  rendszer használatát transzgenikus állatok előállítására, hiszen annak számos előnye van, közöttük, hogy alkalmasabb összehasonlító vizsgálatok elvégzésére.

Ismert, hogy bizonyos fehérjék sumoilált, illetve módosítatlan formája különböző sejten belüli elhelyezkedést mutat, valamint sokszor a sumoiláció/desumoiláció szükséges a fehérje citoplazma és sejtmag közötti transzportjához [97]. Kwek és munkatársai vizsgálták a humán p53 SUMO-módosított, illetve módosítatlan formájának sejten belüli elhelyezkedését, és azt találták, hogy a p53 fehérje lokalizációja nem változik meg SUMO-módosítás hatására,

a fehérje a sejtmagban található [101]. Immunfestést alkalmazva *Drosophila* szöveteken úgy találtam, hogy a Dmp53 fehérje vad típusú, illetve K302R mutáns formája is a sejtmagban helyezkedik el, ami azt mutatja, hogy a fehérje transzportját a SUMO-módosítás nem, vagy nem önmagában befolyásolja.

A sumoiláció egy másik hatása lehet a célfehérje transzkripciós aktivitásának módosítása. A SUMO-módosítás p53 transzkripciójára gyakorolt hatásával kapcsolatos eredmények ellentmondásosak: Rodriguez és munkatársai azt találták, hogy a fehérje módosított formája erős transzkripció aktiváló képességgel rendelkezik [99]. Kwek és munkatársai nem találtak különbséget a módosított és módosítatlan fehérje transzkripciós aktivitása között [101]. S2 sejtek transzfekcióját követően mért luciferáz riporter aktivitás alapján kísérleteimben nem találtam lényeges különbséget a vad típusú és mutáns fehérje transzkripcióra kifejtett hatásában, ami megegyezik Kwek és munkatársai humán fehérjén kapott eredményeivel. A Daxx apoptotikus fehérje egy jól ismert p53 kölcsönható faktor, amely módosítja annak transzkripció aktiváló képességét [124-126]. A Daxx *Drosophila melanogaster* megfelelőjét – a DLP fehérjét – Dmp53 interakciós partnerként azonosítottuk. S2 sejteken végzett kísérleteimben – a humán fehérjétől eltérően – azt találtam, hogy a DLP nincs lényeges hatással a Dmp53 transzaktiváló képességére. Ez az eredmény – akárcsak néhány a korábbiak közül – azt mutatja, hogy a p53 szabályozás (konzerváltsága ellenére) számos ponton eltér a különböző fajok között.

Munkám során a K302R mutációt tartalmazó Dmp53 jellemzőinek vizsgálatán túl elsődleges célom volt annak közvetlen kimutatása, hogy a Dmp53 ténylegesen a 302. lizinjén keresztül sumoylálódik. Először ecetmuslica lárvákból készített preparátumokon végeztem Western analízist, de a módosítás nem volt kimutatható. A Dmp53 a sejtekben nagyon kis mennyiségben van jelen, ezért endogén formáját nem tudtam detektálni. A túltermelt fehérje jól kimutatható, de módosítást nem lehetett rajta detektálni. S2 sejtekből készített kivonatok Western analízise, és Dmp53-at túltermelő sejtekből végzett immunoprecipitáció eredményei sem bizonyítják a sumoylált Dmp53 forma jelenlétét.

Nehéz megmondani a SUMO-módosítás kimutatása sikertelenségének pontos okát. A túltermelt Dmp53 fehérjét ki tudtam mutatni S2 sejtekben, de módosításokat nem. Tudjuk, hogy a sumoiláció/desumoiláció dinamikusan változik, ezért rendszerint a sejtben jelen levő teljes fehérjemennyiségnek egyszerre csak kis része módosult. Elképzelhető, hogy a sejtben megtalálható Dmp53-nak is csak egy kis frakciója sumoylálódik, amit nagyon nehéz detektálni. Azoknál a típusú kísérleteknél, ahol sejtextraktummal dolgozunk (Western blot, immunoprecipitáció) szükséges a sejtek feltárása után valamilyen, a desumoilációt gátló

vegyszer használata. A szakirodalmi javaslatok alapján N-etil-maleimidet használtam minden vizsgált mintában, de így sem lehetett SUMO-módosított frakciót kimutatni. Elképzelhető, hogy ennek oka az, hogy a fehérjét túltermelt állapotban vizsgáljuk, ami egy mesterséges rendszer, előnyösebb volna az endogén fehérjén próbálkozni. Viszont az endogén fehérjét a rendelkezésre álló ellenanyagokkal én és mások sem tudták kimutatni, így nyilván módosítást sem lehet detektálni [129]. Ha a Dmp53 302-es lizin aminosavát argininre cseréljük, akkor – a mi eredményeink szerint – nincs lényeges változás a Dmp53 működésében. Ez az eredmény látszólag ellentmond az általunk élesztő két-hibridben kapott, a Dmp53 és a sumoilációs enzimek közötti kölcsönhatást kimutató kísérleti adatokkal. Viszont feloldhatjuk ezt az ellentmondást, ha feltételezzük, hogy a 302-es lizin elrontása esetén a fehérje egy másik lizinjén történhet SUMO-módosítás. Ezt erősítik meg a Mauri és munkatársai által kapott eredmények is, amelyek szerint a Dmp53 26-os és 302-es lizinje is a SUMO-módosítás célpontja, és ha mindkét helyen a lizint argininre cseréljük, akkor megváltozik a fehérje transzaktiváló- és apoptózis kiváltó képessége [129]. Feltételezhetjük, hogy a SUMO akceptor hely kiválasztása ecetmuslicában nem olyan szigorúan szabályzott, és elképzelhető, hogy a 302-es pozícióban levő lizin elrontása esetén a fehérje egy másik lizinje helyettesíti azt a funkció betöltésében.

Az általunk és mások által végzett kísérletek alapján látszik, hogy a Dmp53 hatékony vizsgálata a rendelkezésre álló módszerekkel és reagensekkel nehéz feladat. Úgy gondolom, hogy a Dmp53 további, részletes és sikeres molekuláris vizsgálatához olyan reagensek fejlesztésére van szükség, amelyek lehetővé teszik, hogy a sejtekben kis mennyiségben előforduló fehérjét is ki tudjunk mutatni, és az endogén fehérjén végzett kísérletekkel igyekezzünk minél többet megtudni a Dmp53 sejtekben betöltött sokoldalú szerepéről.

## 6. A doktori értekezés összefoglalója

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

Amerikai csoportok 2000-ben azonosították a humán p53 *Drosophila melanogaster* homológját. A humán p53 és Dmp53 aminosav-szekvenciája csak korlátozott mértékben egyezik, de számos hasonló funkciójuk van. Ez azt mutatja, hogy a p53-mal kapcsolatos biokémiai utak egy része konzervált, ezért a fehérje működésének alaposabb megértéséért ésszerű olyan jól használható modellorganizmusban vizsgálni, mint a *Drosophila melanogaster*.

Ahhoz, hogy a p53 szerepét *Drosophilában* tisztázni tudjam Dmp53 kölcsönható partnereket azonosítottam. Számos ilyen fehérjét találtam egy *Drosophila* cDNS könyvtáron végrehajtott élesztő két-hibrid screen segítségével. Közülük néhányat választottam ki alaposabb vizsgálatra.

Dmp53 kölcsönható partnerként azonosítottam a DmUba2, DmUbc9, DmPias fehérjéket, amelyek egy poszttranszlációs módosításban, a sumoilációban játszanak szerepet. A sumoiláció, az ubiquitinációhoz hasonló folyamat, ahol egy kisméretű polipeptid (a SUMO molekula) hozzákapcsolódik a célfehérjéhez, és annak számos tulajdonságát képes módosítani (lokalizáció, transzkripció aktivitás, stabilitás stb...). Tekintettel arra, hogy a humán p53 a SUMO modifikáció célfehérjéje, valamint a *Drosophila* homológján is találtam sumoilációs konszenzus szekvenciát, feltételeztem, hogy ez a poszttranszlációs módosítás Dmp53-on is megvalósul.

Élesztő két-hibrid módszer segítségével kimutattam, hogy a Dmp53 C-terminális doménje vesz részt a sumoilációban szerepet játszó fehérjékkel kialakított kölcsönhatásban. A C-terminális funkcionálisan két részre bontható: az úgynevezett basic

doménre. A Dmp53-DmUba2 kölcsönhatáshoz a basic domén szükséges, a DmUbc9 külön-külön az oligomerizációs, illetve a basic doménnel is interakcióba lép, míg a Dmp53-DmPias kölcsönhatás kialakításában a teljes hosszúságú C-terminális domén részt vesz. Az élesztő két-hibrid módszerrel kimutatott kölcsönhatásokat GST-pulldown kísérlettel erősítettem meg. A Dmp53 szekvenciájában egy olyan helyet találtam, amely tökéletesen megfelel a konszenzus sumoilációs szekvenciának. Ennek a helynek a megváltoztatása nem befolyásolja a vizsgált kölcsönhatásokat, és a fehérje továbbra is kötődik a sumoilációs enzimekhez.

Megvizsgáltam, hogy a Dmp53 és a SUMO módosításban részt vevő fehérjéket kódoló gének között genetikai kölcsönhatást ki tudok-e mutatni. Közismert a p53 szerepe a DNS károsodás által indukált javítási folyamatok aktiválásában. Ecetmuslicában a genomban történő hibák felhalmozódásának mérésére alkalmas technika a LOH rendszer, amelyben a *Drosophila* szárnyon az *mwh* gén termékének hiányában kialakuló több szörszálat eredményező fenotípus megjelenését vizsgáljuk. Ezt a rendszert használtam annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy vajon a muslicákban a sumoilációs aktivitás csökkenése hatással van-e a *Dmp53* mutátor fenotípusára. *Dmp53* és *mwh* heterozigóta háttéren hoztam létre olyan állatokat, amelyek *Su(var)2-10* vagy *lwr* vagy *smt3* vagy *lwr-smt3* heterozigóta mutánsok voltak, és vizsgáltam rajtuk, hogy röntgensugárzás hatására a szárnyklónok száma hogyan változik. Azt az eredményt kaptam, hogy a sumoilációs aktivitás részleges elvesztése növeli a *Dmp53* mutátor fenotípusát (nőtt a klónok száma), ami azt sugallja, hogy a sumoiláció hiánya, vagy csökkent mértékű megvalósulása csökkenti a Dmp53 DNS károsodások kijavítását biztosító aktivitását. Amikor a sumoilációs enzimek csökkent mennyiségének hatását vizsgáltam a Dmp53 szemben történő túltermelésére, a *lwr/smt3/lwr-smt3/Su(var)2-10* gének egyetlen kópiája ugyanolyan hatású, mintha mindkét kópia jelen lenne, tehát a fehérjék alacsonyabb mennyisége nem okoz lényeges szemfenotípus változást a Dmp53 túltermelés esetén. A LOH rendszerben, illetve ez utóbbi kísérletben kapott eredmények látszólagos ellentmondásban vannak. Azonban ez feloldható azzal, ha belegondolunk, hogy a két módszer a Dmp53 valamelyest eltérő, más közreműködőkön keresztül megvalósuló aktivitását méri. A LOH rendszer valószínűleg érzékenyebb a SUMO módosításra, ezért az *smt3*, *lwr*, illetve *Su(var)2-10* gének jelenléte, illetve hiánya látható fenotípus különbségeket okoz.

A Dmp53 további *in vivo* vizsgálatához transzgenikus állatokat hoztam létre, először P-elem alapú technikával. Vizsgálataim során azt szerettem volna megtudni, hogy a fehérjét túltermelve látok-e fenotípus különbséget a vad típusú, illetve mutáns Dmp53-at expresszáló állatok között. Kísérleteimben az UAS-GAL4 rendszert használva, általános és

szövetspecifikus driverek segítségével hajtottam meg a transzgéneket, és vizsgáltam a kapott fenotípusokat. Kísérleteimben két  $Dmp53^{K302R}$  fehérjét túltermelő törzset használtam, egyik a 2., a másik pedig a 3. kromoszómára beépült transzgént tartalmazott. Akár a 2., akár a 3. kromoszómás mutáns  $Dmp53$ -at termelő törzset használtam, súlyosabb fenotípusokat kaptam, mint a vad típusú fehérjét expresszáló törzsnél. Megfigyeltem, hogy a hím állatok minden esetben erőteljesebb fenotípusokat mutattak, mint a nőstények. Előállítottam  $Dmp53$  és  $Dmp53^{K302R}$  transzgént hordozó törzseket, amelyeknél a beépülés a muslica 2. vagy a 3. kromoszómájának ugyanabba a régiójába történt. Ezekkel a törzsekkel is megvizsgáltam, hogy a fehérje túltermelése eredményezi-e a korábban látott fenotípus különbségeket a  $Dmp53$ , illetve a  $Dmp53^{K302R}$  transzgént tartalmazó állatok között. A korábban tapasztaltakkal ellentétben sokkal kisebb mértékű volt a különbség, nem olyan drasztikus, mint amit a random inszertálódott transzgént tartalmazó állatoknál tapasztaltam.

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

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

A  $Dmp53$  és  $Dmp53^{K302R}$  transzgéneket hordozó, random inszercióval előállított állatoknál Northern blot és Q-PCR technikával mértem meg a géntermékek mennyiségét. Azt az eredményt kaptam, hogy a  $Dmp53^{K302R}$  transzgénről nem íródik át több mRNS, mint a



Dmp53 transzgénről. Ezen eredmény alapján azt a konklúziót vontam le, hogy a Dmp53<sup>K302R</sup> transzgenikus állatokban stabilizálódik a fehérje, és ez súlyosabb fenotípusokat okoz.

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

A sumoiláció számos jól jellemzett biológia funkcióval rendelkezik. Ismert, hogy bizonyos fehérjék sumoiláltak, illetve módosítatlan formája különböző sejten belüli elhelyezkedést mutat, tehát a sumoiláció/desumoiláció szükséges a fehérje citoplazma és sejtmag közötti transzportjához. Immunfestést alkalmazva *Drosophila* szöveteken azt tapasztaltam, hogy a Dmp53 fehérje vad típusú, illetve K302R mutáns formája is, a sejtmagban helyezkedik el, ami azt mutatja, hogy a fehérje transzportját a SUMO-módosítás nem, vagy nem önmagában befolyásolja.

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

## 7. Summary

The p53 protein is one of the best-known tumor suppressors. Its mutations can be found in many different types of tumors (colon, lung, breast, oesophagus, liver, urinary bladder, ovaries, brain). Many times the main reason of tumor formation is not the presence of mutations in the p53 sequence, but the flaws in the p53-activating pathways. Activated p53 is able to inhibit the cell cycle, bring about apoptosis, and plays a vital role in the induction of cell differentiation. It is also well-known that wild type p53 inhibits angiogenesis in tumors by regulating genes involved in forming blood vessels. The cell cycle inhibiting function of p53 is achieved through its activity as a transcription factor and the protein is able to activate numerous apoptotic genes too.

The *Drosophila melanogaster* orthologue of human p53 was identified approximately at the same time by three American laboratories. Although the amino acid sequences of human p53 and Dmp53 are just partly identical they do bear numerous similar functions. This indicates that numerous p53-related biochemical pathways are conserved and it is sensible to study the functions of the protein in detail using the well-known model organism *Drosophila melanogaster*.

In order to clarify the role of p53 in flies I identified Dmp53-interacting partners by carrying out a yeast two-hybrid screen using a *Drosophila* cDNA library. Some of the identified Dmp53-interacting proteins were chosen for further observations.

DmUba2, DmUbc9 and DmPias were found to interact with Dmp53. All three proteins play roles in the posttranslational modification called sumoylation that is a similar process to ubiquitination. In sumoylation a small polipeptide (called SUMO) is attached to the target protein and might modify the cellular localization, transcription activity or stability of the target. Human p53 is a known SUMO-target and I identified a sumoylation consensus site in the Dmp53 sequence, so I hypothesized that the *Drosophila* protein might be a target of sumoylation as well.

By using yeast two-hybrid the C-terminus of Dmp53 was found to interact with the sumoylation enzymes. The C-terminus of the protein can be split functionally into two parts: oligomerization domain and basic domain. DmUba2 interacts with the basic domain of Dmp53, DmUbc9 interacts with both the oligomerization domain and basic domain. The full-length C-terminal fragment is required for the interaction with DmPias. The results of the yeast two-hybrid assays were verified by GST-pulldown. Only one site was found in the

Dmp53 sequence that was fully identical to a consensus sumoylation site. The mutation of this site did not abolish the interactions between Dmp53 and the sumoylation enzymes.

I tried to identify genetic interactions between Dmp53 and the sumoylation enzymes. One of the well-known roles of p53 is to activate DNA repair mechanisms. In flies LOH assays are an established means of demonstrating the role played by Dmp53 in preserving genome stability. I carried out LOH assays based on detection of the recessive multiple wing hairs (Mwh) phenotype caused by the loss of the wild-type copy of *mwh*. To answer whether the decrease of the sumoylation activity has any effect on the mutator phenotype of *Dmp53* I used LOH assays. I generated flies simultaneously heterozygous for Dmp53, for the marker gene *mwh*, and for genes involved in sumoylation: *Su(var)2-10*, *lwr*, *smt3* or for both *lwr* and *smt3*. The homozygous *mwh* clones were counted on the wings of the adults. I found that partial loss of *Su(var)2-10*, *lwr* or *smt3* increased the number of wing clones. Thus, I concluded that partial loss of sumoylating activity enhanced the mutator phenotype of *Dmp53* suggesting that the decreased level of sumoylation may decrease the DNA repair activity of Dmp53. I examined the effect of decreased sumoylation activity on the overexpression of Dmp53 in eyes as well. I found that one copy of either *Su(var)2-10/lwr/smt3/lwr-smt3* causes phenotypes in eyes similar to two copies. The results I got from the LOH assays and these latter experiments are seemingly contradictory. This can be solved if we take into account that these two assays measure different properties of Dmp53. LOH assays might be more sensitive to SUMO modification, so the presence or absence of *Su(var)2-10*, *lwr* or *smt3* genes cause phenotypic differences.

For further study of Dmp53 I generated transgenic flies using P-element based techniques. I addressed the question whether overexpression of wild type or mutant Dmp53 causes any phenotypic differences. Using the UAS-GAL4 system I applied general and tissue-specific drivers to express the transgenes and analyzed the phenotypes. I used two strains overexpressing the Dmp53<sup>K302R</sup> protein on the 2<sup>nd</sup> or the 3<sup>rd</sup> chromosome. Using either the 2<sup>nd</sup> or the 3<sup>rd</sup> chromosomal Dmp53-overexpressing strains I found that overproduction of the Dmp53<sup>K302R</sup> protein causes more severe phenotypes than that of the wild type overexpressers. The phenotypes are stronger if general drivers are used. Interestingly, the phenotypes are stronger in males than in females. I generated Dmp53-overexpressing strains in which the transgenes are inserted into the same region of the 2<sup>nd</sup> or 3<sup>rd</sup> chromosome. In case the transgenes are inserted in this site-specific manner there is a smaller difference between the phenotypes caused by the overexpression of wild-type and mutant Dmp53 proteins.

We raised the question whether the stronger phenotypes are caused by the higher protein levels. In order to clarify this question I generated flies that carry two copies of the wild-type Dmp53-overexpressing transgene. With the overexpression of protein I found that more protein results in stronger phenotypes that are similar to that of the Dmp53<sup>K302R</sup> overexpressers. In accord with this, the simultaneous overproduction of Dmp53<sup>K302R</sup> and a dominant-negative form of Dmp53 (Dmp53<sup>H159N</sup>) resulted in weaker phenotypes similarly to the wild-type Dmp53 overexpressers. These experiments show that the strength of the phenotypes are mainly determined by the Dmp53 levels.

I used Western analysis to determine the amount of Dmp53 protein. I found that the protein is stabilized in the randomly inserted Dmp53<sup>K302R</sup>-overexpressing flies and reach higher levels compared to the wild type Dmp53 overexpressers. I tried to detect SUMO-modified Dmp53 using the same samples but I was not able to detect higher migrating forms of the protein. In case of the overproduction of the mutant or wild type Dmp53 in the site-specific insertion containing strains I detected approximately similar levels of the proteins.

In the random insertion containing strains I determined the amount of gene products by Northern blot and Q-PCR. Similar levels of mRNA can be detected in the mutant and wild type Dmp53-overexpressing strains. On the basis of these experiments I concluded that Dmp53 protein is stabilized in Dmp53<sup>K302R</sup>-overproducing flies and causes stronger phenotypes than that of wild type overexpressers.

A generally used method for the detection of sumoylation is using transfected cells. Wild type and mutant Dmp53 were transiently overexpressed in S2 cells and cell extracts prepared from these samples were analyzed by immunoblot. I was not able to detect any SUMO-modified form of Dmp53, however the overexpression of the proteins was successful. Immunoprecipitations were also carried out by using higher amount of S2 cells, but no sumoylated Dmp53 was detected, although these experiments were repeated several times. Cotransfection experiments were also performed in which Dmp53 and SUMO were overproduced simultaneously. No modified Dmp53 forms were detected, although these methods are wide-spread for investigating posttranslational modifications of proteins.

Sumoylation has numerous well-known biological functions. Many times the unmodified and sumoylated forms of proteins are localized in different compartments of the cells so the processes of sumoylation/desumoylation are essential for the transport of the given protein between the cytoplasm and the nucleus. Immunostained *Drosophila* tissues revealed that both the wild type and the K302R mutant form of the protein are localized in the

nucleus. This suggests that the transport of Dmp53 is not or not exclusively influenced by the SUMO-modification.

Another important role of sumoylation is the modification of transcriptional activity of the target protein. I examined the transcriptional activating capacity of the wild type and K302R mutant Dmp53 by performing luciferase assays using S2 cells. No obvious difference was found in the transactivation ability of Dmp53 and Dmp53<sup>K302R</sup>.

## **8. Köszönetnyilvánítás**

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

## 9. Irodalomjegyzék

1. Chang, C., Simmons, D.T., Martin, M.A., and Mora, P.T., *Identification and partial characterization of new antigens from simian virus 40-transformed mouse cells*. J Virol, 1979. **31**(2): p. 463-471.
2. Kress, M., May, E., Cassingena, R., and May, P., *Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum*. J Virol, 1979. **31**(2): p. 472-483.
3. Lane, D.P. and Crawford, L.V., *T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells*. Nature, 1979. **278**(5701): p. 261-263.
4. Linzer, D.I., Maltzman, W., and Levine, A.J., *The SV40 A gene product is required for the production of a 54,000 MW cellular tumor antigen*. Virology, 1979. **98**(2): p. 308-318.
5. DeLeo, A.B., Jay, G., Appella, E., Dubois, G.C., Law, L.W., and Old, L.J., *Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(5): p. 2420-2424.
6. Mercer, W.E., Nelson, D., DeLeo, A.B., Old, L.J., 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, 1982. **79**(20): p. 6309-6312.
7. Bukhman, V.L., Ninkina, N.N., Chumakov, P.M., Khilenkova, M.A., and Samarina, O.P., *[Structural organization of the human p53 gene. I. Molecular cloning of the human p53 gene]*. Genetika, 1987. **23**(9): p. 1547-1554.
8. Chumakov, P.M., Iotsova, V.S., and Georgiev, G.P., *[Isolation of a plasmid clone containing the mRNA sequence for mouse nonviral T-antigen]*. Dokl Akad Nauk SSSR, 1982. **267**(5): p. 1272-1275.
9. Oren, M. and Levine, A.J., *Molecular cloning of a cDNA specific for the murine p53 cellular tumor antigen*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(1): p. 56-59.
10. Wolf, D., Laver-Rudich, Z., and Rotter, V., *In vitro expression of human p53 cDNA clones and characterization of the cloned human p53 gene*. Mol Cell Biol, 1985. **5**(8): p. 1887-1893.
11. Eliyahu, D., Raz, A., Gruss, P., Givol, D., and Oren, M., *Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells*. Nature, 1984. **312**(5995): p. 646-649.
12. Jenkins, J.R., Rudge, K., and Currie, G.A., *Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53*. Nature, 1984. **312**(5995): p. 651-654.

13. Parada, L.F., Land, H., Weinberg, R.A., Wolf, D., and Rotter, V., *Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation*. Nature, 1984. **312**(5995): p. 649-651.
14. Jenkins, J.R., Rudge, K., Chumakov, P., and Currie, G.A., *The cellular oncogene p53 can be activated by mutagenesis*. Nature, 1985. **317**(6040): p. 816-818.
15. Baker, S.J., Markowitz, S., Fearon, E.R., Willson, J.K., and Vogelstein, B., *Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53*. Science, 1990. **249**(4971): p. 912-915.
16. Eliyahu, D., Michalovitz, D., Eliyahu, S., Pinhasi-Kimhi, O., and Oren, M., *Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(22): p. 8763-8767.
17. Finlay, C.A., Hinds, P.W., and Levine, A.J., *The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation*. Cell, 1989. **57**(7): p. 1083-1093.
18. Brooks, C.L. and Gu, W., *p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond*. Mol Cell, 2006. **21**(3): p. 307-315.
19. Jeffrey, P.D., Gorina, S., and Pavletich, N.P., *Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1498-1502.
20. Laptenko, O. and Prives, C., *Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities*. Cell Death Differ, 2006. **13**(6): p. 951-961.
21. Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George, D., and Levine, A.J., *The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation*. Cell, 1992. **69**(7): p. 1237-1245.
22. Oliner, J.D., Kinzler, K.W., Meltzer, P.S., George, D.L., and Vogelstein, B., *Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas*. Nature, 1992. **358**(6381): p. 80-83.
23. Francoz, S., Froment, P., Bogaerts, S., De Clercq, S., Maetens, M., Doumont, G., Bellefroid, E., and Marine, J.C., *Mdm4 and Mdm2 cooperate to inhibit p53 activity in proliferating and quiescent cells in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(9): p. 3232-3237.
24. Gu, J., Kawai, H., Nie, L., Kitao, H., Wiederschain, D., Jochemsen, A.G., Parant, J., Lozano, G., and Yuan, Z.M., *Mutual dependence of MDM2 and MDMX in their functional inactivation of p53*. J Biol Chem, 2002. **277**(22): p. 19251-19254.
25. Sharp, D.A., Kratowicz, S.A., Sank, M.J., and George, D.L., *Stabilization of the MDM2 oncoprotein by interaction with the structurally related MDMX protein*. J Biol Chem, 1999. **274**(53): p. 38189-38196.



26. Tanimura, S., Ohtsuka, S., Mitsui, K., Shirouzu, K., Yoshimura, A., and Ohtsubo, M., *MDM2 interacts with MDMX through their RING finger domains*. FEBS Lett, 1999. **447**(1): p. 5-9.
27. Cummins, J.M. and Vogelstein, B., *HAUSP is required for p53 destabilization*. Cell Cycle, 2004. **3**(6): p. 689-692.
28. Li, M., Brooks, C.L., Kon, N., and Gu, W., *A dynamic role of HAUSP in the p53-Mdm2 pathway*. Mol Cell, 2004. **13**(6): p. 879-886.
29. Tang, J., Qu, L.K., Zhang, J., Wang, W., Michaelson, J.S., Degenhardt, Y.Y., El-Deiry, W.S., and Yang, X., *Critical role for Daxx in regulating Mdm2*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(8): p. 855-862.
30. Li, M., Chen, D., Shiloh, A., Luo, J., Nikolaev, A.Y., Qin, J., and Gu, W., *Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization*. Nature, 2002. **416**(6881): p. 648-653.
31. Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liegeois, N.J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H.W., Cordon-Cardo, C., and DePinho, R.A., *The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53*. Cell, 1998. **92**(6): p. 713-723.
32. Chen, D., Kon, N., Li, M., Zhang, W., Qin, J., and Gu, W., *ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor*. Cell, 2005. **121**(7): p. 1071-1083.
33. Dornan, D., Wertz, I., Shimizu, H., Arnott, D., Frantz, G.D., Dowd, P., O'Rourke, K., Koeppen, H., and Dixit, V.M., *The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53*. Nature, 2004. **429**(6987): p. 86-92.
34. Leng, R.P., Lin, Y., Ma, W., Wu, H., Lemmers, B., Chung, S., Parant, J.M., Lozano, G., Hakem, R., and Benchimol, S., *Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation*. Cell, 2003. **112**(6): p. 779-791.
35. Shmueli, A. and Oren, M., *Life, death, and ubiquitin: taming the mule*. Cell, 2005. **121**(7): p. 963-965.
36. Asher, G. and Shaul, Y., *p53 proteasomal degradation: poly-ubiquitination is not the whole story*. Cell Cycle, 2005. **4**(8): p. 1015-1018.
37. Yano, M., Koumoto, Y., Kanesaki, Y., Wu, X., and Kido, H., *20S proteasome prevents aggregation of heat-denatured proteins without PA700 regulatory subcomplex like a molecular chaperone*. Biomacromolecules, 2004. **5**(4): p. 1465-1469.
38. Asher, G., Reuven, N., and Shaul, Y., *20S proteasomes and protein degradation "by default"*. Bioessays, 2006. **28**(8): p. 844-849.
39. Chumakov, P.M., *Versatile functions of p53 protein in multicellular organisms*. Biochemistry (Mosc), 2007. **72**(13): p. 1399-1421.

40. Chumakov, P.M., *Function of the p53 gene: choice between life and death*. Biochemistry (Mosc), 2000. **65**(1): p. 28-40.
41. Buschmann, T., Potapova, O., Bar-Shira, A., Ivanov, V.N., Fuchs, S.Y., Henderson, S., Fried, V.A., Minamoto, T., Alarcon-Vargas, D., Pincus, M.R., Gaarde, W.A., Holbrook, N.J., Shiloh, Y., and Ronai, Z., *Jun NH2-terminal kinase phosphorylation of p53 on Thr-81 is important for p53 stabilization and transcriptional activities in response to stress*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(8): p. 2743-2754.
42. Ito, A., Lai, C.H., Zhao, X., Saito, S., Hamilton, M.H., Appella, E., and Yao, T.P., *p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2*. Embo J, 2001. **20**(6): p. 1331-1340.
43. Li, M., Luo, J., Brooks, C.L., and Gu, W., *Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2*. J Biol Chem, 2002. **277**(52): p. 50607-50611.
44. David-Pfeuty, T., Nouvian-Dooghe, Y., Sirri, V., Roussel, P., and Hernandez-Verdun, D., *Common and reversible regulation of wild-type p53 function and of ribosomal biogenesis by protein kinases in human cells*. Oncogene, 2001. **20**(42): p. 5951-5963.
45. Agarwal, M.L., Taylor, W.R., Chernov, M.V., Chernova, O.B., and Stark, G.R., *The p53 network*. J Biol Chem, 1998. **273**(1): p. 1-4.
46. Blandino, G., Scardigli, R., Rizzo, M.G., Crescenzi, M., Soddu, S., and Sacchi, A., *Wild-type p53 modulates apoptosis of normal, IL-3 deprived, hematopoietic cells*. Oncogene, 1995. **10**(4): p. 731-737.
47. Sablina, A.A., Chumakov, P.M., Levine, A.J., and Kopnin, B.P., *p53 activation in response to microtubule disruption is mediated by integrin-Erk signaling*. Oncogene, 2001. **20**(8): p. 899-909.
48. Bachelder, R.E., Marchetti, A., Falcioni, R., Soddu, S., and Mercurio, A.M., *Activation of p53 function in carcinoma cells by the alpha6beta4 integrin*. J Biol Chem, 1999. **274**(29): p. 20733-20737.
49. Blagosklonny, M.V., Schulte, T.W., Nguyen, P., Mimnaugh, E.G., Trepel, J., and Neckers, L., *Taxol induction of p21WAF1 and p53 requires c-raf-1*. Cancer Res, 1995. **55**(20): p. 4623-4626.
50. Rubtsova, S.N., Kondratov, R.V., Kopnin, P.B., Chumakov, P.M., Kopnin, B.P., and Vasiliev, J.M., *Disruption of actin microfilaments by cytochalasin D leads to activation of p53*. FEBS Lett, 1998. **430**(3): p. 353-357.
51. Sablina, A.A., Agapova, L.S., Chumakov, P.M., and Kopnin, B.P., *p53 does not control the spindle assembly cell cycle checkpoint but mediates G1 arrest in response to disruption of microtubule system*. Cell Biol Int, 1999. **23**(5): p. 323-334.
52. Agapova, L.S., Turovets, N.A., Ivanov, A.V., Il'inskaia, G.V., and Chumakov, P.M., *[Induction of hyperdiploidy and chromosome breaks in LIM1215 cells expressing the exogenous mutant p53]*. Genetika, 1996. **32**(8): p. 1080-1087.

53. Matijasevic, Z., Snyder, J.E., and Ludlum, D.B., *Hypothermia causes a reversible, p53-mediated cell cycle arrest in cultured fibroblasts*. *Oncol Res*, 1998. **10**(11-12): p. 605-610.
54. Seo, Y.R., Smith, M.L., Han, S.S., Fairbairn, D.W., O'Neill, K.L., and Ryu, J.C., *Mild hyperthermia-induced apoptosis is dependent on p53 in human lymphoid cells*. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 1999. **104**(3): p. 285-292.
55. Chehab, N.H., Malikzay, A., Appel, M., and Halazonetis, T.D., *Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53*. *Genes Dev*, 2000. **14**(3): p. 278-288.
56. Iliakis, G., Wang, Y., Guan, J., and Wang, H., *DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation*. *Oncogene*, 2003. **22**(37): p. 5834-5847.
57. Matsuoka, S., Huang, M., and Elledge, S.J., *Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase*. *Science*, 1998. **282**(5395): p. 1893-1897.
58. Niida, H. and Nakanishi, M., *DNA damage checkpoints in mammals*. *Mutagenesis*, 2006. **21**(1): p. 3-9.
59. Sarkaria, J.N., Busby, E.C., Tibbetts, R.S., Roos, P., Taya, Y., Karnitz, L.M., and Abraham, R.T., *Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine*. *Cancer Res*, 1999. **59**(17): p. 4375-4382.
60. Chehab, N.H., Malikzay, A., Stavridi, E.S., and Halazonetis, T.D., *Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(24): p. 13777-13782.
61. Tibbetts, R.S., Brumbaugh, K.M., Williams, J.M., Sarkaria, J.N., Cliby, W.A., Shieh, S.Y., Taya, Y., Prives, C., and Abraham, R.T., *A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53*. *Genes Dev*, 1999. **13**(2): p. 152-157.
62. Scully, R., Anderson, S.F., Chao, D.M., Wei, W., Ye, L., Young, R.A., Livingston, D.M., and Parvin, J.D., *BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(11): p. 5605-5610.
63. Krum, S.A., Miranda, G.A., Lin, C., and Lane, T.F., *BRCA1 associates with processive RNA polymerase II*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(52): p. 52012-52020.
64. Meluh, P.B. and Koshland, D., *Evidence that the MIF2 gene of Saccharomyces cerevisiae encodes a centromere protein with homology to the mammalian centromere protein CENP-C*. *Mol Biol Cell*, 1995. **6**(7): p. 793-807.
65. Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S., Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R., and Becker, J., *Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1*. *J Mol Biol*, 1998. **280**(2): p. 275-286.
66. Guo, D., Li, M., Zhang, Y., Yang, P., Eckenrode, S., Hopkins, D., Zheng, W., Purohit, S., Podolsky, R.H., Muir, A., Wang, J., Dong, Z., Brusko, T., Atkinson, M., Pozzilli,

- P., Zeidler, A., Raffel, L.J., Jacob, C.O., Park, Y., Serrano-Rios, M., Larrad, M.T., Zhang, Z., Garchon, H.J., Bach, J.F., Rotter, J.I., She, J.X., and Wang, C.Y., *A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes*. Nat Genet, 2004. **36**(8): p. 837-841.
67. Melchior, F., *SUMO--nonclassical ubiquitin*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. **16**: p. 591-626.
  68. Shen, Z., Pardington-Purtymun, P.E., Comeaux, J.C., Moyzis, R.K., and Chen, D.J., *UBL1, a human ubiquitin-like protein associating with human RAD51/RAD52 proteins*. Genomics, 1996. **36**(2): p. 271-279.
  69. Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L., and Melchior, F., *A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2*. Cell, 1997. **88**(1): p. 97-107.
  70. Matunis, M.J., Coutavas, E., and Blobel, G., *A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex*. J Cell Biol, 1996. **135**(6 Pt 1): p. 1457-1470.
  71. Johnson, E.S., Schwienhorst, I., Dohmen, R.J., and Blobel, G., *The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer*. Embo J, 1997. **16**(18): p. 5509-5519.
  72. Johnson, E.S. and Blobel, G., *Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p*. J Biol Chem, 1997. **272**(43): p. 26799-26802.
  73. Cheng, C.H., Lo, Y.H., Liang, S.S., Ti, S.C., Lin, F.M., Yeh, C.H., Huang, H.Y., and Wang, T.F., *SUMO modifications control assembly of synaptonemal complex and polycomplex in meiosis of Saccharomyces cerevisiae*. Genes Dev, 2006. **20**(15): p. 2067-2081.
  74. Hochstrasser, M., *SP-RING for SUMO: new functions bloom for a ubiquitin-like protein*. Cell, 2001. **107**(1): p. 5-8.
  75. Johnson, E.S. and Gupta, A.A., *An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins*. Cell, 2001. **106**(6): p. 735-744.
  76. Kagey, M.H., Melhuish, T.A., and Wotton, D., *The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3*. Cell, 2003. **113**(1): p. 127-137.
  77. Pichler, A., Gast, A., Seeler, J.S., Dejean, A., and Melchior, F., *The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity*. Cell, 2002. **108**(1): p. 109-120.
  78. Zhao, X. and Blobel, G., *A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(13): p. 4777-4782.

79. Lallemand-Breitenbach, V., Jeanne, M., Benhenda, S., Nasr, R., Lei, M., Peres, L., Zhou, J., Zhu, J., Raught, B., and de The, H., *Arsenic degrades PML or PML-RAR $\alpha$  through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(5): p. 547-555.
80. Tatham, M.H., Geoffroy, M.C., Shen, L., Plechanovova, A., Hattersley, N., Jaffray, E.G., Palvimo, J.J., and Hay, R.T., *RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(5): p. 538-546.
81. Geiss-Friedlander, R. and Melchior, F., *Concepts in sumoylation: a decade on*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(12): p. 947-956.
82. Di Bacco, A., Ouyang, J., Lee, H.Y., Catic, A., Ploegh, H., and Gill, G., *The SUMO-specific protease SENP5 is required for cell division*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(12): p. 4489-4498.
83. Li, S.J. and Hochstrasser, M., *The yeast ULP2 (SMT4) gene encodes a novel protease specific for the ubiquitin-like Smt3 protein*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(7): p. 2367-2377.
84. Kamitani, T., Kito, K., Nguyen, H.P., Wada, H., Fukuda-Kamitani, T., and Yeh, E.T., *Identification of three major sentrinization sites in PML*. J Biol Chem, 1998. **273**(41): p. 26675-26682.
85. Matunis, M.J., Wu, J., and Blobel, G., *SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex*. J Cell Biol, 1998. **140**(3): p. 499-509.
86. Sternsdorf, T., Puccetti, E., Jensen, K., Hoelzer, D., Will, H., Ottmann, O.G., and Ruthardt, M., *PIC-1/SUMO-1-modified PML-retinoic acid receptor  $\alpha$  mediates arsenic trioxide-induced apoptosis in acute promyelocytic leukemia*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(7): p. 5170-5178.
87. Seeler, J.S. and Dejean, A., *Nuclear and unclear functions of SUMO*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(9): p. 690-699.
88. Hietakangas, V., Ahlskog, J.K., Jakobsson, A.M., Hellesuo, M., Sahlberg, N.M., Holmberg, C.I., Mikhailov, A., Palvimo, J.J., Pirkkala, L., and Sistonen, L., *Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(8): p. 2953-2968.
89. Hong, Y., Rogers, R., Matunis, M.J., Mayhew, C.N., Goodson, M.L., Park-Sarge, O.K., and Sarge, K.D., *Regulation of heat shock transcription factor 1 by stress-induced SUMO-1 modification*. J Biol Chem, 2001. **276**(43): p. 40263-40267.
90. Yamamoto, H., Ihara, M., Matsuura, Y., and Kikuchi, A., *Sumoylation is involved in beta-catenin-dependent activation of Tcf-4*. Embo J, 2003. **22**(9): p. 2047-2059.

91. al-Khodairy, F., Enoch, T., Hagan, I.M., and Carr, A.M., *The Schizosaccharomyces pombe hus5 gene encodes a ubiquitin conjugating enzyme required for normal mitosis*. J Cell Sci, 1995. **108 (Pt 2)**: p. 475-486.
92. Shayeghi, M., Doe, C.L., Tavassoli, M., and Watts, F.Z., *Characterisation of Schizosaccharomyces pombe rad31, a UBA-related gene required for DNA damage tolerance*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(6): p. 1162-1169.
93. Tanaka, K., Nishide, J., Okazaki, K., Kato, H., Niwa, O., Nakagawa, T., Matsuda, H., Kawamukai, M., and Murakami, Y., *Characterization of a fission yeast SUMO-1 homologue, pmt3p, required for multiple nuclear events, including the control of telomere length and chromosome segregation*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(12): p. 8660-8672.
94. Hari, K.L., Cook, K.R., and Karpen, G.H., *The Drosophila Su(var)2-10 locus regulates chromosome structure and function and encodes a member of the PIAS protein family*. Genes Dev, 2001. **15**(11): p. 1334-1348.
95. Hardeland, U., Steinacher, R., Jiricny, J., and Schar, P., *Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover*. Embo J, 2002. **21**(6): p. 1456-1464.
96. Stelter, P. and Ulrich, H.D., *Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation*. Nature, 2003. **425**(6954): p. 188-191.
97. Lin, X., Sun, B., Liang, M., Liang, Y.Y., Gast, A., Hildebrand, J., Brunicardi, F.C., Melchior, F., and Feng, X.H., *Opposed regulation of corepressor CtBP by SUMOylation and PDZ binding*. Mol Cell, 2003. **11**(5): p. 1389-1396.
98. Desterro, J.M., Rodriguez, M.S., and Hay, R.T., *SUMO-1 modification of I $\kappa$ B $\alpha$  inhibits NF- $\kappa$ B activation*. Mol Cell, 1998. **2**(2): p. 233-239.
99. Rodriguez, M.S., Desterro, J.M., Lain, S., Midgley, C.A., Lane, D.P., and Hay, R.T., *SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53*. Embo J, 1999. **18**(22): p. 6455-6461.
100. Muller, S., Berger, M., Lehenbre, F., Seeler, J.S., Haupt, Y., and Dejean, A., *c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification*. J Biol Chem, 2000. **275**(18): p. 13321-13329.
101. Kwek, S.S., Derry, J., Tyner, A.L., Shen, Z., and Gudkov, A.V., *Functional analysis and intracellular localization of p53 modified by SUMO-1*. Oncogene, 2001. **20**(20): p. 2587-2599.
102. Schmidt, D. and Muller, S., *Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(5): p. 2872-2877.
103. Megidish, T., Xu, J.H., and Xu, C.W., *Activation of p53 by protein inhibitor of activated Stat1 (PIAS1)*. J Biol Chem, 2002. **277**(10): p. 8255-8259.

104. Carter, S., Bischof, O., Dejean, A., and Vousden, K.H., *C-terminal modifications regulate MDM2 dissociation and nuclear export of p53*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(4): p. 428-435.
105. Chen, L. and Chen, J., *MDM2-ARF complex regulates p53 sumoylation*. Oncogene, 2003. **22**(34): p. 5348-5357.
106. Li, T., Santockyte, R., Shen, R.F., Tekle, E., Wang, G., Yang, D.C., and Chock, P.B., *Expression of SUMO-2/3 induced senescence through p53- and pRB-mediated pathways*. J Biol Chem, 2006. **281**(47): p. 36221-36227.
107. Cheng, R., Ford, B.L., O'Neal, P.E., Mathews, C.Z., Bradford, C.S., Thongtan, T., Barnes, D.W., Hendricks, J.D., and Bailey, G.S., *Zebrafish (Danio rerio) p53 tumor suppressor gene: cDNA sequence and expression during embryogenesis*. Mol Mar Biol Biotechnol, 1997. **6**(2): p. 88-97.
108. Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Jr., Butel, J.S., and Bradley, A., *Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours*. Nature, 1992. **356**(6366): p. 215-221.
109. Derry, W.B., Putzke, A.P., and Rothman, J.H., *Caenorhabditis elegans p53: role in apoptosis, meiosis, and stress resistance*. Science, 2001. **294**(5542): p. 591-595.
110. Schumacher, B., Hofmann, K., Boulton, S., and Gartner, A., *The C. elegans homolog of the p53 tumor suppressor is required for DNA damage-induced apoptosis*. Curr Biol, 2001. **11**(21): p. 1722-1727.
111. Brodsky, M.H., Nordstrom, W., Tsang, G., Kwan, E., Rubin, G.M., and Abrams, J.M., *Drosophila p53 binds a damage response element at the reaper locus*. Cell, 2000. **101**(1): p. 103-113.
112. Jin, S., Martinek, S., Joo, W.S., Wortman, J.R., Mirkovic, N., Sali, A., Yandell, M.D., Pavletich, N.P., Young, M.W., and Levine, A.J., *Identification and characterization of a p53 homologue in Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(13): p. 7301-7306.
113. Ollmann, M., Young, L.M., Di Como, C.J., Karim, F., Belvin, M., Robertson, S., Whittaker, K., Demsky, M., Fisher, W.W., 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, 2000. **101**(1): p. 91-101.
114. Chen, P., Nordstrom, W., Gish, B., and Abrams, J.M., *grim, a novel cell death gene in Drosophila*. Genes Dev, 1996. **10**(14): p. 1773-1782.
115. Christich, A., Kauppila, S., Chen, P., Sogame, N., Ho, S.I., and Abrams, J.M., *The damage-responsive Drosophila gene sickle encodes a novel IAP binding protein similar to but distinct from reaper, grim, and hid*. Curr Biol, 2002. **12**(2): p. 137-140.

116. de Nooij, J.C., Letendre, M.A., and Hariharan, I.K., *A cyclin-dependent kinase inhibitor, Dacapo, is necessary for timely exit from the cell cycle during Drosophila embryogenesis*. Cell, 1996. **87**(7): p. 1237-1247.
117. Brodsky, M.H., Weinert, B.T., Tsang, G., Rong, Y.S., McGinnis, N.M., Golic, K.G., Rio, D.C., and Rubin, G.M., *Drosophila melanogaster MNK/Chk2 and p53 regulate multiple DNA repair and apoptotic pathways following DNA damage*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(3): p. 1219-1231.
118. Oikemus, S.R., McGinnis, N., Queiroz-Machado, J., Tukachinsky, H., Takada, S., Sunkel, C.E., and Brodsky, M.H., *Drosophila atm/telomere fusion is required for telomeric localization of HP1 and telomere position effect*. Genes Dev, 2004. **18**(15): p. 1850-1861.
119. Song, Y.H., Mirey, G., Betson, M., Haber, D.A., and Settleman, J., *The Drosophila ATM ortholog, dATM, mediates the response to ionizing radiation and to spontaneous DNA damage during development*. Curr Biol, 2004. **14**(15): p. 1354-1359.
120. 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, A.S., and Mak, T.W., *Chk2 regulates irradiation-induced, p53-mediated apoptosis in Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(17): p. 11305-11310.
121. Long, X. and Griffith, L.C., *Identification and characterization of a SUMO-1 conjugation system that modifies neuronal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in Drosophila melanogaster*. J Biol Chem, 2000. **275**(52): p. 40765-40776.
122. Groth, A.C., Fish, M., Nusse, R., and Calos, M.P., *Construction of transgenic Drosophila by using the site-specific integrase from phage phiC31*. Genetics, 2004. **166**(4): p. 1775-1782.
123. Bischof, J., Maeda, R.K., Hediger, M., Karch, F., and Basler, K., *An optimized transgenesis system for Drosophila using germ-line-specific phiC31 integrases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(9): p. 3312-3317.
124. 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, 2004. **279**(46): p. 48013-48023.
125. Kim, E.J., Park, J.S., and Um, S.J., *Identification of Daxx interacting with p73, one of the p53 family, and its regulation of p53 activity by competitive interaction with PML*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(18): p. 5356-5367.
126. Zhao, L.Y., Liu, J., Sidhu, G.S., Niu, Y., Liu, Y., Wang, R., and Liao, D., *Negative regulation of p53 functions by Daxx and the involvement of MDM2*. J Biol Chem, 2004. **279**(48): p. 50566-50579.
127. Kubicka, S., Kuhnel, F., Zender, L., Rudolph, K.L., Plumpe, J., Manns, M., and Trautwein, C., *p53 represses CAAT enhancer-binding protein (C/EBP)-dependent transcription of the albumin gene. A molecular mechanism involved in viral liver*



- infection with implications for hepatocarcinogenesis*. J Biol Chem, 1999. **274**(45): p. 32137-32144.
128. Mack, D.H., Vartikar, J., Pipas, J.M., and Laimins, L.A., *Specific repression of TATA-mediated but not initiator-mediated transcription by wild-type p53*. Nature, 1993. **363**(6426): p. 281-283.
129. Mauri, F., McNamee, L.M., Lunardi, A., Chiacchiera, F., Del Sal, G., Brodsky, M.H., and Collavin, L., *Modification of Drosophila p53 by SUMO modulates its transactivation and pro-apoptotic functions*. J Biol Chem, 2008. **283**(30): p. 20848-20856.