

Az ADA2b adaptor fehérjéket tartalmazó hiszton
acetyltranszferáz komplexek szerepének vizsgálata
Drosophila melanogaster-ben

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Készítette: Pankotai Tibor
Témavezető: Dr. Boros Imre Miklós

Szegedi Tudományegyetem Természettudományi Kar
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

Szeged, 2007.

Tartalomjegyzék:

1. Bevezetés	4
1.1. Az eukarióta kromoszóma szerkezete	4
1.2. A hisztonok kovalens módosításainak szerepe a génregulációs folyamatokban	5
1.2.1. A hiszton metiláció szerepe	7
1.2.2. Hisztonok foszforilációja	8
1.2.3. Hisztonok SUMO-ilációja	8
1.2.4. Hisztonok ubiquitinációja	8
1.2.5. A hiszton acetiláció szerepe	9
1.3. Hiszton acetiltranszferázok	10
1.3.1. MYST szupercsalád	11
1.3.2. GNAT szupercsalád	12
1.4. ADA2 transzkripció adapterek	13
2. Célkitűzések	16
3. Anyagok és módszerek	17
3.1. Klasszikus genetikai módszerek	17
3.1.1. Deléciós mutánsok létrehozása P-elem újra mobilizálás útján	17
3.1.2. A P-elem mobilizálásából kapott vonalak letális fázisának meghatározása	18
3.1.3. Az <i>Ada2a</i> ¹⁸⁹ és <i>Ada2b</i> ⁸⁴² kettős mutánsok létrehozása	19
3.1.4. Ősivarsejt transzplantáció	19
3.1.5. Testi sejt mozaik analízis	20
3.1.6. Nyálmirigy óriáskromoszóma preparálás	21
3.1.7. Apoptózis festés (akridin orange)	22
3.1.8. Lárvális szövetek immunfestése	23
3.1.9. Szempigment mérés	24
3.1.10. Szárnyklón mozaikok létrehozása	24
3.1.11. Transzgenikus <i>Drosophila</i> törzsek létrehozása	24
3.1.12. S2 sejt kultúra transzfekció	25
3.2. Molekuláris biológiai módszerek	26
3.2.1. P-elem mobilizálásából kapott mutánsok analízise	26
3.2.2. Western analízisek	27
3.2.3. PCR alapú Reverz Transzkripció	28
3.2.4. <i>Ada2b</i> menekítő transzgén létrehozása	28
3.2.5. ADA2b fehérje izoformáinak GFP jelölése	28
3.2.6. <i>Ada2b</i> ⁸⁴² DNS microarray	28
3.2.7. Real time PCR	29
4. Kísérleti eredmények	30
4.1. <i>Ada2b</i> deléciós mutáns allélok előállítása és a deléciók molekuláris jellemzése	30
4.2. Az <i>Ada2b</i> ⁸⁴² mutánsok letális fázisa	33
4.3. Ősivarsejt transzplantáció	34
4.4. Az ADA2b (<i>ADA2b</i> ¹ , <i>ADA2b</i> ²) izoformáinak azonosítása	35
4.5. Az <i>ADA2b</i> ¹ , <i>ADA2b</i> ² fehérjék szerepe a H3 K9 és K14 acetilációjában	39
4.6. Az ADA2b fehérjék sejtciklus szabályozásában betöltött szerepe	42
4.6.1. Sejtautonóm funkció vizsgálata	42
4.6.2. Az <i>Ada2b</i> ⁸²⁴ mutáció hatása a mitózisra	43

4.7. Az ADA2b fehérjék szerepe a Dmp53 által szabályozott apoptotikus útvonalban	45
4.7.1. Röntgen sugárzás indukálta apoptózis	45
4.7.2. A genom stabilitásának változása az ADA2b fehérjék hiányában.....	47
4.8. Az ADA2b hatása a vörös szempigment mennyiségére	48
4.9. Ada2b microarray	50
5. Az eredmények megvitatása	52
6. Summary.....	58
7. Köszönetnyilvánítás.....	62
8. A dolgozatban használt rövidítések.....	63
9. Irodalomjegyzék	65
10. Függelék	72

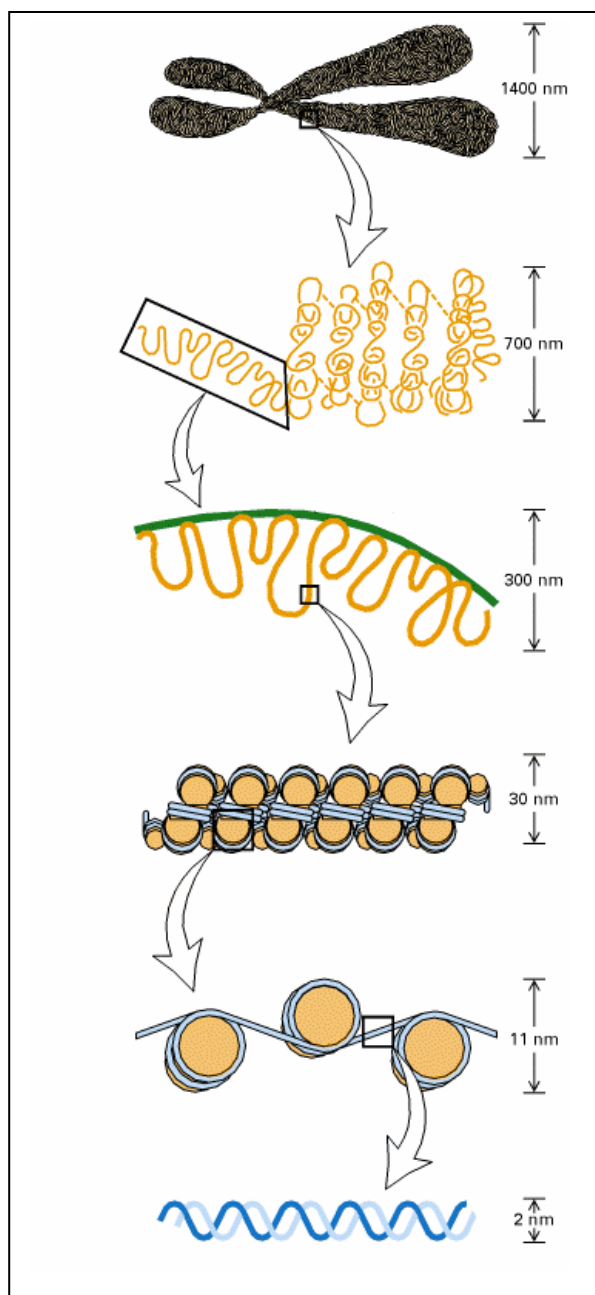
1. Bevezetés

1.1. Az eukarióta kromoszóma szerkezete

Az eukarióta szervezetekben a transzkripció szigorúan szabályozott, soklépéses folyamatban valósul meg. Általános transzkripciós faktorok, gén specifikus transzkripciós aktivátorok és kofaktorok sokasága szükséges ahhoz, hogy a kondenzálódott kromatin szerkezetben a gének promóterénél lehetségessé váljon az RNS polimeráz II transzkripció iniciációja (18, 36). A folyamat egyik kulcsfontosságú kérdése az, hogy hogyan közvetítik a jelet az aktivátorok a távoli szabályozó elemektől az alap transzkripciós rendszer felé.

A méteres hosszúságú DNS fonálnak megfelelő eukarióta genom mikrométer nagyságrendű sejtmagba történő becsomagolódásakor a genom kromatin szerkezetbe tömörül. A kromatin szerkezet legelső szintjén a DNS hiszton fehérjékre tekeredik fel. A hisztonok minden eukariótában megtalálhatók és nagyfokú szerkezeti konzervativizmust mutatnak. Például a szarvasmarha és a borsó H4 hisztonját kódoló DNS szakasz mindössze 2 nukleotidban mutat eltérést. A különböző hiszton fehérjék oktamereket hoznak létre, amelyek egy-egy pár H2A, H2B, H3 és H4 típusú hiszton fehérjéből épülnek fel, míg a H1 az oktamereket összekötő DNS szakaszokhoz kapcsolódik. A nukleoszómaiban a hisztonok orsó alakú struktúrákba szerveződnek, amelyek köré 2 menetet létrehozva tekeredik fel a 160 nukleotidnyi DNS. Az így kialakult füzér átmérője 11 nm. A DNS tömörülésének következő lépése a 30 nm-es szolenoid struktúra kialakulása, amely a nukleoszóma feltekerekedése során kialakuló üreges tekercs struktúrát mutat. Az így kialakult térszerkezetet a nukleoszóma H1 hisztonjai között kialakuló kölcsönhatás stabilizálja. A további kondenzálódási lépésben a kromatin fibrillum hurkokat képez, és mindegyik hurok rögzül az alapján, így egy szupertekercsszerű állapotot hoz létre a lineáris DNS-en. Ezen struktúra 300 nm átmérőjű. A további feltekerekedések pontos lépései nem ismertek, de megfigyelhető még egy 700 nm-es állapot, amely sugárirányú hurokformaként ismert. Végül egy eddig ismeretlen lépés során kialakul a metafázis során megfigyelhető 1400 nm-es erősen kondenzált eukarióta kromatin struktúra (1. ábra).

A kromatin szerkezet és a génexpresszió szabályozásának kapcsolata az utóbbi években vált nyilvánvalóvá. Azok a gének, amelyek egy adott szövetben nem expresszálódnak és indukciójuk sem lehetséges, a kromatin szintjén egy kiterjedt,



1. ábra

A kromatin szerkezet kialakulásának lépései és a kialakuló szerkezetek méretei. A 2 nm átmérőjű kettős szálú DNS az eddig ismert négy, és további ismeretlen kondenzációs lépéseken keresztül hozza létre az 1400 nm-es metafázisos kromoszóma szerkezetet.

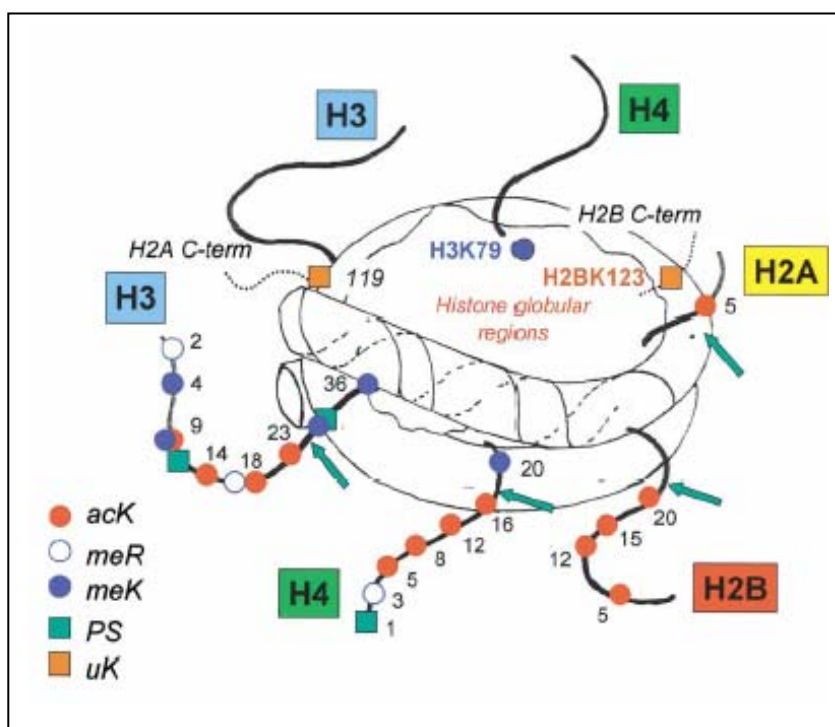
periodikusan rendezett nukleoszóma rendszerrel jellemezhetők és további faktorok számára nem hozzáférhetők. Az aktív gének esetében a génszabályozásban fontos szerepet játszó enhancer és promóter régiók általában nukleoszóma mentesek. Ezek a szakaszok aspecifikus DNáz enzimek hasítására akár 1000-szer érzékenyebbek lehetnek, mint egyéb régiók. Valószínűsíthető, hogy az aktív génszabályozási folyamatokat közvetítő DNS-kötő fehérjék működését akadályozza a kötőhelyeiket borító nukleoszóma jelenléte. A transzkripció elindulásakor viszont a szekvencia specifikus faktorok kötőhelyei felszabadulnak, és a nukleoszóma a már sikeresen kötődött transzkripciós faktorok közelében már gyengébben kötődnek.

1.2. A hisztonok kovalens módosításainak szerepe a génregulációs folyamatokban

A nukleoszóma szerkezetet kialakító sejtmagi hisztonok N-terminális farki doménjei különböző kémiai módosulásokon eshetnek át, mint az acetiláció, metiláció, foszforiláció, ubiquitináció és SUMO-iláció. A különböző poszt-transzlációs módosítások hatására az

eltérő módosításokat tartalmazó nukleoszóma más-más fehérjékkel kapcsolódhatnak és további kovalens módosításokon eshetnek át. A nyolc hiszton fehérjét tartalmazó nukleoszómban elméletileg több millió a farki domének matematikailag lehetséges kovalens módosításainak kombinációja, amely akár minden egyes hisztonnak egyedi jelleget képes kölcsönözni egy eukarióta kromoszómán belül (2. ábra).

A hiszton kód hipotézis alapja, hogy a különbözőképpen módosított nukleoszóma variánsok másképp viselkedhetnek, más és más kromatin szerkezeti feladatokat láthatnak el. A hiszton kód működését néhány esetben már sikerült megfejteni. A nukleoszóma DNS-hez való kapcsolódását katalizáló Chromatin Assembly Factor fehérjék csak bizonyos pozíciókban acetilált hisztonok beépítését tudják végrehajtani (47). A génaktiváció több esetben hiszton hiperacetilációval és foszforilációval jár együtt, míg a gének inaktivációját több esetben specifikus hiszton metiláció kíséri. A fő heterokromatikus fehérje a HP1, a specifikusan metilált H3-K9 (a H3 hiszton 9. pozícióban lévő lizinje metilált) hisztonon keresztül kapcsolódik a kromatinhoz, és hozza létre az inaktivációt. A mitózis során, a metafázisban a H3-S10 foszforilációjára van szükség a maximális kondenzáltságú kromoszómák létrejöttéhez.



2. ábra

A hisztonok N-terminális oldalláncainak kovalens módosításai. A számok jelzik azon aminosavak pozícióit, melyek oldalláncai módosulhatnak. Piros kör jelzi az acetilált lizint, fehér a metilált arginint, kék a metilált lizint. Zöld négyzet jelöli a foszforilált szerint és narancs négyzet az ubiquitin módosított lizint.

1.2.1. A hiszton metiláció szerepe

A hisztonok metilációja elsődlegesen a transzkripció represszióját okozza (95). A metiláció történhet lizinen és argininen (16). Megfigyelhető mono-, di- és trimetiláció is, melyből a trimetiláció irreverzibilis (75). A H3 lizinek metilációjának szerepe már részben ismert, a heterokromatin kialakításához szükséges. A metiltranszferázok legnagyobb csoportját a SET domént tartalmazó hiszton metiltranszferázok alkotják, amelyek a H3 4-ik, 9-ik, 27-ik, 36-ik és a H4 20-ik lizinjeit metilálják. (11, 21, 41, 63, 94). A nem SET domént tartalmazó lizin metiltranszferázok célpontja a hiszton 3 lizin 79 (21). Az arginin metiltranszferázok a H4 arginin 3-as és a H3 arginin 2, 17 és 26-os helyeken képesek metil csoportot elhelyezni (72).

A H3 9. lizinjén főként a heterokromatikus régiókban figyelhető meg metiláció (64). A 9. lizin metilációja után a HP1 kromodoménja felismeri a metilációs jelet és kötődésével elősegíti a DNS kondenzációját (42, 54). Szintén a heterokromatin kialakulásához szükséges a H3 79. lizinjének metilációja, amely a telomer régiók heterokromatikus formában tartásáért felelős.

A hiszton 3 lizin 4 oldalláncának metilációjára a COMPASS fehérjekomplex (Complex Proteins Associated with Set1) képes, amely a H3 4. lizinjét képes metilálni az átíró gének környékét (38, 50). A H3 4. lizinjének metilációja a telomer környéki gének kikapcsolásáért is felelős (71).

A komplex a hiszton 3 lizin 36 metilációját végzi (79). A Set2 tartalmú komplex először kapcsolódik a foszforilált RNS polimeráz II-höz és csak ezután történik meg a H3 lizin 36 metilációja (39).

Metiláció nem csak hisztonokon történhet, hanem a DNS CpG szigetei is metilálódhatnak. Ezek a szigetek főként a gének promóter régióiban találhatóak, és metilációjuk a gének transzkripciójának megszűnését eredményezi (45, 49, 66). A heterokromatinban a CpG szigetek szintén metilált állapotban vannak (58). A hiszton metiláció és a DNS metiláció szorosan összekapcsolt folyamatok. A feltételezés szerint a metilált CpG szigetek a hiszton metiltranszferázok felismerő helyei és így irányítják a hisztonok metilációját, majd a heterokromatin kialakítását (53).

1.2.2. Hisztonok foszforilációja

A hisztonok foszforilációja elsődlegesen a kromatin kondenzációjához szükséges a sejtciklus során. A mitózis folyamán a H1 hiszton foszforilált formája, a sejtciklus egyik fontos regulátora, a cdc2 kináz szubsztrátjává válik (17, 73). A kinázok hiányában a mitózis során az eukromatikus kromoszóma régiók nyitott állapotban maradnak és nem képesek a metafázisos kromatin szerkezet kialakítására.

A H3 10. szerinjének foszforilációját végző JIL-1 kináz eltávolítása a kromoszóma fellazulását okozza (89). A JIL-1 kináz másik funkciója, hogy segíti a *Drosophila* dózis kompenzációs komplexeket, így képes az X kromoszómás gének kifejeződésének serkentésére a hímekben (27, 43).

1.2.3. Hisztonok SUMO-ilációja

A hisztonok SUMO modifikációja az egyik legújabban felfedezett módosítás, érdekessége, hogy a SUMO fehérje önmagában 20 kDa méretű. A modifikáció elsődleges célpontja a H4 N-terminális farki része. Funkciója feltételezhetően a transzkripció repressziója. A módosítás a promóter környéki régiókon figyelhető meg. A SUMO fehérje kapcsolódása a H4 hisztonhoz elősegíti a HDAC1 és HP1 kötődését az adott régióhoz (74).

További megfigyelés, hogy a hiszton módosításban résztvevő komplexek többsége SUMO módosításon esik át (86).

1.2.4. Hisztonok ubiquitinációja

Az ubiquitin a lizin aminosavra képes kapcsolódni. Az egyik ismert ubiquitináció a H2A 119. lizinjén történik. A H2A hisztonok 15 %-a módosított formában található a kromoszóma struktúrában (56). A második ismert célpont a H2B C-terminális régiójában található 120. lizin. Ennek eredményeképpen a H2B 1 %-a található módosított formában (90). Az ubiquitináció feltételezett funkciója a transzkripció aktivációja, mivel a transzkripcionálisan aktív gének környékén erőteljes H2A és H2B ubiquitináció figyelhető meg (44), továbbá az ubiquitinációs mintázat eltűnik, ha a sejtek transzkripcióját gátoljuk (20).

Bizonyos esetekben azonban a hiszton ubiquitináció transzkripcionálisan csendes területeken is megfigyelhető, mint például az egér spermatidákban (4).

Az ubiquitináció egyértelmű funkciója még nem ismert, egyazon helyen módosított H2A és H2B képes pozitívan és negatívan is befolyásolni a transzkripciót a módosítás genomikus környezetétől függően.

1.2.5. A hiszton acetiláció szerepe

A hisztonok acetilációja elsődlegesen a H3 és H4 hiszton N-terminálisán található lizin aminosavakon (3. ábra) figyelhető meg (46). A hisztonok acetilációját a hiszton acetiltransferáz komplexek végzik. Két csoportjukat ismerjük, az egyes típusú acetiltransferázok a transzkripció szabályozásában vesznek részt (2), míg a kettes típusúak a nukleoszóma összeszerelődésében játszanak szerepet (87). A már módosított hisztonokról az acetil csoport eltávolítását a hiszton deacetiláz komplexek végzik (28).

A hisztonok acetilációs módosításának két fő ismert szerepe van. A sejtciklus S fázisában és a citoplazmában frissen szintetizálódott szabad H3 és H4 hisztonok acetilálódnak és képessé válnak másik H3 és H4 hisztonnal összekapcsolódni (87). Az így kialakult tetramer már képes belépni a nukleoszómába. Nem sokkal ezután az acetil csoportok részben eltűnnek a hisztonokról. Ezt támasztja alá az a tény, hogy ha élesztőben a replikáció során eltávolítjuk az acetil csoportokat a hisztonokról az élesztő sejtek elpusztulnak (46).

Az acetiláció másik fontos funkciója a génexpresszió szabályozása (26). Megfigyelhető, hogy az intenzíven átíródó gének régiója erőteljesen acetilálódik, és sokkal érzékenyebb a DNáz emésztésre (29).

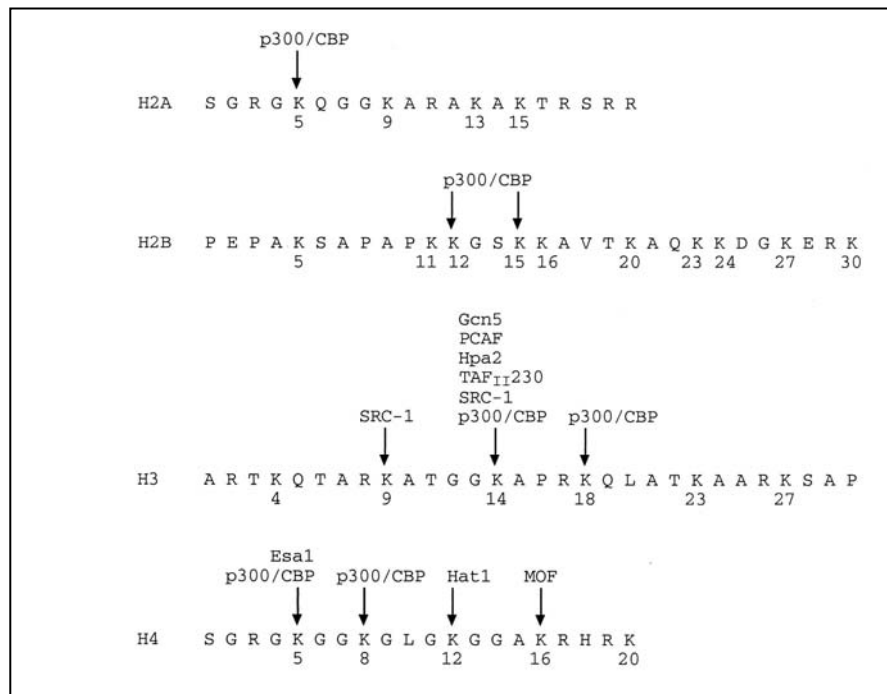
Az X kromoszómális gének hímekben és nőstényekben eltérő mértékű transzkripcióját a H4 16. lizinjének acetilációja szabályozza (2). Az emlős nőstényekben ez a lizin csak gyengén acetilált, amely az (egyik) X kromoszóma inaktivációját okozza (8, 34). A *Drosophila* hím X kromoszómán a H4 16. lizinjei erősen acetiláltak, amely hatására az ott található gének erősebben fejeződnek ki. Ezt a folyamatot a dózis kompenzációs komplexek végzik (2).

1.3. Hiszton acetiltranszferázok

A hiszton acetiltranszferázoknak (HAT) két nagy csoportja ismert, A és B típus. Csoportosításuk alapja az acetiltranszferázok sejten belüli elhelyezkedése (22). Az A típusú acetiltranszferáz komplexek a sejtmagban, míg a B típusúak a citoplazmában találhatóak.

A B típusú hiszton acetiltranszferázok az újonnan szintetizálódott szabad hisztonokat acetilálják, elősegítve ezzel a fehérjék transzportját a sejtmagba (67, 77). Például a sejtciklus S fázisában a szabad H3 és H4 hisztonok acetilálódnak és képessé válnak másik H3 és H4 hisztonnal összekapcsolódni. Az így kialakult tetramer már képes belépni a nukleoszómába. Nem sokkal ezután az acetyl csoportok részlegesen eltűnnek a hisztonokról.

Az A típusú hiszton acetiltranszferázok a nukleoszómális hisztonok acetilálását végzik, ezáltal a génexpresszió szabályozásában vesznek részt (12, 77, 81). Megfigyelhető, hogy az intenzíven átíródó gének régiója erőteljesen acetilálódik, és sokkal érzékenyebb a DNáz emésztésre. Ismert továbbá, hogy a *Drosophila melanogaster* hímek és nőstények között az X kromoszómális gének transzkripciójának szabályozása a hiszton 4 16. lizinjének acetilációja révén valósul meg, ami a dózis kompenzáció kialakításában játszik fontos szerepet (82).



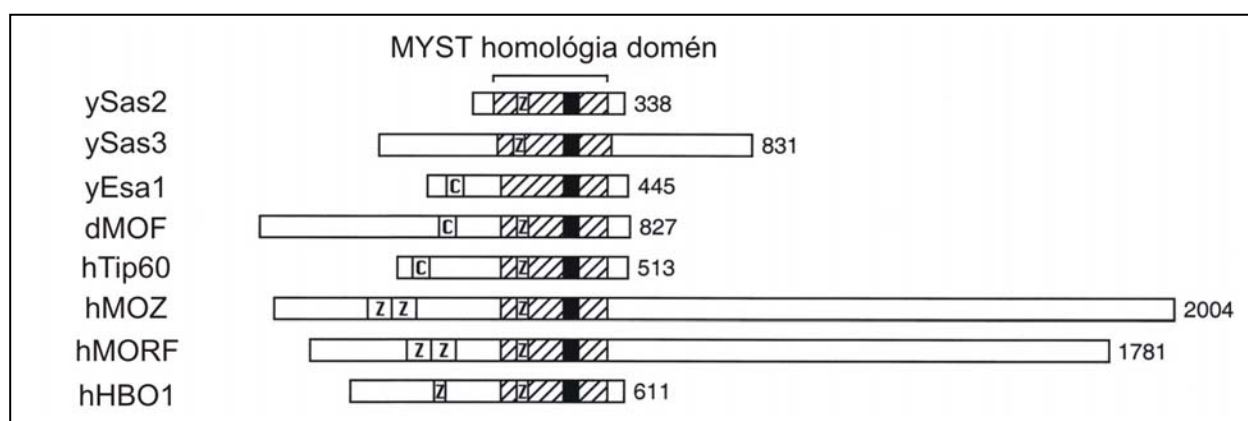
3. ábra

Az egyes hisztonok oldalláncain történő módosítások helyei. Nyilak jelzik az eddig megismert módosításokban szerepet játszó hiszton acetiltranszferáz komplexek lizin acetilációs célpontjait.

A hiszton acetiltranszferázokat funkciójuk és homológiájuk alapján 5 nagyobb csoportba soroljuk (84). A GNAT fehérjecsalád HAT és bromodoméneket (55), a MYST család MYST homológia domént tartalmaznak (9). A p300/CBP nagyon hasonló a GNAT szupercsaládhoz, de tartalmaz CREB DNS kötő domént, nukleáris hormon receptor domént és egy, a nem hiszton típusú fehérjékkel kölcsönhatást biztosító ZZ-TAZ domént (5). A nukleáris receptor koaktivátor család tagjai szteroid típusú receptorok által szabályozott útvonalakban közvetítik a jelet (30, 85), míg a TAF (II) 250 család a TFIID komplexben tölt be acetiltranszferáz funkciót (51).

1.3.1. MYST szupercsalád

A csoportba tartozó acetiltranszferázok közös jellemzője, hogy MYST homológia domén található bennük (9). Tagjai a MOZ, Sas2, Sas3, Tip60, a Drosophila MOF és a humán MORF (4. ábra). A Sas2 és Sas3 fehérjék eddig azonosított feladata az élesztő párosodási ciklus (mating type) lókuszt transzkripciójának csendesítése (65). A Sas2 szükséges továbbá a telomer régió transzkripcionálisan néma állapotának létrehozásához. A Sas3 szubsztrátja a H3 hiszton, míg a Sas2 képes acetilálni a H3, H4 és H2A szubsztrátokat is (83). Az Esa1 acetiltranszferáz a sejtciklus szabályozásában tölt be esszenciális szerepet (76). Képes acetilálni a H3, H4 és H2A hisztonokat is, de legnagyobb affinitással a hiszton 4 5. lizinjét (3. ábra) (15). A Esa1 hiányában a sejtek megrekednek a G2/M fázisok közötti átmenetben (15).



4. ábra

A MYST homológia domént tartalmazó acetiltranszferáz komplex eddig azonosított tagjai.

Drosophila melanogaster-ben a MOF fehérje a hiszton 4 16. lizinjének acetilációját végzi (3. ábra) (32). Szerepe a hímek és nőtények X kromoszómás különbségeiből adódó génexpressziós változások kiegyenlítése a dózis kompenzációs folyamatok szabályozása révén (33)

A MOZ és MORF fehérjék hiányában onkogenikus transzformációk figyelhetők meg, melyek leukémiához vezetnek (9). A fehérjék elsődleges szubsztrátjai a H3 és H4 hisztonok (14). Az egyetlen eddig emlősökben azonosított MYST acetiltranszferáz a Tip60. Ez a fehérje volt az első bizonyíték az acetiltranszferázok és a transzkripció aktivációja közötti kapcsolatra. Képes kölcsönhatni a HIV Tat fehérjével és annak DNS kötő aktivitását nagyságrendekkel növelni (31). A szabad H3, H4 és H2A hisztonokat erőteljesen acetilálja, de a nukleoszómában található hisztonokat csak nagyon gyengén (35).

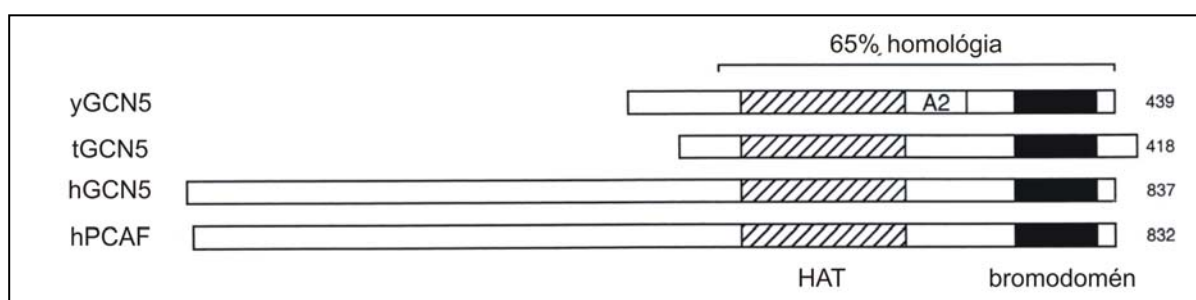
1.3.2. GNAT szupercsalád

Az egyik legjobban ismert hiszton acetiltranszferáz család a GNAT szupercsalád, melynek számos tagja ismert, mint például a GCN5, (humán homológja a PCAF) (13, 80), Hat1, Elp3, Hpa2 (55) (5. ábra). Ezen fehérjék rendszerint összetett protein komplexekben találhatók, amelyek felépítésében számos koaktivátor és adapter fehérje is részt vesz.

A *Saccharomyces cerevisiae*-ben a GCN5 hiszton acetiltranszferáz fehérje több, sok alegységes fehérje komplexnek is része (19). Ezek közül az eddig jellemzett legnagyobb komplex az 1,8-2 MDa-os SAGA (SPT-ADA-GCN5-acetyltransferase) komplex, amely 4 különböző fehérjecsalád tagjaiból épül fel: Az ADA fehérjék, a TBP-vel kölcsönható SPT család tagjai, számos TAF fehérje és a TRA 1 protein (23). Egy másik – az élesztőben azonosított – GCN5 fehérjét tartalmazó hiszton acetiltranszferáz aktivitást mutató komplex a 0,8 MDa méretű ADA komplex. Sok tekintetben eltér a SAGA komplextől, ez ugyanis csak egyetlen fehérjecsalád tagjait tartalmazza, összesen négy fehérje kapcsolatából alakul ki: ezek az ADA2 (7), ADA3, GCN5 és az AHC1 fehérje. Mindkét komplex a H3 hisztonok acetilációját végzi, de különböző helyen található lizint képesek szubsztrátként használni (24). Ezek az eredmények egyértelműen megvilágítják azt a tényt, hogy az élesztőben a két ADA-GCN5 tartalmú hiszton acetiltranszferáz komplex különböző funkciót tölt be. Emlősökben napjainkig a GCN5 két izoformáját azonosították, a GCN5 és PCAF fehérjéket (93). Bár a két fehérje eltérő méretű és különböző fehérje faktorokból felépülő komplexekben található, mégis mindkettő a H3 14. és a H4 8. lizinjének acetilációját szabályozza. (70, 93). A PCAF tartalmú komplexek regulátor szerepét a sejtmagi receptor

jelátvitelben, és a sejtciklus szabályozásban is igazolták (37, 62, 92). Képesek acetilálni a nem hiszton típusú kromatin fehérjéket (HMG17, HMG1) a MyoD, a HIV Tat és a p53 fehérjéket is.

A GNAT családba tartoznak még a Hat1, Elp3 és a Hpa2 acetiltranszferázok (55). A Hat1 B típusú acetiltranszferáz, a citoplazmában található H4-es hisztonokat acetilálja a 12. lizinen (61). Az Elp3 a sejtmagban található, az RNS polimeráz II komplex felépítésében vesz részt. Feladata a transzkripció elongációjában a polimeráz előtti hisztonok acetilációja (59). Az Elp3 képes mind a négy hiszton acetilációjára (91). A Hpa2 a legújabban felfedezett acetiltranszferáz, a H3 14. lizinjét képes acetilálni, de funkciója eddig nem tisztázott (3).



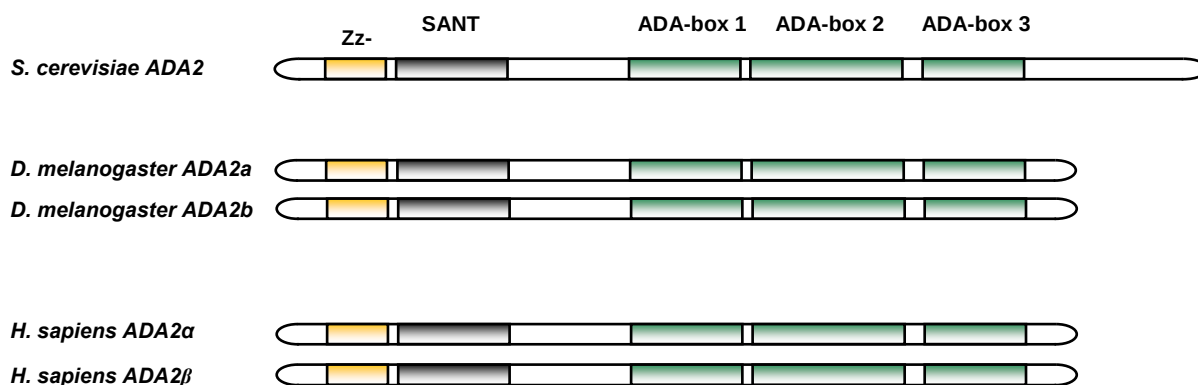
5. ábra

GCN5 tartalmú hiszton acetiltranszferáz komplexek. Minden a csoportba tartozó fehérje tartalmazza a hiszton acetiltranszferáz domént (HAT) és a bromodóment.

1.4. ADA2 transzkripciós adapterek

A GNAT komplexekben résztvevő ADA2 fehérjéről általánosságban elmondható, hogy az N-terminális régióban található bennük egy Zn-ujj szerkezetű DNS-kötő motívum (6. ábra). Az N-terminális vég közelében egy SANT domén helyezkedik el (1, 10). E struktúra mögött három konzervált, csak ADA fehérjékre jellemző szekvencia, az úgynevezett ADA box található. A C-terminális vég közelében egy ATP/GTP-kötő domén helyezkedik el, amely jelzi, hogy e fehérjék energiaigényes folyamatok katalizálásában vesznek részt (52).

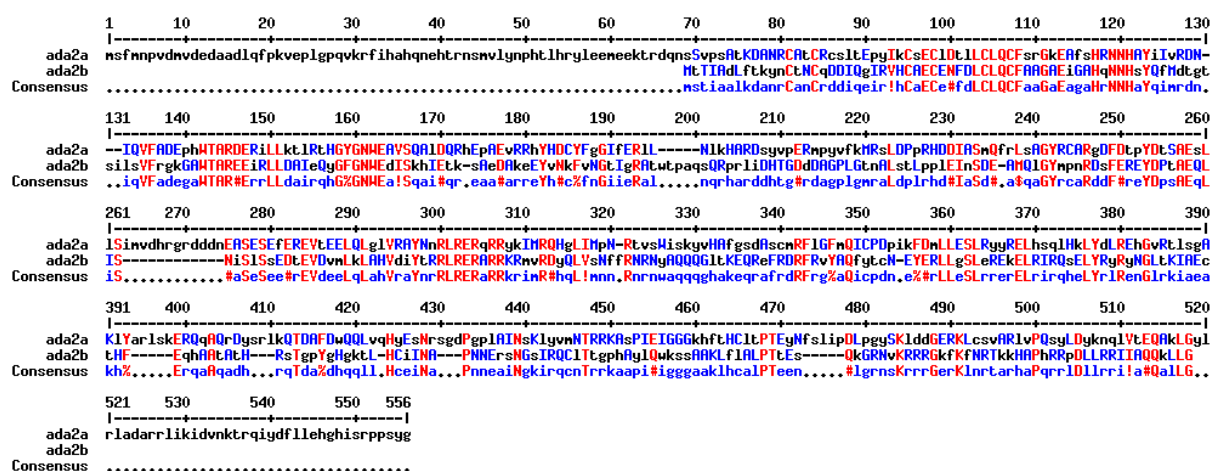
Az ADA2 adapter fehérjét tartalmazó hiszton acetiltranszferáz komplexek szerepet játszanak a magasabb rendű eukarióták transzkripciós szabályozásában is. Az *Arabidopsis thaliana*-ban két eltérő, viszont egymással nagy szekvencia homológiát mutató *Ada2* gén található (48, 78). Hasonlóan két *Ada2* gén található számos magasabbrendű eukariótában, köztük az egér (88) és az ember genomában is (6).



6. ábra

Az ADA2 fehérjék homológjai élesztőben, ecetmuslicában és emberben. A fehérjék N-terminális régiójában található a DNS kötő cink finger és SANT domének. A C-terminális régiók tartalmazzák az ADA fehérjékre jellemző, más fehérjékkel kölcsönhatást biztosító ADA-box régiókat.

Csoportunk korábbi eredményei igazolták, hogy a *Drosophila melanogaster* genomja szintén két egymással homológiát mutató ADA2 fehérjét kódoló gént tartalmaz. Az ADA2a és ADA2b fehérjék homológiáját a 7. ábra mutatja.



7. ábra

Az ADA2a és ADA2b fehérjék homológiája. A piros szín jelöli a teljes egyezést, a kék a homológ aminosavak jelenlétét.

Az *Ada2a* gén helyzetét a 90F9, míg az *Ada2b* gént a 84F5 citológiai régióban azonosítottuk. Élesztő kettős hibrid segítségével kimutattuk, hogy mind az ADA2a, mind az ADA2b képes a *Drosophila* GCN5 fehérjével kölcsönhatást kialakítani, amely bizonyítja,

hogy a *Drosophila* ADA2 fehérjék hiszton acetiltranszferáz komplexek felépítésében vesznek részt. A kölcsönhatást immunprecipitációs kísérletben is sikerült igazolnunk.

Az ADA2a fehérje egy 0,8-1 MDa, míg az ADA2b egy megközelítőleg 2 MDa molekula tömegű komplex tagja. Adatainkból és a Jerry Workmann laborjából származó adatok alapján bizonyítható, hogy a két komplex felépítésében – a GCN5 és ADA3 fehérjéket kivéve – eltérő fehérjék vesznek részt. Az ADA2b tartalmú komplexek az élesztő SAGA komplexéhez mutatnak nagy hasonlóságot, ezért a nevük dSAGA. Az ADA2a tartalmú komplexek viszont az élesztő ADA komplexeivel közel megegyező méretet mutatnak, elnevezésük ATAC (Ada Two A containing Complex) (25).

Az ADA2a fehérje esszenciális szerepét mutatja, hogy az *Ada2a* gén eltávolításával létrehozott mutáns állatok az L3 lárva stádium végén és a P4 báb állapot közötti időszakban megrekednek a fejlődésben. A mutáns állatok 10 nappal később bábozódnak a vad típusú állatokhoz képest és nem képesek sem a spirákulum kitűrésére, sem normális alakú báb létrehozására. Legújabb adataink alapján feltételezzük, hogy a fehérje a H4 hisztonok acetilációját végzi és az ekdizon által szabályozott jelátvitelben van fontos szerepe.

A dolgozatomban elsődlegesen az *Ada2b* gén szerkezetével és a róla képződő fehérjék funkciójával foglalkozom, az ADA2a fehérje által szabályozott folyamatok ismertetésére csak néhány esetben térek ki.

2. Célkitűzések

1. Mivel az ADA2b fehérje funkciójáról magasabb rendű eukariótákban nem állt rendelkezésre adat, kísérletünk célja volt a *Drosophila Ada2b* gén promóter régióiban található P-elem újra mobilizálása, és tökéletlen kivágódás eredményeképpen *Ada2b* deléciós mutáns allélek előállítása.
2. Következő célunk volt a mutánsok segítségével meghatározni azokat a hiszton típusú és egyéb fehérjéket, amelyek acetilációját az ADA2b tartalmú komplexek végzik.
3. Végül a mutánsok analízise során megfigyelt változásokból az ADA2b tartalmú komplexek által szabályozott gének és biokémiai útvonalak azonosítását szeretnénk volna elvégezni.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Klasszikus genetikai módszerek

3.1.1. Deléció mutánsok létrehozása P-elem újra mobilizálás útján

1. $w/w ; +/+ ; EP(3)3412 / EP(3412) \otimes w^+/y ; +/+ ; TM3SbP(\Delta 2-3) / Df(3R)C7$



2. $w/y ; +/+ ; EP(3)3412 / TM3SbP(\Delta 2-3) \otimes w/w ; +/+ ; TM3Sb / TM6Hu$



3. $w ; +/+ ; P(kivág) / TM3Sb$ vagy $TM6Hu \otimes w ; +/+ ; TM3 Sb / TM6Hu$



4. $w/w ; +/+ ; P(kivág) / TM3Sb \otimes w/y ; +/+ ; P(kivág) / TM3Sb$

Az 1. keresztezésben a P elemet tartalmazó homozigóta törzset egy transzpozáz forrást $P(\Delta 2-3)$ hordozó törzshöz kereszteztük, hogy a P-elemet mobilizáljuk. A $P(\Delta 2-3)$ transzpozáz forrás lehetővé teszi a transzpozáznak mind a szomatikus, mind az ivarsejtekben történő kifejeződést. A P-elemben található egy *miniwhite* marker gén, amely *white* null mutáns háttéren narancs szemszínt okoz.

A 2. keresztezésben történik a P-elem kiugrása. A klaszterek elkerülésére minden keresztezésből csak egy fehér szemű utódot használtunk.

A 4. lépés a kapott fehér szemű legyek törzsbe állítását szolgálja, miközben vizsgáltuk azt, hogy a P-elem kivágódása következtében keletkezett-e a 3. kromoszómán letális mutáció. A *TM3* balanszerrel szemben a kapott letális vonalak stabil törzsként fenntarthatók.

3.1.2. A P-elem mobilizálásából kapott vonalak letális fázisának meghatározása

3.1.2.1. Embrionális letalitás vizsgálat

A vizsgálathoz az *Ada2b*⁸⁴²-es számú mutáns törzset használtuk. A mutációnál meghatározott számú petéből számoltuk a kikelő lárvák számát. Minden keresztezésből 3 párhuzamos kísérletet végeztünk, és az eredményeket összegeztük. Megvizsgáltuk a ki nem kelt peték sterilitását. A ki nem kelt petéket Hoyer's: tejsav 1:1 arányú keverékét használva tárgylemezre preparáltuk, majd 65 °C-on inkubáltuk 1 órán át. A kezelés hatására áttetszővé vált embriókat fáziskontraszt mikroszkóppal vizsgáltuk. A számításoknál a steril peték számát levontuk az összes, és a ki nem kelt peték számából is.

3.1.2.2. Lárvális letalitás vizsgálata

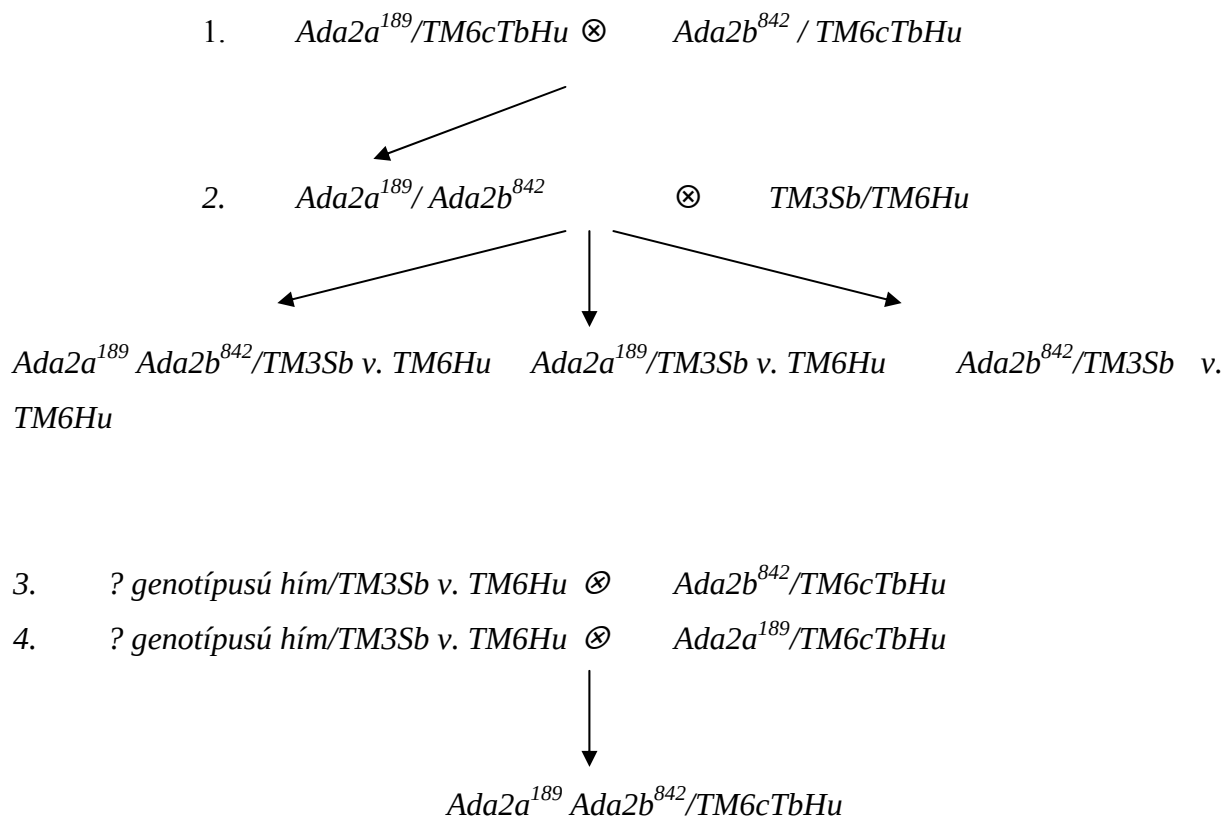
A vizsgálathoz az *Ada2b*⁸⁴²-es számú mutáns törzset használtuk, és a mutációt TM6c balanszerrel tartottuk fenn.

A kísérletben fiolában petéztettünk és számoltuk a bábokat. Mivel a *Tb* (rövid tömzsi báb) domináns markert hordozó balanszert használtuk, így könnyen megkülönböztethetőek voltak a mutáns homozigóta és a heterozigóta balanszeres állatok.

A keresztezésekben az utódok 1/3-a lesz homozigóta mutáns, míg a 2/3-a heterozigóta balanszeres. Ha a mutáns allél nem okoz lárvális letalitást, akkor az utódok között 1:2 arányban lesznek *Tb*⁺ és *Tb*⁻ legyek.

3.1.3. Az *Ada2a*¹⁸⁹ és *Ada2b*⁸⁴² kettős mutánsok létrehozása

A keresztezés sémája:



A 2. keresztezésben történik a rekombináció, ezért fontos hogy az *Ada2a*¹⁸⁹ *Ada2b*⁸⁴² genotípusú légy nőtény legyen.

A 2. keresztezés utódai között fenotípus alapján még nem tudjuk eldönteni az utódokról, melyik genotípus kategóriába tartoznak, ezért van szükség a 3. és 4. lépésekre. Ezekben a keresztezésekben történik szűrés a kettős mutánsokra. Mindkét mutáció homozigóta formában letális, tehát ha valamelyik mutáció homozigóta formába kerül, az utód elpusztul. A 3. és 4. keresztezésben ugyanaz a hím szerepel, ha egyik keresztezésben sem jelenik meg a balanszer kromoszómát nem hordozó utód, akkor sikerült a két mutációt (*Ada2a*¹⁸⁹ *Ada2b*⁸⁴²) egy kromoszómára rekombinálni.

3.1.4. Ősivarsejt transzplantáció

Az ősivarsejt transzplantáció elvégzéséhez a P-elem mutagenézisből létrejött *Ada2b*⁸⁴²/*TM6Hu* mutáns allélt kereszteztük ugyanezen mutánsok *CxD* balanszeres törzsével.

Az ősvarsejt befogadó szervezetnek *OvoD1/+* (K1237 domináns nőtény steril) petéket használtunk, a szülőket petéztető táptalajra helyeztük, majd 1 órán keresztül 25°C-on petéztettük. A 2-2,5 órás, blasztoderma állapotban lévő petéket lemostuk a táptalaj felületéről, majd 1 percig hypo oldatba helyeztük, és kétszer átmostuk PBS oldattal. Az így kapott petékről eltávolítottuk a mosó oldatot, fekete agar kockákra helyeztük őket, és a sorba rendezett petéket ragasztót tartalmazó fedőlemezre helyeztük, 12 percig szárítottuk, majd fluorokarbon olajat rétegeztünk a felületükre.

A donor embriókból kivett ősvarsejteket 3-4 gazda embrióba juttattuk, a gazda embriókat táptalajra helyeztük és a Petri csészéket páradús tiszta oxigént tartalmazó dobozba helyeztük 48 órára.

A kifejlett egyedek közül kiválogattuk a nőtényeket, majd mindegyiket egyedi pártenyészetben w^{1118} hímekkel kereszteztük. A kikelt utódokon vizsgáltuk az egyes markerek megjelenését. A várt kategóriák: *Ada2b⁸⁴²/CxD* *Ada2b⁸⁴²/TM6Hu* *CxD/TM6Hu* *Ada2b⁸⁴²/Ada2b⁸⁴²*. Ha mind a négy kategória megjelenik, akkor a vizsgált fehérjénknak nincs szerepe az embrionális fejlődésben.

Petéztető táptalaj:

- 90 g agar
- 1 l málnaszörp
- 6 g Nipagin M
- 100 g glükóz
- 3 liter desztillált víz

3.1.5. Testi sejt mozaik analízis

A szomatikus mozaik foltok létrehozásához *Ada2b⁸⁴²/CxD* nőtényeket *mwh-Ki^S/TM3SbSer* hímekkel kereszteztünk. Az utódokat röntgensugárzással kezeltük. A besugárzásra 15 Gy (10 Gy/s) nagyságú dózist használtunk 72-98 órás lárvákon. A kezelés befejeztével a lárvákat táptalajra helyeztük. A kikelt *Ada2b⁸⁴²/mwhKi^S* nőtényekből kutikula preparátumot készítettünk. A preparátum elkészítéséhez először 10 M NaOH oldatban főztük a legyeket, míg halvány barna színűvé vált az oldat. Ezután a NaOH oldatot eltávolítottuk a mintánkról, és forró vizet rétegeztünk a felszínére. Egy másik kémcső segítségével enyhe nyomást mértünk a mintára, vigyázva, hogy a kémcső ne mozduljon el közben. A vizet leszívtuk, majd újabb adag forró vizet rétegeztünk a mintára. A kapott folyadékot átöntöttük kis Petri csészére, majd a vizet eltávolítottuk a mintánk felszínéről. A visszamaradó kutikulára

Faure oldatot mértünk, majd a kutikula preparátumokat tárgylemezre helyeztük két sorba (minden sorba 4 legyet). A tárgylemezen lévő mintákat eligazítottuk és 2-3 napig száradni hagytuk. Faure oldattal bekent fedőlemezzel lefedtük és 5 napig lesúlyozva tároltuk. Az így kapott mintákat körömlakkal lezártuk és fénymikroszkóppal értékeltük.

Faure oldat

30 ml glicerol
30 g gumi arabicum
50 g chloral hydrate
50 ml desztillált víz

3.1.6. Nyálmirigy óriáskromoszóma preparálás

1. oldat: 28 µl 10 % NP-40
50 µl 10 X PBS
428 µl desztillált H₂O
2. oldat: 100 µl NP-40
50 µl 10 X PBS
50 µl 37 %-os paraformaldehid
300 µl desztillált H₂O
3. oldat: 225 µl 100 %-os ecetsav
225 µl desztillált H₂O
50 µl 37 %-os paraformaldehid
4. oldat: 450 µl 100 %-os ecetsav
550 µl desztillált H₂O

37 %-os paraformaldehid

0,185 g paraformaldehid (SIGMA)
7 µl 1 M NaOH
500 µl desztillált H₂O

A szövetek fixálásához használt paraformaldehid oldatot minden alkalommal frissen készítettük és maximum 3 órán keresztül használtuk. Az elkészített oldatot 3-5 percig forraltuk, és lehűlés után mértük a 2. és 3. oldatokba.

Az L3 vándorló stádiumban lévő élesztős táptalajon növesztett lárvákat 30 µl 1-es oldatban boncoltuk. A kiboncolt nyálmirigyet 30 µl 2. oldatba helyeztük, 40 másodpercig inkubáltuk, majd 40 másodpercre 30 µl 3. oldatban tároltuk. A végső lépésnél 50 µl 4. oldatot helyeztünk tárgylemezre (SUPERFROST) és a nyálmirigyeket 1 percig állni hagytuk az oldatban. Az idő lejártá után szilikonizált fedőlemezzel óvatosan lefedtük, körző mozgást végeztünk a fedőlemezzel, majd erőteljes nyomással szétnyomtuk a preparátumot.

A fedőlemez eltávolításához először folyékony nitrogénbe helyeztük a mintát, majd szike segítségével lepattintottuk a fedőlemezt. A mintánkat felolvadásig PBST (PBS + 0,1% TWEEN20) oldatban tároltuk.

Az ellenanyag festés első lépéseként a mintákat PBST + 5 % Foetal calf serum oldatba helyeztük, és 1 órán keresztül 25 °C-on inkubáltuk. Ezután a blokkoló oldatot eltávolítottuk és az elsődleges ellenanyagot tartalmazó 100 µl PBST + 5 % Foetal calf serum oldatba helyeztük éjszakára 4 °C-ra. Másnap a mintáinkat háromszor 5 percig PBST oldatban mostuk, majd 500X hígított Alexa festékhez kapcsolt másodlagos ellenanyagot helyeztünk a mintákra és 1 órán keresztül 25 °C-on sötétben inkubáltuk. A továbbiakban ismét 3 alkalommal PBST oldatban mostuk, és az első mosó oldatba 10000X hígított DAPI festéket helyeztünk. A mosó oldat eltávolítása után a mintákat 10 µl Fluoromount oldattal fedtük le és fedőlemezt helyeztünk rá.

3.1.7. Apoptózis festés (akridin orange)

A mutáns állatokat PBS oldatban felboncoltuk és a vizsgálni kívánt szöveteket 1,6 µg/ml akridin orange oldatba helyeztük 5 percre. Ezután PBS oldattal háromszor mostuk a szöveteket, majd tárgylemezre helyeztük, és fedőlemezzel fedtük le. Végül a kész preparátumot nedves kamrába tettük és fluoreszcens konfokális mikroszkóp alatt megvizsgáltuk.

3.1.8. Lárvális szövetek immunfestése

PBST

PBS + 0,1 % TWEEN20

PBSTF

100 µl 10 X PBS

120 µl 37 %-os paraformaldehid

780 µl desztillált H₂O

PBST-FCS

100 µl 10 X PBS

100 µl Foetal Calf Serum

1 µl TWEEN20

780 µl desztillált H₂O

A lárvákat 100 µl PBS oldatban felboncoltuk, majd 20 percre PBSTF oldatba helyeztük. A fixáló eltávolításához 100 µl-es PCR csőben 10 percig forgatva háromszor mostuk PBS oldattal. Ezután a mintákat 20 percig permeabilizáltuk PBS + 0,3 % TWEEN20 oldatban. A szöveteket 30 percig blokkoltuk 100 µl PBST-FCS, majd az elsődleges ellenanyagot tartalmazó 50 µl PBST-FCS oldatban forgatva 10-12 óráig 4 °C-on tároltuk a mintát. Az ellenanyag eltávolítására hatszor 100 µl PBST oldattal 5 percig mostuk, majd hozzáadtuk az 500X hígított Alexa555 másodlagos ellenanyagot, és 2 órán keresztül sötétben inkubáltuk. A mintákat négy alkalommal PBST oldattal 10 percig mostuk, majd tárgylemezre helyeztük és lefedtük.

3.1.9. Szempigment mérés

A szempigment mérésben használt állatok genotípusa:

$P[w^{+mc} GAL4-ninaE.GMR]12$ (BL1104),

$P[gmr-GAL4]/+ ; +/P[UAS-P53.Ex]3$ (BL8418),

$P[gmr-GAL4] /+ ; Ada2b^{842}/P[UAS-P53.Ex]$,

$+/+ ; Ada2b^{842}/+$,

Minden egyes genotípusú állatból 5 darab kifejlett állat fejét 500 µl 0,1 %-os ammónium-hidroxid oldatban feloldottuk, majd 500 µl kloroformot mértünk rá. A mintát összekevertük, majd az oldatból 400 µl-nyi mennyiséget átmértünk egy új Eppendorf csőbe és 600 µl vizet mértünk rá. A mintánkat újra összekevertük, majd 485 nm-en spektrofotométer segítségével megmértük.

3.1.10. Szárnyklón mozaikok létrehozása

Loss of heterozygosity (LOH) kísérletben a recesszív *multiple wing hairs (mwh)* fenotípus megjelenését vizsgáltuk röntgen sugárzás hatására. A besugarazott lárvák genotípusa: *mwh p53/TM6C* kontroll, *mwh p53/Ada2b⁸⁴²*. Vándorló L3 stádiumú lárvákat 2,5 Gy dózisu röntgen sugárzással kezeltünk (150 kV, 0.5-mm Al filter, 10 Gy/perc). Minden genetikai variációból 15 állatot használtunk a kísérletekben és az egyes eseteket legalább két alkalommal megismételtük.

3.1.11. Transzgenikus *Drosophila* törzsek létrehozása

A transzgenikus állatok létrehozásához az injektált konstrukciókat Qiagen midiprep kittel állítottuk elő a protokoll lépéseit követve. Az injektálni kívánt plazmid DNS-t $\pi\Delta 2-3$ segéd plazmiddal együtt injektáltuk, úgy hogy a P-elem plazmid végkoncentrációja 1000 µg/ml és a segéd plazmid végkoncentrációja 500 µg/ml injektáló pufferben volt feloldva. Az injektáláshoz a blasztoderma állapotú gazda állatokat először Clorox oldattal dezinfektáltuk, rövid ideig szárítottuk, lefedtük halokarbon olajjal, majd a DNS-t a mikropapilláris segítségével az embriókba juttattuk. Az injektált állatokat 2 nap múlva standard nipaginos táptalajra helyeztük.

3.1.12. S2 sejt kultúra transzfekció

Az ADA2b fehérjék izoformáit tartalmazó plazmidok ellenőrzésére Schneider 2 (S2) *Drosophila* sejt kultúrát transzfektáltunk CaCl_2 -os módszerrel. A transzfekciót 3 cm átmérőjű Petri csészében végeztük, amelyekben a kiindulási sejtszám 3×10^6 db sejt/ml volt. Az S2 sejtek tápoldata: gyári Schneider médium (Sigma) + 10 % Foetal calf serum (FCS) oldat + 1 % antibiotikum (ampicillin + sztreptomycin). A sejteket 24 °C-on növesztettük.

A transzfekció előtt három órával lecseréltük a sejteken a táptalajt. A transzfektálni kívánt DNS-t összekevertük 2,5 M CaCl_2 oldattal. (1. táblázat)

Minta	Transzfektált DNS (μg)	DNS (μl)	2,5 M CaCl_2 (μl)	Ioncserélt víz (μl)	Végtérfog (μl)
Ketel-GFP	3	5,2	25	219,8	250
pPUASP-Ada2bLg-EGFP	5	1,8	25	223,2	250
pPUASP-Ada2bSg-EGFP	5	1,8	25	223,2	250

1. táblázat: Az ADA2b fehérje izoformáit tartalmazó plazmidokkal transzfektált S2 sejtekben felhasznált DNS mennyisége
--

A mintákat lassan kevertetve hozzácsepegtettünk 250 μl HEPES oldatot, majd 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az így kapott 500 μl DNS oldatot a sejtekre csepegtettük. 12 óra elteltével 2 x 3 ml gyári Schneider médiummal mostuk a sejteket, majd 3 ml tápoldatot mértünk rájuk. A sejteket még 24 óráig növesztettük 24 °C-on.

A sejteket centrifugáltuk 2000 rpm-en 5 percig, majd a felső fázist eltávolítottuk. Ezek után a sejteket felfuszpendáltuk 100 μl 1 X PBS-ben, és 3,7 % formaldehiddel 5 percig fixáltuk őket 2000 rpm-en 5 perces centrifugálás közben. A felső fázis leszívása után a sejteket felfuszpendáltuk 100 μl 1 X PBS-ben. A fixált mintákból 30-30 μl-t tárgylemezre helyeztünk, és ezeket konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

3.2. Molekuláris biológiai módszerek

3.2.1. P-elem mobilizálásából kapott mutánsok analízise

3.2.1.1. Kromoszómális DNS izolálás

30 darab L3 stádiumú lárvát Eppendorf csőbe helyeztünk, majd 200 µl A pufferben homogenizáltuk. Amikor homogén szuszpenzióvá vált, további 200 µl A puffert mértünk hozzá, ezután 30 percig 65 °C-on inkubáltuk. Az idő lejártá után 800 µl LiCl/KAc keveréket adtunk hozzá és 10 percig jégen inkubáltuk. Eppendorf centrifugában 13000 rpm-mel 15 percig centrifugáltuk, majd a felső tiszta fázisból 1 ml-t pipettáztunk egy új Eppendorf csőbe, és a felülúszót vittük tovább. A felső homogén fázishoz hozzáadtunk 600 µl izopropanolt, összekevertük (vortex), majd újabb 15 perc centrifugálás következett 13000 rpm fordulaton. A felülúszót eltávolítottuk, a csapadékot mostuk 1 ml 70 %-os etanollal, majd beszárítottuk. Végül 150 µl vízben oldtuk a csapadékként visszamaradt DNS-t.

A puffer

100 mM Tris-HCl pH 7,5

100 mM EDTA

100 mM NaCl

0.5 % SDS

LiCl/KAc

1 rész 5 M KAc: 2,5 rész 6 M LiCl

3.2.1.2. PCR analízis

A reakciókhoz 18-30 bp hosszúságú 55 °C kapcsolási hőmérsékleten működő primereket használtunk. A denaturációt 30 másodpercig 94 °C-on végeztük. A hibridizáció 55 °C-on 30 másodpercig, míg a polimerizáció 72 °C-on 1 percig tartott. 35 ciklust hajtottunk végre. A reakció 50 µl-es végtérfogatban történt. A reakció elegy összetétele 2,5 µl 10 X

koncentrációjú Taq PCR puffer, 2 µl 25 mM MgCl₂, 2,5 µl 2,5 mM dNTP, 1-1 µl 5 µM primer, 1 µl Taq DNS polimeráz (Fermentas), 1 µl templát DNS.

3.2.2. Western analízisek

A fehérje preparátumok készítéséhez egy 1,5 ml-es Eppendorf csőben 10 db lárvát vagy adult nőtényt 100 µl minta pufferben (0,125 M Tris-HCl pH 6,8 4 % SDS, 20 % glicerín, 5 % 2-merkapto-etanol, 0,005 % brómfenolkék) 5 percig forraltunk, homogenizáltunk, majd újbóli 5 perc forralás után lecentrifugálva (2 perc 12000 rpm) a tiszta oldatot új csőbe vittük. Az így elkészített mintákat -70 °C-on tároltuk.

Az SDS-PAGE-hez X-cell mini-cell (NOVEX) futtató- és blottoló-egységet használtunk. A fehérje minták futtatását, Coomassie-festését, és a blottolást a gyártók által ajánlott módon végeztük. A blottoláshoz Hybond-P PVDF membránt (Amersham) használtunk.

A mintákból 2-2 µl-t megfuttatva Coomassie-festéssel ellenőriztük az egyes minták fehérje mennyiségét. Szükség esetén korrigáltuk a Western kísérletekhez használt minta térfogatokat, hogy az egyes minták azonos mennyiségű fehérjét tartalmazzanak.

Az egyes mintákból általában 10-10 µl-t (1db L3 lárvának vagy adultnak megfelelő mennyiség) szeparáltunk SDS-PAGE-sel 10 %-os gélben, majd a fehérjéket PVDF membránra vittük át.

A membránt ezután desztillált vízzel mostuk 1 percig, majd blokkoltuk 5 % sovány tejport tartalmazó TBST oldatban (10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween-20) 30 percig 37 °C-on. Az ellenanyagot hígítottuk 5 % tejpor-TBST oldatban, és ebben inkubáltuk a membránt éjszakán keresztül 4 °C-on. Ezután háromszor öblítettük, egyszer 15 percig, majd kétszer 5 percig TBST-vel szobahőmérsékleten mostuk. A membránt szobahőmérsékleten 1 órán keresztül szintén 5 % tejpor-TBST oldatban 20000-szeresére hígított, peroxidázzal kapcsolt másodlagos ellenanyaggal (DAKO) inkubáltuk. Háromszor öblítettük, egyszer 15 percig és háromszor 5 percig TBST oldatban mostuk. A membránt SuperSignal kemilumineszcens szubsztrát (PIERCE) oldatban inkubáltuk 10 percig a jel láthatóvá tétele céljából, majd zsugorfóliába csomagolva, autoradiografáló kazettában röntgen filmet helyeztünk rá.

3.2.3. PCR alapú Reverz Transzkripció

Drosophila lárvákból teljes RNS izoláláshoz Qiagen RNeasy kitet használtunk a javasolt protokoll szerint. A cDNS átíráshoz random hexamert és Mu-MLV reverz transzkriptázt (Sigma) használtunk, majd az így kapott cDNS 1 µl-ét használtuk templátnak a PCR reakciókban.

3.2.4. *Ada2b* menekítő transzgén létrehozása

A teljes *Ada2b* gént tartalmazó plazmid konstrukciót három, egymással átfedő PCR termékből állítottuk elő. Mindhárom DNS szakaszt először pTZ57R/T (Fermentas) plazmidba építettük be. Az 5' szakaszt ADA2bgene és ADA2bgeneL primerpárral hoztuk létre és *Bgl*II restrikciós hasítási helyet tartalmazott. A középső fragmentumot ADA2bRI és ADA2bBHI primer párokkal hoztuk létre és *Bgl*II és *Nco*I egyedi restrikciós enzim felismerő helyet tartalmazott. A gén 3' végét tartalmazó szakaszt pedig a DNSpol5'R és ADA2b3'F primer párokkal amplifikáltuk és *Nco*I egyedi felismerő helyet tartalmazott. Az egyes DNS darabokat az előbb említett enzimekkel pKS plazmidban (Fermentas) hoztuk létre, majd pCaSpeR4 vektorba klónoztuk *Kpn*I és *Not*I enzimek segítségével.

3.2.5. ADA2b fehérje izoformáinak GFP jelölése

A már korábban létrehozott pKS-*Ada2b* menekítő konstrukcióban első lépésben az eltérést mutató 3' szakaszokat cseréltük ki. Ehhez az egyedi 3' szakaszokat PCR segítségével hoztuk létre, az *Ada2b*¹ esetében *Ada2bNco*I és *Ada2b3'LBam*HI primerpárral, míg az *Ada2b*² esetében *Ada2bNco*I és *Ada2b3'SBam*HI primerekkel. Ezeket a szakaszokat az eredeti *Ada2b* konstrukcióba *Nco*I és *Bam*HI enzimekkel építettük be. Az így kapott *Ada2b*¹ és *Ada2b*² plazmidokba az EGFP kódoló szekvenciáját pEGFPN3 plazmidból *Bam*HI és *Not*I restrikciós emésztésekkel építettük át. Végül az *Ada2b*¹-EGFP és *Ada2b*²-EGFP kódoló szakaszokat pPUASP vektorba helyezzük *Kpn*I és *Not*I hasításokkal. A pPUASP biztosítja a transzlációs terminációs szignált, a poliadenilációt és lehetővé teszi a fehérjék túltermelését is.

3.2.6. *Ada2b*⁸⁴² DNS microarray

A specifikus ADA2b fehérjék által szabályozott gének azonosításához DNS microarray kísérletet végeztünk. Első lépésben a vad típusú *w*¹¹¹⁸ kontroll és *Ada2b*⁸⁴²

homozigóta állatokat szinkronizáltunk. Fehér báb stádiumban lévő állatokat gyűjtöttünk, majd nedves kamrában 25 °C-on tároltuk 10 órán keresztül, végül folyékony nitrogénbe helyeztük a mintákat. Minden Eppendorf cső 20-20 állatot tartalmazott és ezekből Qiagen RNeasy kittel a gyár javaslatait követve RNS mintát izoláltunk. Az RNS mintákat Christelle Thimbaud (IGBMC) strassbourg-i Affymetrix laborjába küldtük. A minta ellenőrzését és a fluoreszcens jelölést ott végezték az Affymetrix labor protokollját követve. A hibridizáció során Drosophila1 chipet használtunk GeneChip Fluidics Station 400 hibridizáló kamrában az EukGE_WS2v4 protokollt követve. A jel detektálásához Scanner GeneArray 2500 d'Agilent Technologies scannert használtunk 3 µm-es jelfelbontást alkalmazva.

Az adatok kiértékelésénél a kapott szignál intenzitás összehasonlításához a t-tesztet alkalmaztuk, majd az expresszióban tényleges változást mutató gének közül kiválasztottuk a kétszeres expressziós változást mutató gének csoportjait.

3.2.7. Real time PCR

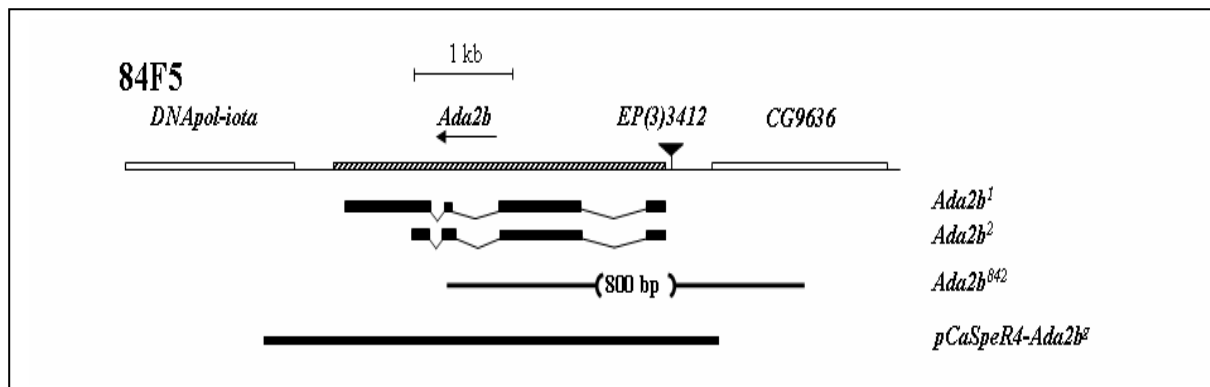
A Real time PCR kísérletekhez az RNS mintákat 10 db L3 stádiumú spirákulum kitűrődésre szinkronizált lárvákból izoláltuk Qiagen RNeasy kittel. A cDNS szintéziséhez 1 µg RNS-t írtunk át TaqMan reverz transzkriptáz reagenssel (ABI). Az egyes gének expressziójának szintjét qRT-PCR segítségével határoztuk meg ABI Prism 7500 típusú gépen. A 18S RNS kontroll és a reaper kísérletekben TaqMan próbát használtunk a reakciókban, míg a többi esetben SybrGreen detekciós festéket alkalmaztunk.

A kísérleteket 30 µl végtérfigatban végeztük, legalább három alkalommal ismételtük, kísérletenként két párhuzamos reakciót alkalmazva.

Az eredmények matematikai értékelését $\Delta\Delta C_t$ formulával végeztük.

4. Kísérleti eredmények

4.1. *Ada2b* deléció mutáns allélok előállítása és a deléciók molekuláris jellemzése



6. ábra

Az *Ada2b* gén kromoszómális környezete. Az ábra mutatja a gén szerkezetét, és a génekről képződő alternatív mRNS formákat. A háromszög jelöli a deléció létrehozására használt EP(3)3412 P-elem helyzetét. Az *Ada2b*⁸⁴² deléció méretét és elhelyezkedését a zárójel mutatja. A pCaSpeR4-*Ada2b*^g (később P(*Ada2b*^g))a menekítő transzgént tartalmazó genomi DNS-t ábrázolja.

Az ADA2b fehérjét tartalmazó komplexek által szabályozott folyamatok megismerése céljából mutációkat próbáltunk létrehozni az *Ada2b* gén kódoló régiójában és a fehérje hiányában kialakuló fenotípusból következtetni a szabályozott útvonalakra. A gén szerkezetének megismeréséhez a csoportunk által publikált (52) és a FLYBASE internetes adatbázisban található adatokat használtuk.

Az *Ada2b* citológiai helyzete a 3. kromoszóma jobb karjának a 84F5 citológiai sávjába tehető. A közvetlen közelében található két másik gén, a *CG9636* azonosítóval jelölt ismeretlen funkciójú gén és a *DNSpol-iota*, amelyről DNS polimeráz aktivitással rendelkező fehérje szintetizálódik. Az *Ada2b* 4 exonból épül fel (6. ábra), 3394 bp-os genomikus szakaszon helyezkedik el, és a génről képződő mRNS-ekről feltételezhetően egy 418 aminosav hosszúságú, 45 kDa méretű és egy 555 aminosavból felépülő, 62 kDa nagyságú fehérje képződhet.

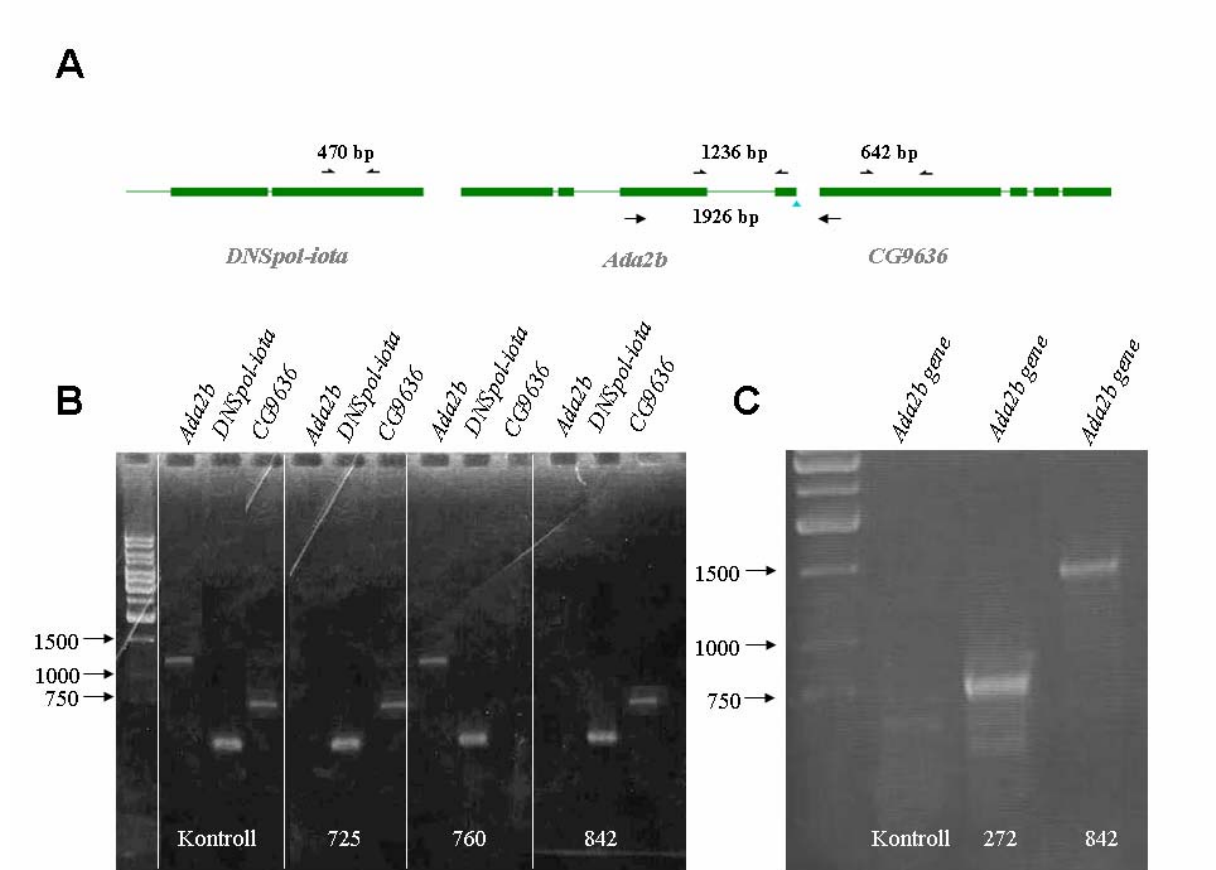
A FLYBASE adatbázisában találtunk egy P-elem beékelődést EP(3)3412 az *Ada2b* promóter régiójában, 87 bp-ra a feltételezett transzkripció startpont előtt. A promóter régióban elhelyezkedő P-elem nem okozza az állatok életképességének csökkenését. A molekuláris vizsgálatok kimutatták, hogy nem gátolja az *Ada2b* gén kifejeződését sem. A P-

elemet transzpozáz forrás *P(Δ2-3)* segítségével mobilizáltuk. A P-elem kiugrására a P-elemben található *miniwhite* szelekciós marker gén által létrehozott narancs szemszín elvesztése alapján szelektáltunk. A narancs szemszín elvesztéséhez többféle esemény is vezethet. Egyrészt a P-elem kivágódhat, másrészt előfordulhat, hogy a P-elemen belül a *miniwhite* génben keletkezik deléció, de a P-inszerció a helyén marad. A P-elem kivágódása lehet tökéletes vagy tökéletlen. A tökéletes kivágódás eredményeként a beépülés helyén visszaáll a vad típusnak megfelelő nukleotid sorrend, míg a tökéletlen kivágódás során általában deléciók keletkeznek a P-elem inszerció helyének környezetében. Az *Ada2b* gén hibája várhatóan letális fenotípust eredményez, ezért a gént eltávolító deléciós alléleket a P-elem vesztés következtében létrejövő letális vonalak között kerestük.

A kísérletben 650 egyedi fehér szemű vonal közül 265 volt letális. Ezeket az *Ada2b* régiót eltávolító deléciós törzzsel (*Df(3R)CA1*) szűrtük. A deléció területére eső 9 db letális vonalat egymással keresztezve, a mutánsainkat komplementációs csoportokba soroltuk. Ily módon két egymást komplementáló csoportot találtunk. Annak eldöntésére, hogy melyik komplementációs csoportba tartozó allélek felel meg az *Ada2b* gént érintő delécióknak, további molekuláris szintű vizsgálatokat végeztünk mindkét csoport tagjaival. Az 1. csoportból a 10, 52, 272, 520, 725, 842 alléleket, míg a 2. csoportból a 152, 711 és 730 alléleket használtuk a további kísérletekben.

A mutáció tényleges méretének kiderítésére molekuláris vizsgálatokat végeztünk. PCR primereket terveztünk az *Ada2b* és a két szomszédos gén kódoló régiójába. A *DNSpol-iota* primerpár 470 bp-os, az *Ada2b* 1236 bp-os, míg a *CG9636* 649 bp-os fragment felszorzozódását teszi lehetővé vad típusú genomikus DNS templáton.

A PCR reakciók során a 10, 272, 520, 725 és 842 allélokban az *Ada2b* gént érintő primerpárral nem kaptunk terméket, míg a *DNSpol-iota* és *CG9636* génekben található primerpár terméke detektálható volt. Ez azt jelenti, hogy az *Ada2b* génben található primerpár egyik, vagy mindkét tagjának megfelelő szekvencia hiányzik a deléciós mutánsban. Az *Ada2b*⁵² allélban sem a *DNSpol-iota*, sem az *Ada2b* primerpár terméke nem volt detektálható, csak a *CG9636* génben található primerek segítségével kaptuk meg a várt méretű terméket. A *Ada2b*¹⁵², *Ada2b*⁷¹¹ és *Ada2b*⁷³⁰ azonosítójú allélek csak a *CG9636* szekvenciájában tartalmaznak deléciót, mivel a *DNSpol-iota* és az *Ada2b* primerpár segítségével kapott termék detektálható, míg a *CG9636* primerpár terméke nem. A 7. ábrán az *Ada2b*⁷²⁵, *Ada2b*⁷³⁰ és *Ada2b*⁸⁴² törzsön végzett PCR kísérletek eredményét mutatom be.



7. ábra

Az *Ada2b* deléciós allélokon végzett PCR analízis eredményei.

Az ábra A része mutatja a felhasznált primerpárok elhelyezkedését és a képződő termékek méretét.

A B ábrarészletben az *Ada2b* deléciós allélokon végzett PCR reakció látható az *Ada2b*, *CG9636* és *DNSpol-iota* primerpárokkal. A 725. és 842. jelzésű mintákban hiányzik az *ADA2b* génre specifikus PCR termék, míg a 760. mintában a *CG9636* PCR termék.

Az ábra C részében az *Ada2b* génben az *Ada2b gene* (1926 bp) primerpárral végzett PCR eredményei láthatóak. A 272. allélban 1000 bp, míg a 842. mutánsban 500 bp az *Ada2b* génben létrejött deléció mérete.

Az *Ada2b* mutánsokon további PCR analízissel megpróbáltuk a deléció kiterjedésének pontos meghatározását. A reakcióban a dADA2bR és dADA2b gene primerpárt használtuk, melyek vad típusú állatok genomikus DNS-én, 1926 bp-os méretű termék létrehozását teszik lehetővé. Ha deléció található a régió belül a két primer között, akkor a két primer közelebb kerül egymáshoz, és az így keletkező, vad típusúnál rövidebb termék már detektálható. Ezen fragment mérete és a primerek eredeti távolságának különbsége adja a ténylegesen eltávolított genomikus szakasz méretét. Az *Ada2b*²⁷²-es allélban 750 bp, míg az *Ada2b*⁸⁴²-es allélban egy 1500 bp méretű fragmentum megjelenését figyeltük meg. Az eredményből arra

következtettünk, hogy az *Ada2b*²⁷² allélban egy megközelítőleg 1000 bp, míg az *Ada2b*⁸⁴²-es allélban egy 500 bp-os deléció keletkezett.

A mutáns allélek egy részében az ADA2b fehérje jelenlétét Western kísérletekben is vizsgáltuk. A kísérlet során *Ada2b*⁵², *Ada2b*¹⁵² és *Ada2b*⁵²⁰ számú mutánsokban tudtunk ADA2b fehérjét detektálni. Bár a PCR kísérletek során az *Ada2b*⁷³⁰ számú allélt a CG9636 gén mutánsának azonosítottuk, ennek ellenére nem sikerült az ADA2b fehérje jelenlétének kimutatása. Ennek az egyik magyarázata lehet, hogy a létrejött deléció már eltávolította az *Ada2b* gén szabályozó régióját.

4.2. Az *Ada2b*⁸⁴² mutánsok letális fázisa

A metamorfózis kezdetén jellegzetes, ekdizon szabályozás alatt álló változások indulnak el a vad típusú szövetekben. A bábozódás időszakában az addig folyamatosan osztódó sejtekből álló imágó korongok elkezdenek kitűrődni. Ez a változás a láb és fej imágó korongokon a legszembeűnőbb. A lárvális szövetek a metamorfózis során hisztolízis következtében elpusztulnak.

A vad típusban a bábozódást követő körülbelül 1 órás időszakot fehér előbáb (prepupa) állapotnak hívjuk (P1). Ebben a fejlődési szakaszban nyeri el a kutikula a jellegzetes barnás színét. Ezután a barna előbáb állapot (P2) következik. A bábozódás után 3 órával egy gáz buborék jelenik meg az állatok testében (P3), ami 12 órával a bábozódás után kiürül az állat posterior végén a kutikula és a fejlődő előbáb epidermisze közötti térbe (P4). Közvetlenül ezután következik be a fej kitűrődése, és a lábak meghosszabbodása (P5). Ez a viszonylag gyors esemény felel meg az előbáb-báb átalakulásnak. Ezután, a báb állapotban már egyértelműen felismerhetők a kifejlett legyekre jellemző testtájak, a fej, a lábak és a szárnyak eléri végső méretüket.

Az *Ada2b* mutánsok fenotípusára jellemző, hogy az állatok fejlődése a báb állapot P5-ös fejlődési állapotában megreked. A lábaik a vad típustól eltérően nem nyúlnak megfelelően hosszúra. A fej kialakulásában is abnormalitás történik, ugyanis a fej és a szem mérete is jóval kisebb a normálisnál. Az esetek 85 %-ban a homozigóta mutánsok ebben az állapotban pusztulnak el. Fiolánként 8-10 báb képes ezen az állapoton tovább jutni és egy úgynevezett farát adult (a báb állapot P12 stádiuma) állapotban pusztulnak el. Ezeken az állatokon is az előzőekben említett abnormalitások figyelhetők meg. Az *Ada2b* mutáció hatására kialakuló fenotípust a 8. ábra mutatja be. Az ADA2b fehérje hiánya a báb állapotot megelőző

stádiumokban nem okoz egyedfejlődési problémákat, mivel nem tapasztaltunk sem embrió, sem lárvális letalitást az elvégzett kísérletekben. Ennek magyarázata lehet, hogy a korábbi állapotokban nincs szükség az ADA2b fehérjére, vagy az anyai hatású fehérjetermék hatása a báb állapotig képes kiküszöbölni a zigótikus géntermék hiányát.

A homozigóta *Ada2b*⁸⁴² mutációt tartalmazó állatokban megfigyelhető továbbá, hogy lemaradnak a fejlődésben *TM6c* balanszert hordozó heterozigóta társaikhoz képest. A P1 állapot eléréséhez szükséges fejlődési idő 1 nappal hosszabb és a P1-P5 közötti 12 órás fejlődési idejük is megnyúlik 1,5-2 órával.

Az *Ada2b* gén szabályozó és kódoló régióját tartalmazó transzgénnel az *Ada2b* hiányos állatok menekíthetőek és a kikelt állatok fertilisek. Így a P5-ös báb állapotban tapasztalható letalítás oka az ADA2b hiánya.



8. ábra

Az *Ada2b*⁸⁴² homozigóta mutáns legyek fenotípusa. A kép bal oldalán egy vad típusú báb látható, míg a jobb oldalon az *Ada2b*⁸⁴² mutáns. A mutáns állatok a báb állapot P5 stádiumában megrekednek a fejlődésben. A képen a farát adult állapotot elérő állatok fenotípusa látható. Megfigyelhető a csökevényes láb, és szárnyak, továbbá a fej kisebb mérete.

4.3. Ősivarsejt transzplantáció

A letális fázis vizsgálata során felvetődött a kérdés, hogy az ADA2 fehérjék csak a báb állapot bizonyos szakaszaiban töltenek be funkciót, vagy a bábozódást megelőző szakaszokban az anyától örökölt géntermék menekíteni képes a zigótikus géntermék hiányát. A kérdés megválaszolására ősivarsejt transzplantációs kísérletet végeztünk, amelyben

csírvonal mozaikokat hoztunk létre olyan nőstények ivarvonalában, amelyek nem képesek ősvarsejt képzésre. A transzplantáció során képződött *Ada2b*⁸⁴² homozigóta kiméra nőstények nem voltak képesek a peteképzésre, amelyből megállapítottuk, hogy az ADA2b fehérjék jelenléte szükséges a pete képződéséhez. Feltételezhetően az anya által bepakolt ADA2b fehérje elegendő mennyiségben van jelen a korai egyedfejlődés szakaszaiban és ez a fehérje mennyiség képes menekíteni az állatokat a báb állapot elejéig. Eredményeinket a 2. táblázat mutatja.

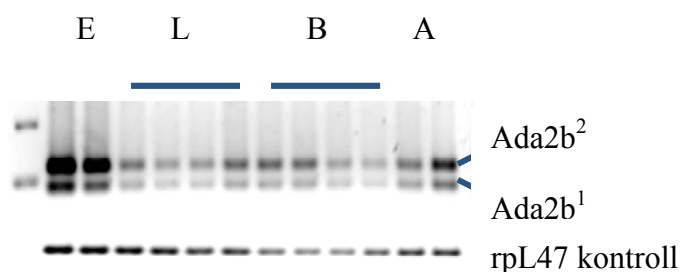
genotípus	kimérák száma
<i>Ada2b/CxD</i>	5
<i>Ada2b/TM6</i>	8
<i>CxD/TM6</i>	3
<i>Ada2b/Ada2b</i>	0

2. táblázat

Az ősvarsejt transzplantációból kapott genotípus kategóriák és a kikelt kimérák száma.

4.4. Az ADA2b (ADA2b¹, ADA2b²) izoformáinak azonosítása

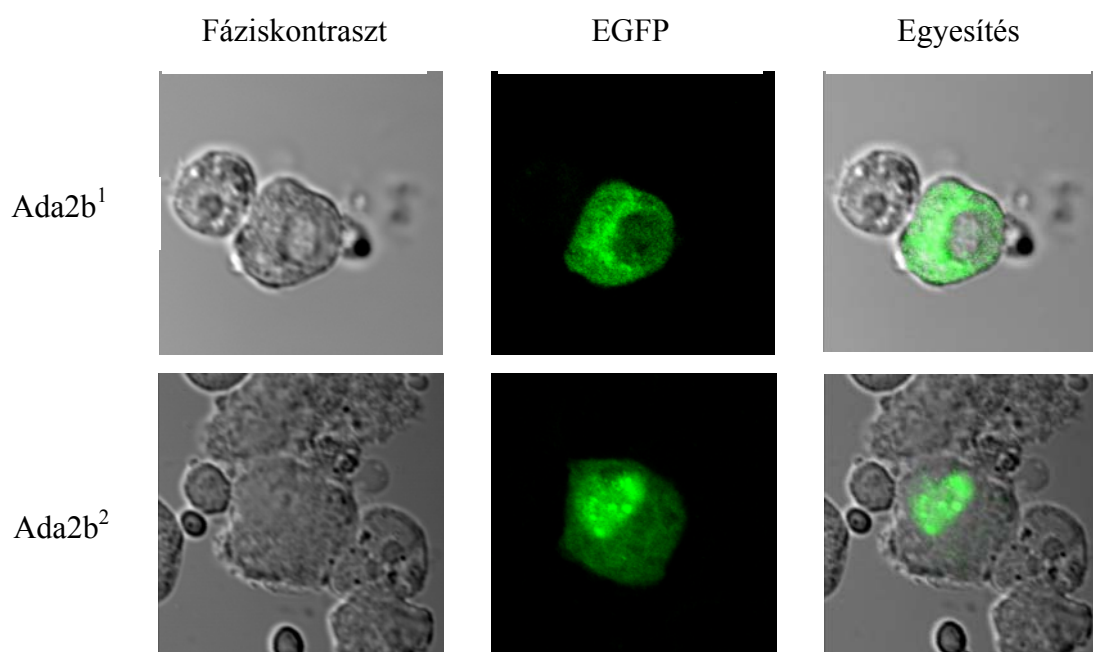
A FLYBASE adatbázisban talált illetve saját adataink alapján azt feltételeztük, hogy az *Ada2b* génről alternatív splicing során két mRNS képződik (6. ábra). A két képződő mRNS forma 5' végi régiója teljesen megegyezik. Eltéréseket a 3. és 4. exon méretében tapasztalhatunk, a hosszabb 3. exont tartalmazza a rövidebb mRNS. A korábbi kísérleteinkben már igazoltuk a rövidebb mRNS képződését és a 3. exon környékére tervezett primerrel szeretnénk volna azonosítani a hosszabb mRNS forma jelenlétét is. Az RT-PCR reakció során a két fajta mRNS képződését a *Drosophila* minden egyes fejlődési állapotában kimutattuk (9. ábra).



9. ábra

Az *Ada2b* génről termelődő két mRNS kimutatása. Mindkét mRNS variáns jelen van az E-embriónális, L-lárvális, B-báb, és A-kifejlett állatoknak megfelelő egyedfejlődési stádiumban. A hosszabb harmadik exont az ADA2b² (rövidebb izoforma) tartalmazza, ezért nagyobb a termék

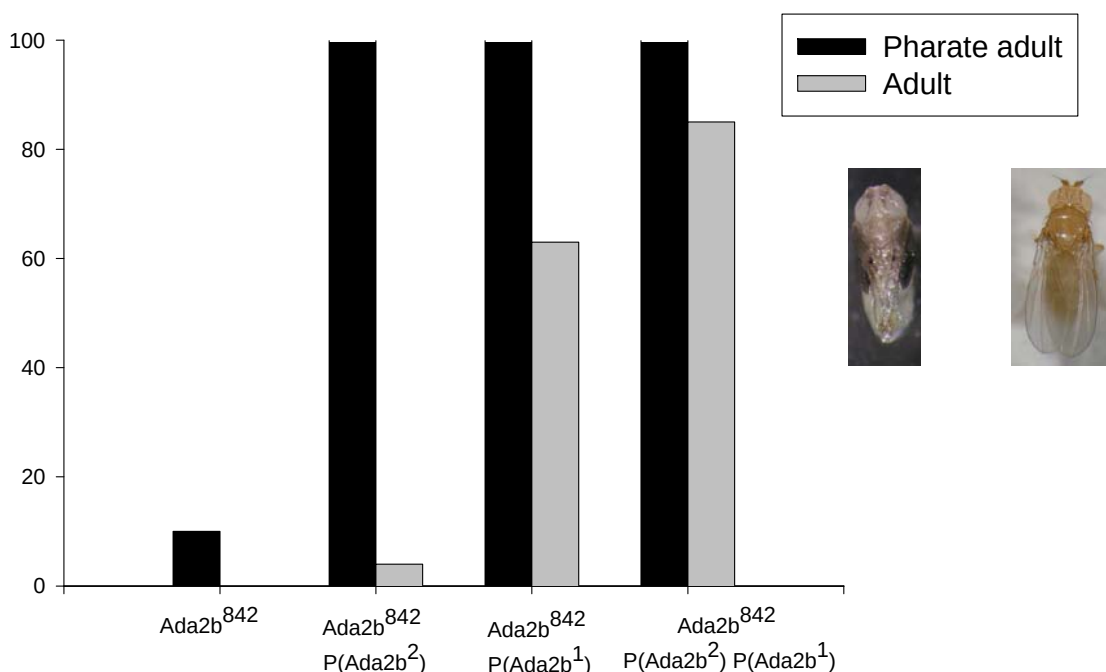
A két mRNS variáns jelenléte az összes fejlődési állapotban feltételezi, hogy róluk fehérjék íródnak át. Ezt a feltételezést támasztja alá, hogy Western analízisben az ADA2b fehérje N-terminális régiója ellen termeltetett ellenanyag két fehérjét ismer fel. A kisebb méretű 44 kDa, míg a nagyobb molekula tömege 62 kDa. A két fehérje szövetekben és sejten belüli funkcióinak vizsgálatára elkészítettük a két fehérje zöld fluoreszcens fehérjével jelölt változatait. A létrehozott konstrukciók működésének vizsgálatát *Drosophila* S2 szövetkultúrában vizsgáltuk. A transzfekciót követően a fehérjék termelődését és sejten belüli elhelyezkedését konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk (10. ábra). Az ADA2b²-EGFP fehérje esetében a sejtnek megfelelő régiókban detektáltunk fluoreszcens jelet. Ezzel szemben az ADA2b¹-EGFP fehérje citoplazmatikus lokalizációt mutatott. Bár csak kevés fluoreszcens sejtet találtunk – mivel a konstrukciók elég nagyméretűek, így a transzfekció alacsony hatékonysággal működött – de a kísérlet többszöri ismétlése során végig ugyanezt az eredményt kaptuk. A eltérő sejten belüli elhelyezkedése előrevetíti azt a feltevést, hogy a két ADA2b fehérje izoforma eltérő folyamatok szabályozásában játszik szerepet.



10. ábra
Az EGFP jelölt ADA2b fehérjék elhelyezkedése Schneider sejten belül. Az ADA2b¹ főként citoplazmatikus, míg az ADA2b² sejtmagi lokalizációt mutat.

Az *Ada2b¹-EGFP* és *Ada2b²-EGFP* fúziós géneket tartalmazó *Drosophila* transzformálásra alkalmas pPUASP P-elem vektorokat p π Δ 2-3 helper plazmiddal együtt *Drosophila* embrióba injektáltuk, így a vizsgálni kívánt ADA2b fehérjéket konstitutívan

expresszáló transzgenikus *Drosophila* törzseket hoztunk létre. Az injektálást az *Ada2b* kódoló régióját eltávolító (*Ada2b*⁸⁴²) mutáns embriókon végeztük, mivel ezekben az állatokban az endogén ADA2b fehérjék nem találhatóak meg. Így az *Ada2b*¹ vagy *Ada2b*² transzgének visszajuttatásával vizsgálhatjuk az általuk szabályozott folyamatokat.



11. ábra

Az *Ada2b*⁸⁴² mutánsok 10%-a éri el a farát adult állapotot(1. oszlop). Az *ADA2b*¹ hatására a bábok elérték a farát adult állapotot és az állatok 62 %-a kikelt (2-3 oszlop). Az *ADA2b*² szintén menekítette a mutációt farát adult állapotig, de az állatoknak csak 2 százaléka volt képes kikelni(4-5. oszlop). Az *ADA2b*¹ és *ADA2b*² transzgént egyszerre tartalmazó állatok közel 100 százaléka kikelt (6-7. oszlop).

Az *ADA2b*¹-EGFP és *ADA2b*²-EGFP konstrukciókat tartalmazó állatok segítségével megállapítottuk, hogy mindkét transzgén képes volt az *Ada2b* hiányos állatok menekítésére, de eltérő hatékonysággal. Az *ADA2b*¹ esetében a transzgént tartalmazó valamennyi báb elérte a farát adult állapotot és az állatok 62 %-a kikelt. Az életben maradt állatok fertilisek, stabil vonalként fenntarthatóak. Az *ADA2b*² rövid izoforma szintén nagy hatékonysággal menekítette a homozigóta *Ada2b*⁸⁴² mutáns bábokat farát adult állapotig, de csak 2 százaléku volt képes kikelni. A kikelt állatok mind nőstények voltak és 2 nap után elpusztultak. Továbbá a kikelt állatok sterilek, petefészkeik csökevényesek és a petekamrák megrekednek a peteérés 9. stádiumában. Az *Ada2b*¹ és *Ada2b*² transzgént egyszerre tartalmazó *Ada2b*⁸⁴² mutáns állatok közel 100 százaléka kikel, amely alapján feltételezhető, hogy a két fehérje egyidejű

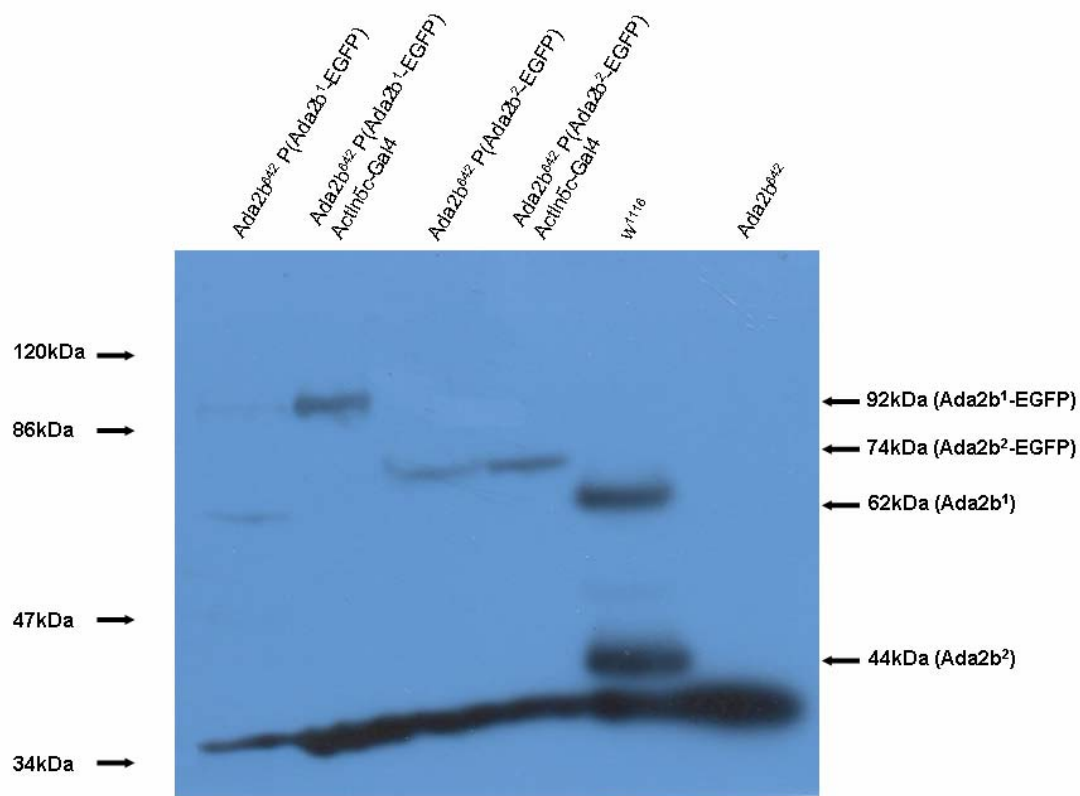
jelenléte szükséges a normális egyedfejlődés lejátszódásához. Továbbá a két fehérje eltérő menekítésének lehetséges oka, hogy az ADA2b¹ és ADA2b² eltérő folyamatok szabályozásában vesznek részt, amelyek csak részben, vagy egyáltalán nem fednek át egymással. Eredményeinket a 11. ábra szemlélteti.

A létrehozott transzgenikus állatokban Western analízissel is szeretnénk volna igazolni a termelődő fúziós fehérjék jelenlétét. Ezért az ADA2b¹-EGFP és ADA2b²-EGFP fehérjéket termelő törzsek lárváiból fehérje preparátumot készítettünk, melyből 2 lárvának megfelelő mennyiséget használtunk a Western kísérlethez. A Western analízist ADA2b fehérje ellen termeltetett poliklonális ellenanyag felhasználásával végeztük el. A kísérlet során sikerült detektálni a várt mérettartományban a fúziós fehérjéket.

A 12. ábrán láthatók a különböző transzgenikus törzsekben az ADA2b fehérje elleni poliklonális ellenanyaggal detektált fehérjék. A vad típusú állatok tartalmazzák mindkét izoformának megfelelő ADA2b fehérjét (44 kDa és 62 kDa), míg az *Ada2b*⁸⁴² deléciót tartalmazó állatokban ezek a fehérje termékek hiányoznak. Az *Ada2b*¹-EGFP transzgént hordozó törzsben alacsony mennyiségben jelen van az ADA2b¹-EGFP fúziós fehérje, amelynek a mérete hozzávetőleg 92 kDa (ADA2b¹ fehérje 62 kDa + EGFP fehérje 30 kDa). Ebben a törzsben a 62 kDa-os mérettartományban is detektáltunk egy fehérjét, amely feltételezhetően az EGFP nélküli ADA2b¹ fehérjének felelhet meg. Az ADA2b¹-EGFP transzgént Aktin5c-GAL4 driver segítségével túltermelő törzsben a várt eredménynek megfelelően több ADA2b¹-EGFP fúziós protein van jelen. Továbbá az EGFP nélküli ADA2b¹ fehérje nem detektálható. Elméletileg az *Ada2b*¹-EGFP transzgénről nem csak az ADA2b¹-EGFP tud képződni, hanem alternatív mRNS érés során az EGFP tag nélküli ADA2b² fehérje is, de a fehérjének megfelelő 44 kDa-os mérettartományban nem detektáltunk fehérjét. Feltételezésünk szerint az *Ada2b*² mRNS nem tartalmazza a poli-adenilációs szignál szekvenciát, így a képződő RNS instabil és gyorsan lebomlik.

Az *Ada2b*²-EGFP transzgént hordozó törzsben detektálható az ADA2b²-EGFP jelenléte a 74 kDa-os mérettartományban (ADA2b² fehérje 44 kDa + EGFP fehérje 30 kDa). Az ADA2b²-EGFP fehérjét túltermelő törzsekben nem detektáltunk az ADA2b¹ fehérjének megfelelő jelet.

Az összes mintában detektáltunk egy 34 kDa méretű fehérjét, ami valószínűleg az ellenanyag által felismert, de nem specifikus fehérje jelenlétének az eredménye.



12. ábra

Az EGFP jelölt ADA2b fehérjék termelődése a létrehozott transzgenikus *Drosophila* törzsekben. Az *Ada2b*⁸⁴² deléciója eltávolítja mindkét ADA2b fehérjét (44 kDa és 62 kDa). Az ADA2b¹-EGFP az 1. sávban látható, míg a 2. sávban túltermelés után (92 kDa). Az ADA2b² a 3. sávban és túltermelés után a 4. sávban látható (74 kDa). Az EGFP fehérje mérete 30 kDa.

4.5. Az ADA2b¹, ADA2b² fehérjék szerepe a H3 K9 és K14 acetilációjában

Az ADA2b fehérjék acetiltranszferáz aktivitással rendelkező komplexek tagjai. A komplexekről már régóta ismert, hogy specifikusan képesek acetilálni a hisztonok N-terminális oldalláncain található lizineket. Élesztőből származó adatok utaltak arra, hogy a GCN5 tartalmú komplexek a hiszton 3-as szubsztrátokat acetilálják nagy affinitással a 9. és 14. lizin aminosavnál.

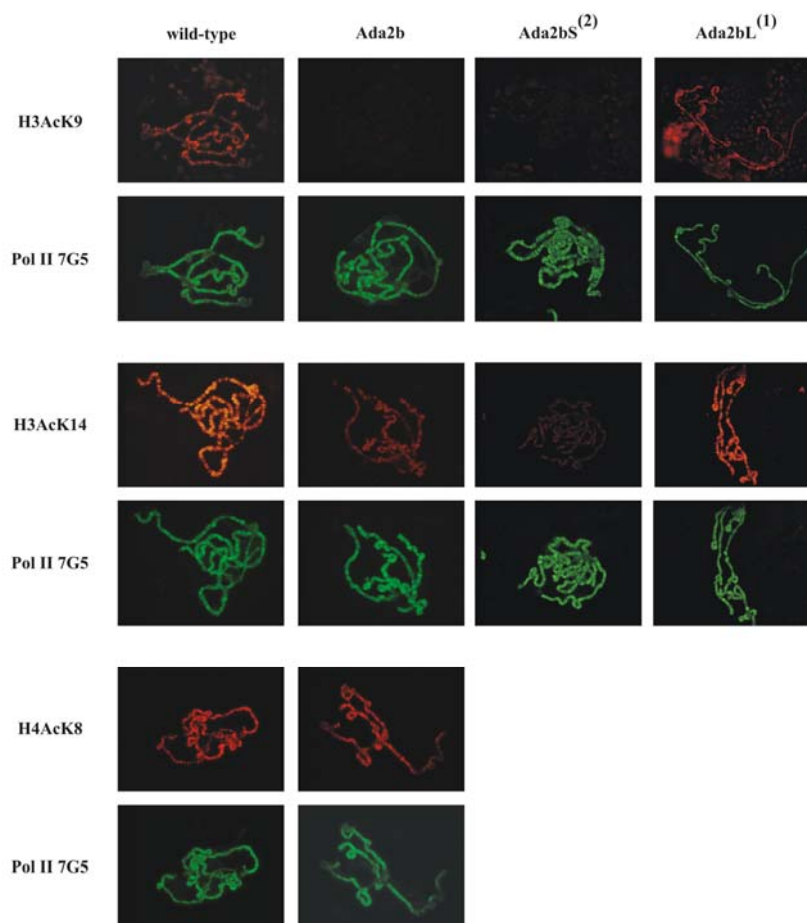
A *Drosophila* ADA2b tartalmú komplexekről eddig nem azonosították mely hiszton oldallánc lizinjeit képes acetilálni. Ezért H3 és H4 specifikus helyein acetilált hisztonokat felismerő ellenanyagokkal nyálmirigy óriás kromoszómán vizsgáltuk a fehérjék hiányában kialakult acetilációs változásokat. Az *Ada2b*⁸⁴² mutáció hatására a hiszton 3 9. és 14.

lizinjének acetilációjában figyelhető meg erőteljes csökkenés, míg a H4 hisztonok acetiláltsági szintje nem változik. Számos esetben bebizonyosodott, hogy a 9. és 14. lizin acetilációja a transzkripcionálisan aktív gének promóter régióiban figyelhető meg. Így feltételezhetően az ADA2b hiányában kialakuló acetilációs csökkenés számos gén expresszió csökkenését okozhatja. A specifikus gének kifejeződésének vizsgálatára real time PCR kísérleteket végeztünk, amely eredményeinek ismertetésére a 4.7 résztől kerül sor.

Mint az előbbiekben láttuk sikerült azonosítanunk ADA2b tartalmú komplexek acetilációs célpontjait. A következő kérdésünk az volt, hogy az ADA2b¹ és ADA2b² rendelkezik-e elkülönült funkcióval az acetiláció szabályozásában. Az ADA2b két izoformájának vizsgálata során a citoplazmás lokalizációt mutató ADA2b¹ hiányában a H3 9. és 14. lizinjének acetilációja az ADA2b⁸⁴² mutánsban tapasztalt szintű csökkenést mutat. A sejtmagi lokalizációt mutató ADA2b² hiányában viszont nem történik változás az acetilációban egyik általunk vizsgált ellenanyaggal sem.

Számos további hiszton 3 és hiszton 4 N-terminális oldalláncán található lizin acetilációját is vizsgáltuk, de nem sikerült változást észlelnünk az acetilációs szintjükben. Így az ADA2b tartalmú komplexek célpontjai a H3 9. és 14. lizin. Az ADA2b két izoformája közül a citoplazmában található ADA2b¹ az, amely a H3 K9 és H3 K14 általános acetilációjáért felelős (13. ábra).

A polimeráz II és a H3 K9 és K14 acetilált formáját felismerő ellenanyaggal kapott festődési mintázatokat összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy a polimeráz és az acetilációs festődés eltérő helyeken figyelhető meg a kromoszómákon. A polimeráz elsődlegesen a lazább kromatin szerkezettel rendelkező interband régiókban helyezkedett el, ami bizonyítéka, hogy itt folyik erőteljesebb transzkripció. Ugyanez az erős polimeráz kötődés volt megfigyelhető a kromoszómán az ekdizon hatására kialakuló puffok környékén is, amelyekről tudott, hogy ezek transzkripcionálisan aktívak.



13. ábra

Az *Ada2b*⁸⁴² mutáció, ADA2b¹ és Ada2b² hatása a hisztonok lizin oldalláncainak acetilációjára. Az *Ada2b*⁸⁴² mutáció hatására a H3 9. és 14. lizinjének acetilációs szintje lecsökken (2. oszlop). Ezért az acetiláció csökkenésért az ADA2b¹ felelős (4. oszlop), mivel P(Ada2b¹) transzgénnel menekített *Ada2b*⁸⁴² állatokban az acetilációs szint csökkenés visszaáll a kontroll állatoknak megfelelő szintre. A P(Ada2b²) jelenléte nem állítja vissza a H3 9. és 14. lizin acetilációját (3. oszlop).

Az acetiláció ezzel ellentétben főként a citológiai band régiókban azonosítottuk. Ezek a kromoszóma régiók tömörebbek és jóval több DNS-t és hiszton fehérjét tartalmaznak, így az ellenanyagunk is gyakrabban kötődött e régiókba. Feltételezhetően az általunk a band régiókban azonosított erőteljes acetilációs jel a kromoszómának általános acetilációs szintje és a transzkripció szabályozásában nem vesz részt. A hisztonok általános acetilációja viszont a citoplazmában történik röviddel a szintézisük után, így eredményeink előrevetíthetők, hogy a citoplazmában található ADA2b¹ tartalmú komplexek végzik a hisztonok általános acetilációját. Az acetilált hisztonok viszont a kromatin szerkezetbe épülés után részlegesen megőrzik az acetilációs szintjüket, és ezt látjuk az általunk használt ellenanyagokkal.

4.6. Az ADA2b fehérjék sejtciklus szabályozásában betöltött szerepe

4.6.1. Sejtautonóm funkció vizsgálata

A GCN5 tartalmú komplexek sejtciklus szabályozásában betöltött szerepe az utóbbi időszak intenzíven kutatott témája. Élesztőben a szabályozó funkciójukat a G1-S átmenetben azonosították, de a regulációban betöltött szerepük még nem tisztázott. A GCN5 magasabb rendű eukarióták sejtciklusában betöltött funkciója nem ismeretes. A *Drosophila*-ban – mint magasabb rendű eukarióta modellszervezetben – egy adott mutáció sejtautonóm funkciójának vizsgálatára alkalmas rendszer a testi sejt mozaikok előállítása röntgen besugárzással. Röntgen sugárzás hatására kettős szálú kromoszóma törések jönnek létre és mitotikus rekombináció keletkezhet. Így létrejöhetnek olyan mozaik foltok, amelyek homozigóta formában tartalmazzák az *Ada2b*⁸⁴² mutációnkat.

Az *Ada2b*⁸⁴²/*mvhKi*^S heterozigóta lárvákban generált mozaikfoltok analízise kimutatta, hogy a keletkező *Ada2b*⁸⁴² mutáns mozaikok megjelenésének gyakorisága megegyezik a kontroll állatokon található mozaikfoltok gyakoriságával. Elterést a diploid szöveteket létrehozó imaginális diszkuszokból kialakuló testtájakon található mozaikfoltok méretében tapasztaltunk. Az *Ada2b*⁸⁴² mutáció jelenlétében létrejött homozigóta foltok mérete jelentősen kisebb volt a kontroll kísérletben használt állatokéhoz képest (3. táblázat), amely bizonyítja az ADA2b fehérje sejtciklus szabályozásában betöltött szerepét.

A kapott eredmények alapján állíthatjuk, hogy az ADA2b fehérje sejtautonóm módon szerepet játszik a sejtsztódásban. A homozigóta mutáns mozaik foltok méretének csökkenése arra utal, hogy ezekben a sejtekben egy teljes sejtciklus több időt igényel a kontroll sejtekhez képest. Másik fontos megfigyelés, hogy a csökkent méretű homozigóta foltokat csak az imágókorongokból kialakuló testtájakon találunk, amely bizonyítja, hogy a mitózishoz szükséges az ADA2b fehérjék jelenléte.

	Légy	Imaginális diszkuszkókból kialakuló testtájak												Abdomen		
		Fej			notum			lábak			szárnyél					
		Klón	méret	nagy	klón	méret	nagy	klón	méret	nagy	klón	méret	nagy	klón	méret	nagy
Kontroll	90	9	2.7±1	4	13	5.2±3.8	16	21	8.4±8.4	45	8	24.8±14	46	79	2.8±2	8
Ada2b	48	3	1±0	1	10	1.4±0.6	3	10	2.2±1.9	6	5	2.2±0.8	3	44	2.6±2	7
χ^2 teszt		Nincs eltérés			Nincs eltérés			Nincs eltérés			Nincs eltérés			Nincs eltérés		
T teszt		>95%			>99%			>95%			>99%			Nincs eltérés		

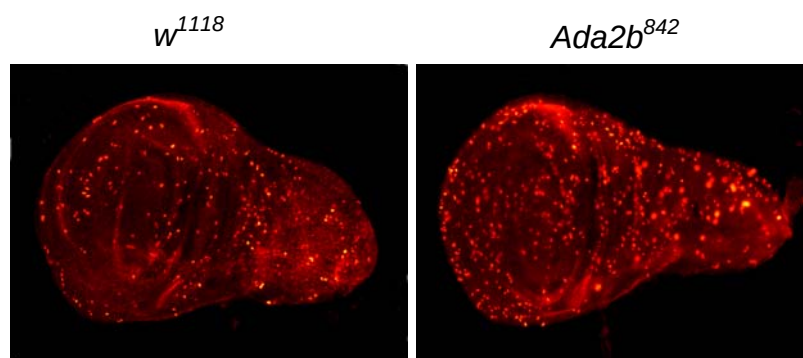
3. táblázat:

A keletkező testi sejt mozaikok adatai testtájakra bontva. A χ^2 teszt megmutatja, hogy a keletkező mozaikfoltok gyakoriságában nincs eltérés a kontroll állatokon keletkező mozaikfoltok gyakoriságához képest. A t próba a keletkező mutáns mozaikfoltok méretét hasonlítja össze a kontroll állatokon keletkezett mozaikfoltok méretével, melyben az *Ada2b*⁸⁴² mutációja esetén méretcsökkenés tapasztalható.

4.6.2. Az *Ada2b*⁸²⁴ mutáció hatása a mitózisra

A előző fejezetben láttuk, hogy az *Ada2b* hiánya mitotikus problémákat okoz az imágó korongokból kialakuló testtájakon. Feltételezésünk szerint a mozaikfoltok méret csökkenésének oka, hogy az ADA2b fehérjék hiányában a sejteknek több idő kell egy mitotikus ciklus lejátszódásához.

Első lépésben vizsgáltuk az *Ada2b*⁸⁴² mutánsok imágó korongjaiban a sejtciklus M fázisában található sejtek számát. A homozigóta mutációt hordozó állatok imágókorongjait hiszton 3 szerin 10-es foszforilációt felismerő ellenanyaggal festettük, mivel a sejtciklus M fázisában lévő sejtekben a kromoszóma kondenzált állapotban található, ami a H3 10. szerinjének foszforilációja segítségével alakul ki.



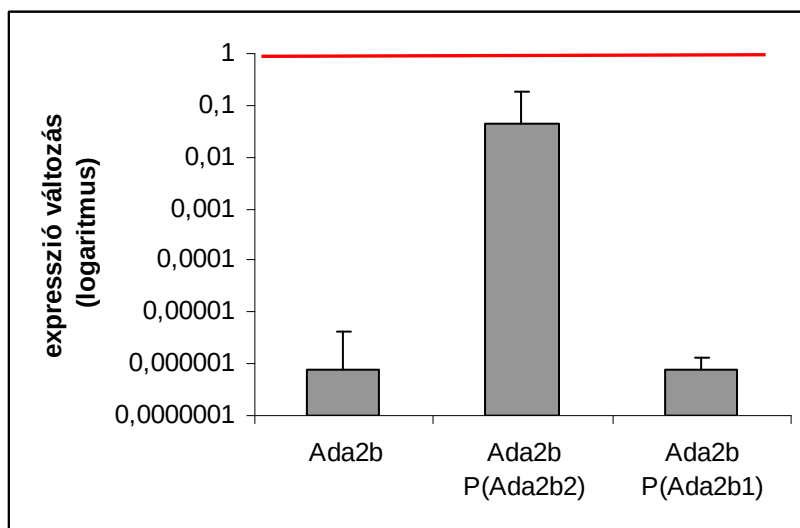
14. ábra

A mitózisban M fázisában lévő sejtek száma magasabb az *Ada2b*⁸⁴² homozigóta mutációt hordozó állatokban (jobb oldali kép), mint a vad típusú állatokban tapasztalt imágó korongokban (bal oldali kép).

Az *Ada2b*⁸⁴² mutáció hatására az állatok diszkuszaiban megemelkedik a mitózis M fázisában lévő sejtek száma a kontroll állatokban tapasztalt szinthez képest. Ennek egyik oka lehet, hogy a sejtekben több idő szükséges egy teljes sejtciklus lejátszódásához. Így egy sejt több időt tölt a sejtciklus egyes lépéseiben és ezért tapasztalható a M fázisú sejtek számának megemelkedése (14. ábra).

A sejtciklus M fázisában történik a sziszter kromatidák szétválása. A kromatidák szétválásához szükséges a mitotikus orsó és a mikrotubulus fonalakból kialakuló húzófonalak összeszerelődése. A mikrotubulusokon történő mozgás egyik azonosított faktora a *Map205* génről képződő fehérje. Bár a fehérje hiánya nem okozza a sejtek halálát, hiányában a kialakuló mikrotubulus fonal instabillá válik.

A *Map205* gént *Ada2b*⁸⁴² mutánsokon végzett microarray kísérletben azonosítottuk (az eredményeket a 4.9 fejezetben tárgyalom) és megállapítottuk, hogy expressziója csökken az ADA2b hiányában. A kapott eredmények megerősítésére Real Time PCR segítségével megvizsgáltuk ADA2b fehérjék hiányában a *Map205* gén kifejeződését. Az *Ada2b*⁸⁴² mutáció jelenlétében a *Map205* expresszója jóval alacsonyabb, mint a kontroll állatokban és az ADA2b² fehérje hiánya is hasonló változást eredményez. Ha visszajuttatjuk az ADA2b² fehérjét, de az ADA2b¹ fehérje nincs jelen, akkor a *Map205* kifejeződése a kontroll állatokban tapasztalt szint közelébe áll vissza.



15. ábra

A mitotikus orsó kialakításában szerepet játszó *Map205* gén expressziója az *Ada2b*⁸⁴² homozigóta mutánsokban erőteljes csökkenést mutat, de ez a csökkenés az ADA2b² fehérjét tartalmazó P(Ada2b²) transzgénnel visszaállítható a vad típusúhoz közeli szintre. A P(Ada2b¹) transzgén nem befolyásolja a *Map205* kifejeződését.

Ez az eredmény bizonyítja, hogy az ADA2b² fehérje felelős a *Map205* gén specifikus aktivációjáért, míg az általános acetilációt végző ADA2b¹ nem vesz részt a gén szabályozásában (15. ábra). Így bizonyítható, hogy az ADA2b fehérjék nem csak az általános acetilációs folyamatok szabályozásáért felelősek, hanem az egyes gének transzkripciójának aktiválásában is szükséges a jelenlétük.

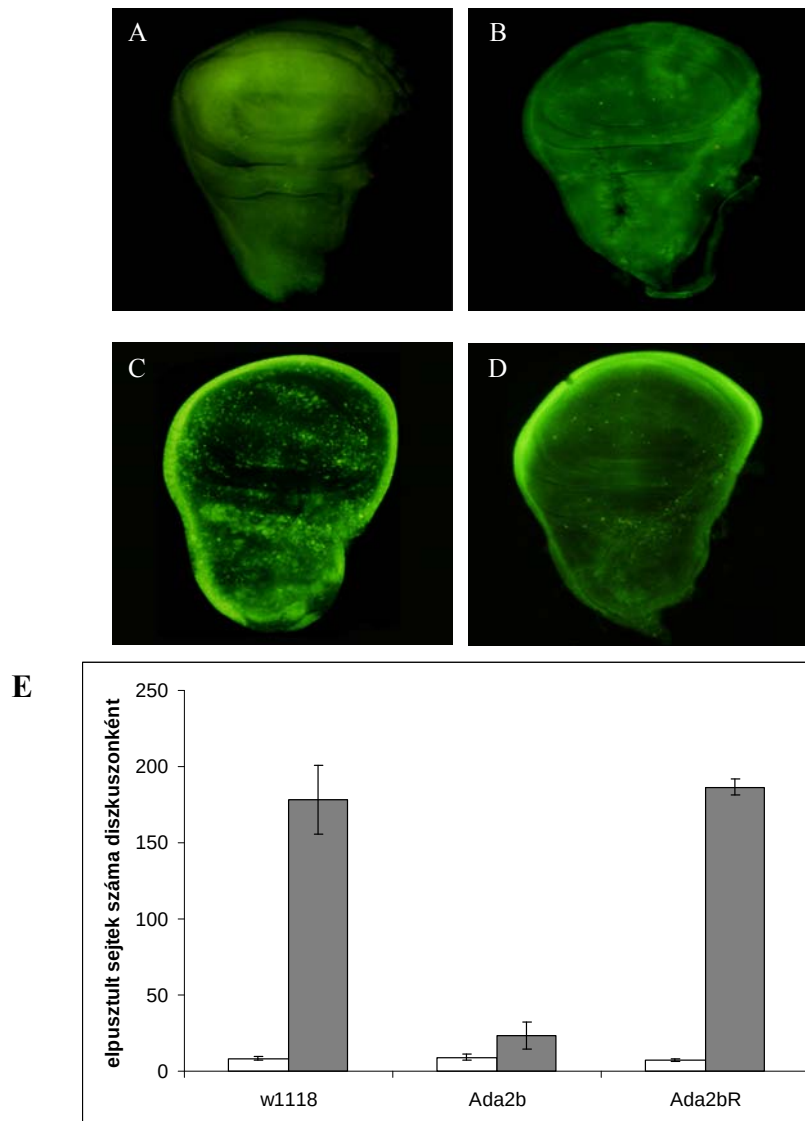
4.7. Az ADA2b fehérjék szerepe a Dmp53 által szabályozott apoptotikus útvonalban

Számos élesztő rendszerekből származó adat és más laborokból publikált, főként biokémiai adat utalt arra, hogy a p53 segítségével végbemenő programozott sejthalál szabályozásában szerepük van az ADA2b fehérjéket tartalmazó komplexeknek is. Az általunk létrehozott *Ada2b*⁸⁴² mutációkat hordozó állatok alkalmasak voltak arra, hogy azonosítsuk az ADA2b fehérjéket tartalmazó komplexek szerepét *in vivo* a p53 által szabályozott útvonalakban.

4.7.1. Röntgen sugárzás indukálta apoptózis

A p53 által aktiválódó apoptotikus útvonal vizsgálatára a meglévő mutánsainkat nagy dózisu röntgen sugárzásnak tettük ki és vizsgáltuk az apoptózisban elpusztult sejtek számát. Ismert ugyanis, hogy 40 Gy sugárzás kettős szálú DNS töréseket okoz, amelyet a sejtek a károsodás mértékéhez viszonyítva csak kis részben képesek kijavítani. Azok a sejtek, amelyekben a károsodás mértéke túllép egy szintet, p53 által aktivált apoptózisban pusztulnak el. Az elpusztult sejtek láthatóvá tehetők akridine orange festékkel. A vizsgálatunkhoz az *Ada2b*⁸⁴² homozigóta mutáns állatok imágó korongjait használtuk, mivel ezen szövet sejtjei diploidok, így könnyebben detektálható a kettős szálú DNS törés, mint a politén szövetekben. Alap esetben csak nagyon gyenge apoptózis figyelhető meg az imágó korongokban, átlagosan diszkuszonként 10 elpusztult sejtet találtunk. Ezzel megegyező mértékű volt az elpusztult sejtek száma az *Ada2b*⁸⁴² mutánsokban is. Röntgen sugárzás hatására a kontroll állatainkban a várákosodásnak megfelelően az apoptózis által elpusztult sejtek száma megemelkedett, átlagosan 200 elpusztult sejtet találtunk egy imágó korongban. Az ADA2b fehérjék hiányában viszont az elpusztult sejtek száma alig emelkedett, mindösszesen háromszoros növekedést tapasztaltunk a kontrollban megfigyelt aktivációhoz képest. A P(Ada2b) menekítő transzgen

bejuttatása az *Ada2b*⁸⁴² mutáns állatokba az apoptózis aktivációjának visszaállítását eredményezi a vad típusú szintre. Ezekben az állatokban az elpusztult sejtek száma a kontroll állatokban is tapasztalt 200 sejt imágókorongonként. A kísérletek 3 alkalommal történő megismétlése és kategóriánként 100 diszkusz átvizsgálása után megállapítható, hogy az ADA2b tartalmú komplexek jelenléte feltétlenül szükséges a DNS károsodás útján bekövetkező apoptózis aktivációjához. Feltételezésünk szerint az ADA2b fehérjék hiányában kisebb hatásfokkal történik a p53 által szabályozott apoptózis aktivációja, amely a p53 és az ADA2b tartalmú komplexek kapcsolatára utal (16. ábra).

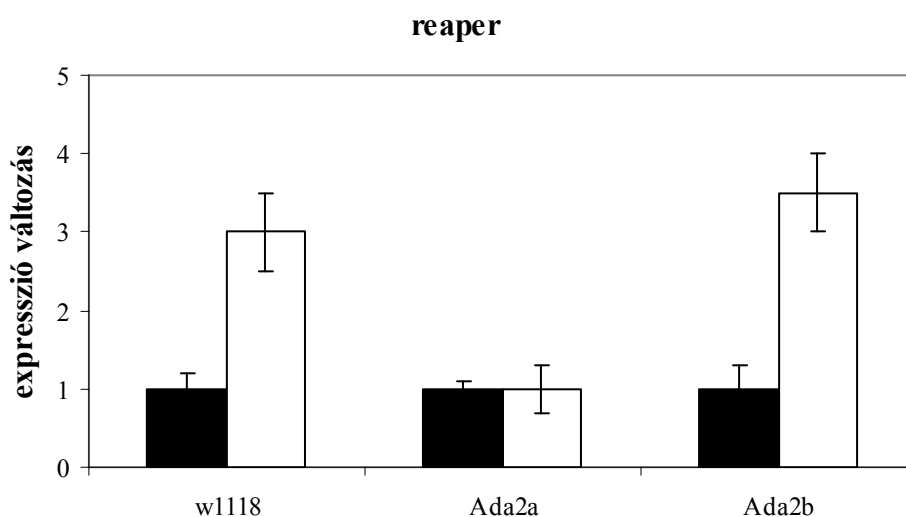


16. ábra

Az apoptózisban elpusztult sejtek száma alap esetben egyforma a vad típusú (A) és *Ada2b*⁸⁴² mutáns (B) állatok imágó korongjaiban. Nagy dózisu (40 Gy) röntgen sugárzás hatására a vad típusú állatokban 20-szorosára növekszik az apoptózis (C). Az *Ada2b*⁸⁴² mutáció hatására az apoptózis aktiváció gyenge, a sejtek csak kis számban pusztulnak el a röntgen sugárzás után (D). Az adatokat összegyűjtve az E panel mutatja. (Ada2bR az *Ada2b*⁸⁴² mutáció menekítve P(*Ada2b*⁸) a teljes *Ada2b* genom régiót tartalmazó transzgénnel)

A p53 transzkripciós faktor számos más apoptózisban azonosított gén transzkripciójában vesz részt. Ilyen gén a *reaper*, amely terméke kaszpáz funkcióval rendelkezik. A felfebb említett besugarazott állatokban real time PCR segítségével mértük a reaper aktiválódását, és megállapítottuk, hogy a *reaper* aktiváció megtörténik az ADA2b fehérjék hiányában is. Az *Ada2a*¹⁸⁹-es mutánsokban a reaper gén röntgen sugárzás hatására nem aktiválódik, amely eredmény az ADA2a és ADA2b fehérjék elkülönült szabályozó feladatát mutatja.

Ez az eredmény bizonyítja, hogy bár az ADA2b szükséges a sejthalál elindításához, de ezt nem a reaper fehérjét tartalmazó útvonalon keresztül végzi. A p53 által aktivált sejthalál két, az előbb említett útvonaltól eltérő aktivációját azonosították. Bár mindezekig az útvonal tagjait nem azonosították egyértelműen, de feltételezhető, hogy az ADA2b tartalmú komplexek a két további útvonal valamelyikének aktiválásában vesznek részt (17. ábra).



17. ábra

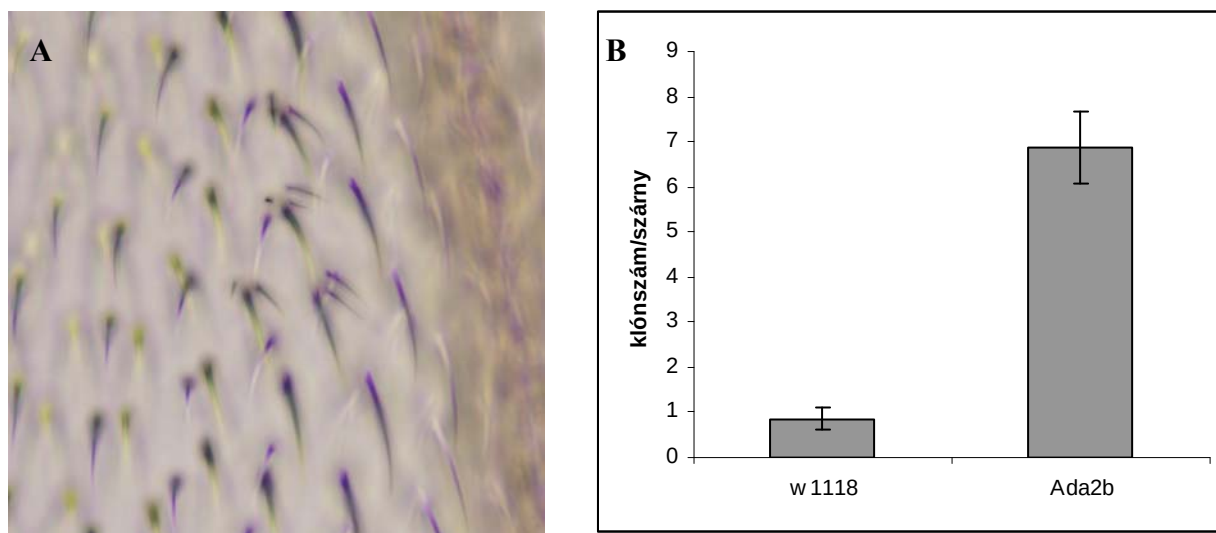
A röntgen sugárzás hatására a reaper aktivációja figyelhető meg a vad típusú (w1118) és *Ada2b*⁸⁴² (*Ada2b*) mutáns állatokban, míg az *Ada2a*¹⁸⁹ (*Ada2a*) mutáció hatására ez az aktiváció elmarad.

4.7.2. A genom stabilitásának változása az ADA2b fehérjék hiányában

A p53 funkciója nem csak a sejtek programozott elpusztulásának szabályozása, hanem a genomban történt hibák felismerése és a javító mechanizmusok aktiválása. A genomban történő hibák felhalmozódásának mérésére alkalmaztuk a LOH (Loss Of Heterozygosity assay) rendszert. A kísérlet során a *Drosophila* szárnyon az *mwh* géntermék hiányában

kialakuló több szőrszálal eredményező fenotípus megjelenését vizsgáltuk. Ehhez első lépésben *mwh*^{-/+} heterozigóta állatokat hoztunk létre, amelyben a kísérlet érzékenyítése céljából a *p53* gén egy kópiája szintén eltávolításra került. Ha az *mwh* gén fennmaradó vad típusú kópiája DNS károsodás következtében inaktiválódott, akkor láthatóvá vált az *mwh*⁻ fenotípus (18A ábra).

A genomot érő DNS károsodások méréséhez L3 lárvá stádiumú állatokat 2,5 Gy dózisú röntgen sugárzással kezeltük és kerestük a kikelő állatok szárnyszőrén létrejött fenotipikus változásokat. A kísérletben megfigyeltük, hogy az *Ada2b*⁸⁴² heterozigóta állatok szárnyain nagyobb gyakorisággal jelent meg a keresett több szőrszálal fenotípusa (18B. ábra). Ez arra utal, hogy az ADA2b fehérjék közvetett, vagy közvetlen úton képesek más faktorokat segíteni a DNS károsodás felismerésében, vagy a DNS hibajavításában szerepet játszó más faktorokat aktiválni.



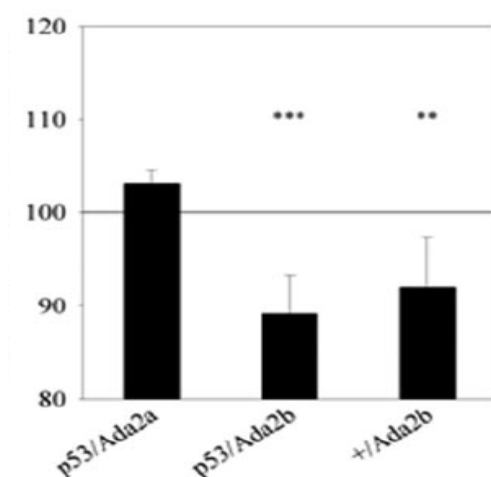
18. ábra
Az A kép mutatja a kialakuló több szőrszálban megmutatkozó fenotípust. A B képen az ADA2b fehérjék mennyiségi csökkenésének hatása látható a genom stabilitására. Csökkent mennyiségű ADA2b fehérjék jelenlétében alacsony dózisú röntgen sugárzás hatására a mutációs ráta megemelkedik, az *mwh* recesszív marker megjelenése nagyobb gyakorisággal figyelhető meg.

4.8. Az ADA2b hatása a vörös szempigment mennyiségére

Mint az előző két fejezetben láhattuk az ADA2b és a *p53* fehérjék kapcsolatát több kísérleti rendszerben is sikerült bizonyítanunk. A két fehérje kapcsolatának alaposabb megismerése céljából a *Drosophila* szemében túltermeltettük a *p53* fehérjét és csökkenttük az ADA2b fehérjék szintjét. Normál esetben a *p53* túltermelése durva szem fenotípust

eredményez, de ha az ADA2b és a p53 fehérjék között kapcsolat van, akkor a fenotípus enyhül vagy erősödik. Ezt a változást a szempigment mennyiségének változásával mérhetjük. Ha a kialakuló fenotípus gyengébb, a szem több sejtet és így több pigmentet tartalmaz, ellenkező esetben kevesebbet. A kísérlet elvégzése után a várt eredményeket tapasztaltuk, ugyanis az ADA2b fehérje csökkenése a vörös pigment mennyiségét is csökkenti (19. ábra).

Kontroll kísérletként elvégeztük a szem fenotípus vizsgálatát a p53 fehérje túltermelése nélkül is. Meglepetésünkre ezen állatok szemében is tapasztalható volt a vörös pigment mennyiségének csökkenése, amely arra utal, hogy az ADA2b befolyásolja a pigment tartalmat és nem csupán a p53-ADA2b fehérjék közötti kölcsönhatás okozza a vörös pigment mennyiségi változását.



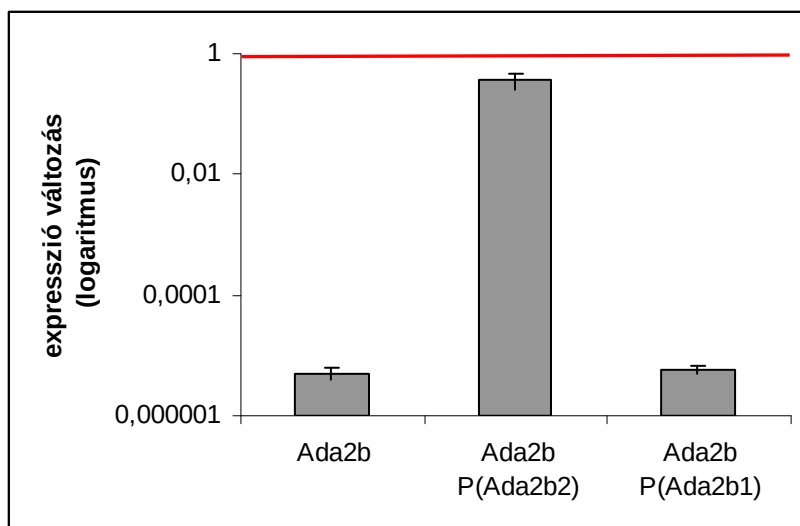
19. ábra

A vörös szempigment mennyiségének változása az *Ada2a*¹⁸⁹ (p53/Ada2b) és *Ada2b*⁸⁴² (p53/Ada2a) mutációra heterozigóta állatokban. Az *Ada2b*⁸⁴² mutáció hatására csökken a vörös pigment mennyisége és ez a hatás mérhető, a p53 érzékenyített háttér nélkül is (+/Ada2b).

A szempigment mérés eredményei azt sugallják, hogy az ADA2b egyike a vörös pigment kialakítását segítő faktoroknak. Felvetődik a kérdés, hogy az ADA2b fehérjék a szempigment kialakulásában fontos gének szabályozásában vesznek-e részt. Érdemes tisztázni továbbá, hogy a két ADA2b fehérje közül melyik, amelyik elengedhetetlen a gének aktiválódásához. A vörös pigment kialakításának egyik azonosított szabályozó faktora a *rosy* gén terméke, amely xantán dehidrogenáz aktivitással rendelkezik. A 4.9. fejezetben

tárgyalásra kerülő DNS microarray kísérletben azt tapasztaltuk, hogy az *Ada2b* hiányában a *rosy* gén expressziója csökkent mértékű.

A *rosy* gén kifejeződésének vizsgálatára kvantitatív RT-PCR segítségével mértük a *rosy* mRNS változását az *Ada2b*⁸⁴² homozigóta mutánsokban és az ADA2b¹ vagy ADA2b² fehérjét termelő transzgenikus törzsekben az L3-as lárvális állapot végén és a báb állapot után 10 órával. A kísérlet 3 alkalommal történő ismétlése igazolta, hogy az *Ada2b*⁸⁴² mutáció jelenlétében nem detektálható a *rosy* mRNS szintje. Az ADA2b két izoformája közül pedig a korábban sejtmagi lokalizációt mutató ADA2b² jelenléte szükséges a normális *rosy* génaktiváció lejátszódásához. Az általános acetilációért felelős citoplazmában található ADA2b¹ jelenlétében a *rosy* gén expressziós szintje azonos volt az *Ada2b*⁸⁴² mutációban tapasztalt expressziós szintjével. Az eredményeink alapján kijelenthető, hogy az ADA2b² izoforma az, amely a specifikus gének aktiválásában nélkülözhetetlen, míg az ADA2b¹ izoformájának jelenléte az eddig vizsgált gének aktivációjához nem szükséges. A *rosy* gén expressziós vizsgálatainak eredményét a 20. ábra tartalmazza.



20. ábra

A vörös pigment kialakításában szerepet játszó *rosy* gén expressziós szintje az *Ada2b*⁸⁴² (1. oszlop) homozigóta mutánsokban csökkent, de ez a csökkenés az ADA2b² (2. oszlop) bejuttatásával visszaállítható a vad típusú szintre. Az ADA2b1 nem befolyásolja a *rosy* expresszióját (3. oszlop).

4.9. *Ada2b* microarray

Az ADA2 tartalmú komplexek élesztőben specifikus gének transzkripcióját képesek befolyásolni. Például a PHO5 gén transzkripciójának aktivációját növeli az ADA2 fehérjét tartalmazó SAGA komplex jelenléte. Érdekes kérdés, hogy az eukarióta szervezetekben az

ADA2 fehérjék milyen gének szabályozásában vesznek részt. Az ADA2b hiányában kialakuló genom szintű génexpressziós változások detektálásához a DNS microarray technikát alkalmaztuk. A megegyező stádiumú vad típusú és Ada2b⁸⁴² homozigóta mutációt hordozó mintáink összehasonlításából a megfelelő statisztikai tesztek alkalmazva azonosítottuk az expressziójukban eltérést mutató géneket. Az Ada2b⁸⁴² mutáció hatására a genom mintegy 6 százaléka mutat az expresszióban eltérést a vad típusú állatokhoz képest. A mutáció 461 gén esetében okoz expresszió növekedést és közülük 228 (49 %) rendelkezik már azonosított funkcióval, 368 represszált közül pedig 200 ismert (54 %). A gének listáját és az expresszió változásait a Függelék tartalmazza.

A géneket a Gene Ontology adatbázisában található azonosított funkciójuk szerint csoportosítottuk. A kutikula kialakításban szerepet játszó gének közül húsz mutatott csökkenést, míg 12 expressziója növekedett. Azonosítottunk továbbá transzkripciós faktorokat (13 csökkent expressziójú), stresszválaszban szerepet játszó géneket (44 növekedett és 39 csökkent expressziójú), egyedfejlődésben azonosított géneket (44 növekedett és 14 csökkent expressziójú) és sejtciklus szabályozásában szerepet játszó (8 szintje csökkent) géneket.

Találtunk továbbá 3 gént, amely a szempigment kialakításában nélkülözhetetlen. A *rosy* és *brown* a vörös pigment kialakításában nélkülözhetetlen, míg a *scarlet* a barna pigment létrehozását szabályozza. Ez alátámasztja korábbi eredményeinket, miszerint az ADA2b fehérjének szabályozó szerepe van a szempigment kialakításban szerepet játszó gének aktiválásában.

Az utolsó csoportba az apoptózisban azonosított géneket soroltuk. Ezek közül 6 expressziója növekedett, míg 16 expressziója csökkent az ADA2b fehérjék hiányában. A csökkent transzkripciót mutató gének közül a *buffy* és az *Ark* génekről mutatták ki, hogy a p53 fehérje célgénjei. Továbbá igazolták, hogy a *reaper* – amely aktivációja elmarad az ADA2a fehérje hiányában, de nem változik az Ada2b⁸⁴² mutánsban – és az *Ark* a p53 fehérje által szabályozott, de eltérő apoptózis aktivációs útvonalban résztvevő partnerek. Így a korábban bemutatott real time PCR és az itt tárgyalt microarray eredmények vizsgálata alapján bizonyítható a feltételezés, hogy az ADA2a és ADA2b fehérjék az apoptózis eltérő útvonalában töltnek be szabályozó feladatokat.

5. Az eredmények megvitatása

A hisztonok amino terminálisának módosításai által szabályozott kromoszóma szerkezet változások a molekuláris biológia intenzíven kutatott területe. Az acetilációs módosításokat a hiszton acetiltranszferázok és deacetilázok végzik és alacsonyabb rendű eukarióta szervezetekben már kimutatták, hogy szerepet játszanak a génspecifikus transzkripció aktivációs folyamatokban. Magasabbrendű szervezetekben az acetiltranszferáz komplexek által szabályozott folyamatok kevésbé ismertek. Megismerésüket bonyolítja, hogy magasabbrendűekben több acetiltranszferáz komplex ismert és a komplexekben szereplő fehérjék izoformái és fehérje homológok révén az elméletben összerakható komplexek száma tovább nő.

Az általunk azonosított *Ada2* génekről képződő ADA2a, ADA2b¹ és ADA2b² ko-aktivátor fehérjék léte *Drosophila*-ban alátámasztja a magasabbrendűekben feltételezett nagy számú acetiltranszferáz komplex jelenlétét. Habár a két génről átíródó fehérjék homológiát mutatnak egymással, mégis különböző komplexekben szerepelnek, így eltérő lehet a funkciójuk (52). Az *Ada2* génnek funkciójának tisztázása érdekében deléciós mutáns alléleket állítottunk elő. A mutánsok fenotípus vizsgálata során kiderült, hogy mind az ADA2a, mind az ADA2b fehérje izoformáinak jelenléte létfontosságú a *Drosophila* egyedfejlődése folyamán. Az *Ada2b* vizsgálata során kiderült, hogy róla két fehérjét kódoló mRNS képződik. Munkám során a két ADA2b fehérje izoforma vizsgálatával igazoltam, hogy a két fehérje bár nagy homológiát mutat, mégis elkülönült funkcióval rendelkezik.

Az ADA2b¹ és ADA2b² fehérjék követésére létrehoztuk a fehérjék GFP-jelölt formáit és ezeket *Drosophila* sejtek és állatok transzformációjára alkalmas vektorba építettük. A létrehozott stabil *Drosophila* törzsek és a transzfektált S2 sejtek vizsgálata során megállapítottuk, hogy mindkét fehérje termelődik *in vivo*. Sejten belüli elhelyezkedésükben viszont eltérés mutatkozik, ami arra utal, hogy a két fehérje elkülönült feladatokat lát el a sejtben. Az ADA2b¹ a citoplazmatikus régióban volt megfigyelhető, míg az ADA2b² a sejtek magi régiójában helyezkedett el.

A *Drosophila* ADA2b¹ és ADA2b² fehérjéket tartalmazó komplexek által szabályozott folyamatok eddig még nem voltak ismertek, bár feltételezhető volt, hogy a fehérjék hiszton acetilációt végző komplexek tagjai. Ismertek továbbá a hisztonokon található lizin aminosavak, amelyek az acetiláció célpontjai lehetnek. Ezért célunk volt kideríteni, hogy az ADA2b tartalmú komplexek mely hisztonok lizinjeinek acetilációjában vesznek részt. Ehhez

első lépésben a mindkét fehérje kódoló régióját eltávolító *Ada2b*⁸⁴² homozigóta mutánsokat vetettük vizsgálat alá. Specifikus hiszton acetilációt felismerő ellenanyagokkal detektáltuk az egyes lizinek acetilációs állapotait a kontroll és a mutáns állatokban. Megállapítottuk, hogy az *Ada2b*⁸⁴² mutáció hatására a H3 hisztonok 9. és 14. lizinjének acetiláltsági szintje csökken. Ez a megfigyelés azt bizonyítja, hogy az ADA2b tartalmú komplexek tényleg hisztonok specifikus acetilációját végzik. Feltételezhető továbbá, hogy az ADA2b fehérjék transzkripció aktiválásban is részt vesznek, mivel transzkripcionálisan aktív gének promóter régióinak H3 9. és 14. lizinjeinek acetilációja növelni képes a génen folyó transzkripció sebességét (57, 60, 68).

Az ADA2b¹ és ADA2b² fehérjék eltérően képesek szabályozni a H3 9. és 14. lizinjeinek acetilációját. Az ADA2b² hiánya nem okoz acetilációs csökkenést egyik általunk vizsgált hiszton esetében sem. Az ADA2b¹ hiányában viszont az acetiláció szintje hasonló csökkenést mutat, mint az *Ada2b*⁸⁴² mutáció jelenlétében. Ez az eredmény és az a megfigyelés, hogy az ADA2b¹ a citoplazmában található nagyobb mennyiségben arra utalhat, hogy az ADA2b¹ az újonnan szintetizált hisztonok acetilációját végzi, majd ezek az hisztonok bejutnak a sejtmagba és a kromatin szerkezet kialakításában vesznek részt. Viszont az acetilációs módosítás nem tűnik el a hisztonokról, így hoznak létre egy általános acetilációs mintázatot az eukarióta kromoszómán.

Az ADA2b fehérjék tanulmányozása során azonosított acetilációs változások hasonló eredményeket mutatnak más laboratóriumokban talált eredményekkel (Christophe Antoniewski, Pasteur Institute Franciaország és Jerry Workman, Stower Institute USA). A GCN5 fehérje, amely azonos komplexekben található az ADA2 fehérjékkel a H3 K9 H3 K14 és a H4 K5 acetilációs szintjének szabályozásában is részt vesz. Kimutattuk, hogy az ADA2a tartalmú komplexek (ATAC) a hiszton 4 acetilációjára képesek, amely alapján kijelenthető, hogy az ADA2a és ADA2b eltérő hisztonokat képes felhasználni szubsztrátként. Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy az ADA2 típusú fehérjék jelenléte nagyban befolyásolja mely hisztonokat tekintik szubsztrátnak a GCN5 fehérjét tartalmazó komplexek.

Az ADA2 fehérje hiánya gének aktiválódásának elmaradását okozza élesztőben, lúdfüben és az emberi sejtekben. Az ADA2 tartalmú komplexek által szabályozott gének keresésére *Drosophila*-ban microarray kísérletet végeztünk. Az ADA2b tartalmú komplexek közel 850 gén expresszióját befolyásolják a báb állapot megkezdése után 10 órával. Ez a *Drosophilában* eddig azonosított gének 6%-a. Az ADA2b hiányában repressziót mutató gének közül 200 funkciója azonosított. Közülük 13 transzkripciós faktor és 3 ekdizon hatására aktiválódó gén. Ezek további gének transzkripcióját szabályozhatják, amelyek így közvetve

bár, de szintén az ADA2b tartalmú komplexek által szabályozottak. Az aktivált és represszált géneket a Gene Ontology adatbázisában található funkciójuk szerint csoportokba rendeztük. Ennek alapján megállapíthatjuk, hogy az ADA2b szabályozott gének csoportjai a kutikula kialakításban szerepet játszó gének, transzkripciós faktorok, stresszválaszban szerepet játszó gének, egyedfejlődésben szerepet játszó gének, sejtciklus szabályozásában szerepet játszó gének, pigment formációban nélkülözhetetlen és végül apoptózist szabályozó fehérjék génjei.

Megvizsgáltuk az aktivált és represszált gének kromoszómális elhelyezkedését is. Azt találtuk, hogy mind az aktivált, mind a represszált gének esetén a 3R kromoszómakar kétszer annyi gént tartalmaz, mint az ivari és a többi szomatikus kromoszóma karjai. Továbbá megfigyelhetők aktivációs és repressziós géncsoportok, ahol 5-8 represszált gént 5-6 aktivált gént tartalmazó régió követ. Ez feltételezi azt, hogy a kromoszóma aktivált vagy represszált állapota nem csupán egyetlen génre jellemző, hanem nagyobb régióra áttérjedve a szomszédos gének transzkripciójára is hatással lehet.

Adatainkat összevetettük a *Drosophila Gcn5^{E333st}* mutánsain készült DNS microarray eredményeivel. A mintavétel ideje az *Ada2b⁸⁴²* esetén a báb állapot elején, míg a *Gcn5^{E333st}* mutáns állatokból az L3 lárvális állapot végén történt. Ennek ellenére azonosítottunk 30 gént, amely expressziós szintje mind az ADA2b, mind a GCN5 hiányában csökkenést mutat, így feltételezhetően a szabályozása GCN5 és ADA2b fehérjéket egy időben tartalmazó komplexek révén történik. Közülük három játszott szerepet a kutikula kialakításában. Az *Ada2b⁸⁴²* mutánsban megnövekedett génexpressziót mutató gének közül legnagyobb aktivitást immunválaszban szerepet játszó gének mutattak. Feltételezésünk szerint a kutikula szerkezete nem tökéletes, így a bakteriális és virális fertőzések nagyobb gyakorisággal következnek be. Bár a GCN5 és ADA2b hiányában nem ugyanazon immungének expressziója növekedett, de ennek oka lehet, hogy a két laborban nem ugyanazon fertőző törzsek találhatók.

Több pigment kialakításban szerepet játszó gén expressziója is csökkenést mutatott az *Ada2b* mutánsokban. A *rosy*, *scarlet* és a *brown* expressziós szintje ötödére csökkent a kontroll állatokhoz képest. A korábbi microarray adatokból várt eredménynek megfelelően az *Ada2b* mRNS szintjének csökkenése csökkentette a vörös pigment mennyiségét is. A két ADA2b fehérje izoforma eltérést mutat ezen gének szabályozásában. Az ADA2b² jelenléte szükséges a *rosy* gén expressziójához. Az ADA2b¹ – amely hiányában a H3K9 és H3K14 acetilációja csökken – nem befolyásolta a *rosy* kifejeződést. Így arra következtethetünk, hogy a *rosy* gén specifikus aktivitásáért az ADA2b² szükséges, míg az ADA2b¹ feladata az általános acetilációs mintázat létrehozása a kromoszómán.

Számos korábbi adat utalt arra, hogy a hiszton acetiltranszferázok a programozott sejthalál szabályozásában fontos szerepet töltenek be. Élesztőben és humán sejtvonalakon végzett kísérletek igazolták, hogy a p53 acetilációját GCN5 tartalmú komplexek végzik, de az ADA2 fehérjék és a p53 kapcsolatára kevés számú kísérleti eredmény utalt (40, 69). A p53 egy tumor szupresszor, a DNS károsodását felismerő és apoptózist indukáló fehérje. Hiányában a sejtekben ionizáló sugárzás hatására létrejövő DNS károsodás javításának hatékonysága gyengébb. A károsodott sejtek elpusztulása is ritkábban történik, mivel a károsodás felismerése nem működik a p53 mutánsokban. A *Drosophila melanogaster* szöveteiben is hasonló jelenségek figyelhetők meg és a p53 aktivált gének nem kapcsolnak be a p53 hiányában. A *Drosophila* p53 és az ADA2b fehérjék kölcsönhatására először Kusch és munkatársai élesztő kettős hibrid kísérletei világítottak rá (40). Az általunk használt *in vivo* rendszerben igazoltuk, hogy az *Ada2b* mRNS szintjének csökkenése mutációk felhalmozódását okozta, minek következtében a markerként vizsgált *mwh* fenotípus gyakrabban figyelhető meg, mint a vad típusú állatokban. Ez arra utal, hogy az ADA2b fehérjék szükségesek a genom stabilitásának fenntartásában, jelenlétükkel képesek segíteni a DNS károsodást felismerő folyamatokat.

A nagy dózisu röntgen sugárzás hatására aktiválódó p53 által szabályozott apoptotikus folyamatok sem tökéletesek az ADA2b fehérjék hiányában, a 40 Gy dózisu röntgen sugárzás hatására elpusztult sejtek mennyisége alacsonyabb a kontroll állatokban tapasztalt sinthez viszonyítva. Megfigyelték, hogy a DNS károsodás hatására a töredezett kromoszóma fragmentumokon erőteljes acetilációs jel figyelhető meg (referencia). Feltételezhetően ez a folyamat szükséges a kromatin szerkezet fellazulásához és a törést felismerő és javító komplexek kötődéséhez. Acetiltranszferáz komplexek hiányában pedig a kromatin kisebb mértékben képes fellazulni, így a sejt nem érzékeli a DNS törését és nem képes a sejtet apoptózisba küldeni. Az apoptózis elmaradásának egy másik lehetséges magyarázatát szintén a DNS microarray kísérlet szolgáltatja. Az ADA2b fehérjék hiányában ugyanis az *Ark* gén expressziója csökkenést mutat és az *Ark* géntermék eltávolítása szintén az apoptózis aktivációjának elmaradását okozza. Így elképzelhető, hogy a csökkent mennyiségű *Ark* mRNS nem elegendő az apoptózis elindításához. A p53 által szabályozott gének közül vizsgáltuk továbbá a *reaper* aktivációját. Röntgen sugárzás után az ADA2b fehérjék hiánya nem volt hatással a *reaper* génre, ugyanis hasonló *reaper* transzkripció növekedést láttunk az *Ada2b*⁸⁴² mutánsban, mint a kontroll állatokban. Az ADA2a tartalmú (ATAC) komplex hiányában viszont nem történt *reaper* aktiváció. Így arra következtethetünk, hogy az ADA2b

és ADA2a fehérjék a p53 által szabályozott apoptózisban szerepet játszó, de különböző gének szabályozását végzik.

A mitózis során a kromoszómák kondenzálódnak, majd újra lazább szerkezetet vesznek fel. Ezen folyamatok szabályozásában szintén azonosítottak GCN5 tartalmú hiszton acetiltranszferáz komplexeket. A humán GCN5 komplexek segítik egyes, a sejtciklusban szerepet játszó gének transzkripció aktivációját is. *Drosophila*-ban eddig nem találtak egyértelmű bizonyítékot arra, hogy a hiszton acetiltranszferáz komplexek szerepet játszanának a sejtciklus szabályozásában. Az ADA2 fehérje tartalmú komplexek szerepének tisztázására első lépésben testi sejt mozaikokat hoztunk létre *Ada2b*⁸⁴² heterozigóta állatokban. A mitotikus rekombináció következtében létrejövő *Ada2b*⁸⁴² homozigóta mozaik foltok méretének csökkenése a normális sejtciklus zavara miatt figyelhető meg.

A mitózisban lévő sejtek láthatóvá tételéhez H3 10. szerinjének foszforilációját felismerő ellenanyagot használtunk. Ez a hiszton módosítás ugyanis nagy mennyiségben a sejtciklus M fázisban figyelhető meg. A mitózisban levő sejtek számának vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy a gyorsan osztódó imágó korongokban felborul a normális mitózis sebessége. Feltételezésünk szerint az *Ada2b*⁸⁴² mutáció hatására a mitózisban lévő sejtek száma azért látszik nagyobbnak, mert a sejteknek több idő szükséges egy mitotikus ciklushoz.

A mitózisban nélkülözhetetlen *Map205* gént *Ada2b*⁸⁴² mutánsokon végzett microarray kísérletben azonosítottuk és megállapítottuk, hogy expressziója csökken az ADA2b hiányában. Real Time PCR segítségével is sikerült ezt az eredményt bizonyítanunk. Megállapítottuk továbbá, hogy az ADA2b¹ és ADA2b² eltérő módon befolyásolja a *Map205* gén kifejeződését. Az *Ada2b*⁸⁴² mutáció jelenlétében a *Map205* expressziója jóval alacsonyabb, mint a kontroll állatokban és az ADA2b² fehérje hiánya is hasonló változást eredményez. Ha visszajuttatjuk az ADA2b² fehérje funkciót, akkor a *Map205* kifejeződése a kontroll állatokban tapasztalt szint közelébe áll vissza. Ez az eredmény bizonyítja, hogy az ADA2b² fehérje felelős a *Map205* gén specifikus aktivációjáért, míg az általános acetilációt végző ADA2b¹ nem vesz részt a gén szabályozásában. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy az ADA2 fehérjék nem csak az általános acetilációs folyamatok szabályozásáért felelősek, hanem az egyes gének transzkripciójának aktiválásában is szükséges a jelenlétük. A citoplazmában elhelyezkedő ADA2b¹ feladata egy általános acetilációs szint létrehozása a kromoszómán, de ez az acetiláció nincs hatással specifikus gének transzkripciójára. A sejtmagban található ADA2b² viszont specifikus gének transzkripcióját képes nagymértékben megnövelni.

6. Summary

Chromatin modifying and chromatin remodeling complexes play central roles in eukaryotic transcription by overcoming the repressed state of genes resulting from the tight packaging of DNA and histone proteins in nucleosomes. Among chromatin modifying complexes those which carry histone acetyl transferase (HAT) activity deserve particular attention since acetylation of the N-terminal tails of nucleosomal histones is proven to have specific gene activation or in some cases repression effects. ADA2 (*alteration/deficiency in activation*) proteins are components of several HAT complexes, which contain the GCN5 catalytic subunit.

Recently, our group has reported that the *Drosophila* genome contains two distinct genes encoding ADA2 homologs. Biochemical characterization of the two ADA2 proteins demonstrated that both of them interact with the HAT GCN5 and participate in transcription activation. On the other hand, ADA2a and ADA2b exhibit marked differences, since they participate in distinct high-molecular-weight HAT-containing protein complexes, localize to different chromosomal loci, and have at least partly different partners of interaction. Two different ADA2 homologs encoded by two distinct genes have been found not only in *Drosophila* but also in *Arabidopsis* and several vertebrates. The primary aim of the studies described in my thesis was to complete a detailed analysis one of the two identified *Ada2* genes of *Drosophila* in order to gain a better understanding of the distinct roles of ADA2 proteins in higher eukaryotes.

In order to facilitate a detailed study of the *Ada2b* gene and to analyze the biological role of its product(s), first I generated *Ada2b* mutants by mobilizing a P-element insertion located close to the putative regulatory region of the gene. Following mobilization of the P-element I used genetic and molecular approaches to characterize the obtained mutants. Results of these experiments demonstrated the successful generation a number of *Ada2b* alleles among them several which are null mutants.

Phenotype analysis of the generated mutants revealed that the lack of *Ada2b* function severely affects the development of animals. Homozygous *Ada2b*⁸⁴² null mutants are pupa lethal. A direct proof that the lethality and other observed developmental defects of *Ada2b*⁸⁴² null animals were the results of the loss of ADA2b function was provided by transgenes corresponding to the genomic *Ada2b* region. Several independent transgene insertions were able to rescue the phenotypic defects and resulted in development of fertile adults.

Furthermore, generation of germ line chimeras by pole cell transplantation demonstrated that the *Ada2b* function is also required for the start of normal embryonic development.

Northern-blot analysis of ADA2b specific RNA demonstrated that the transcription of *Ada2b* give rises to two messages. By the use of specific primers I PCR amplified cDNA copies of both messages and constructed transgenes which direct the synthesis of EGFP fusion derivatives of both ADA2b proteins. Expression of these hybrid genes in S2 cells suggested that the two ADA2b proteins (ADA2b¹ and ADA2b²) are localized in different cell compartments. ADA2b¹ is detectable mainly in the cytoplasm while ADA2b² in the nucleus. The construction and analysis of transgenic *Drosophila* lines expressing either an ADA2b¹-EGFP or an ADA2b²-EGFP transgene under the control of UAS regulatory region also demonstrated the functional difference of the two ADA2b proteins. Both the *Ada2b¹* and *Ada2b²* transgene show a rescue effect, but to a different extent and neither of them is capable for a complete rescue. The two transgenes, however, together are able to facilitate the development of animals to the extent close to that observed with a wild type transgene.

As ADA2 proteins are components of HAT complexes it was interesting to test the effect of *Ada2b*⁸⁴² mutations on histone acetylation. We found that *Ada2b*⁸⁴² mutations have a strong effect on H3 acetylation. Interestingly, a difference between the two ADA2b proteins, ADA2b¹ and ADA2b² was also observed in H3 acetylation. We found that in the absence of ADA2b² H3 K14 and K9 acetylation is not affected. In contrast, in *Ada2b¹* mutants a decreased H3K14 acetylation was detected. Again, as it was found in the case of lethality, with the use of transgenes directing only ADA2b¹ or ADA2b² production we could demonstrate that only one of the two ADA2b proteins are playing a role in histone H3 post-translational modification.

We detected even further functional differences between the two ADA2 factors of *Drosophila* by studying their role in eye pigment production, apoptosis and mitosis.

A comparison of the pigment contents of *Ada2* heterozygotes and wild-type animals indicated that *Ada2b*⁸⁴² mutation affected the pigment contents of the eyes of adult animals, while *Ada2a*¹⁸⁹ mutation did not. In concert with this, the mRNA level of *rosy*, a gene encoding xanthine dehydrogenase, which is involved in the formation of red eye pigments, exhibited a significant reduction in *Ada2b*⁸⁴² mutants as compared to wild-type animals, while the expression of *rosy* did not change in *Ada2a*¹⁸⁹ null animals. The difference between the two isoforms of ADA2b is also observable in the different regulation of the *rosy* gene. The presence of ADA2b² is necessary and sufficient for normal expression level of *rosy* gene.

This suggests that ADA2a and -b are differentially involved (directly or indirectly) in the transcriptional regulation of *rosy*.

The physical interaction of ADA2b protein with the tumor suppressor p53 was demonstrated in an American laboratory by immunoprecipitation. This prompted us to test if a functional consequence of this interaction in vivo can be detected. Loss of heterozygosity (LOH) assays are established means of demonstrating the role played by Dmp53 in preserving genome stability. Cells which have lost the wild-type copy of *mwh* (*multiple wing hair*) display the recessive *mwh* phenotype, which is easily recognizable and can be scored. In *Ada2a*¹⁸⁹ heterozygotes, the frequency of clones was similar to that seen in wild-type animals. In contrast, *Ada2b*⁸⁴² heterozygotes exhibited substantially elevated numbers of *mwh* cells under conditions that had no effect on wild-type flies or *Ada2a*¹⁸⁹ heterozygotes. This result clearly demonstrated that ADA2b, unlike ADA2a, is involved in the pathway induced by Dmp53 to preserve genomic stability in response to low-level X-ray radiation induced DNA damage. The Dmp53 function is also essential for radiation-induced apoptosis. DNA damage leads to *Dmp53* activation, which through the transcriptional activation of proapoptotic factors brings about apoptosis. Radiation induced apoptosis in the disks of *Ada2b*⁸⁴² mutants was significantly lower than that in wild type animals. In accord with that, in *Ada2b*⁸⁴² mutant imaginal discs the number of cells stained with the vital dye acridine-orange was significantly decreased. The introduction of the *Ada2b*^g transgene into *Ada2b*⁸⁴² null animals restored apoptosis to the level seen in the wild type, indicating that the decreased level in *Ada2b*⁸⁴² mutants was a result of ablation of the *Ada2b* function. To test whether *Ada2* mediates *Dmp53* functions by altering its proapoptotic target, *reaper* transcription, we compared the *reaper* mRNA levels in wild-type and *Ada2* mutants. Interestingly, although high-dose X-ray irradiation resulted in a decrease in apoptosis in wing imaginal discs the induction of the *reaper* message was similar in wild-type and *Ada2b*. Surprisingly, we could not detect *reaper* mRNA induction under the same conditions in *Ada2a*¹⁸⁹ mutants. Taken together, these data indicate that ADA2b exerts its effect on a Dmp53-related pathway(s) other than those including *reaper* induction.

The retarded development of organs containing mitotically dividing cells (gonads, imaginal discs) of *Ada2b*⁸⁴² mutants as compared with the wild-type controls indicates a delay in cell cycle progression. In the absence of *Ada2b*, the number of cells in mitosis is increased in imaginal discs. It is reasonable to assume that failure of transcription of the genes required for proper cell cycle progression is the primary cause of cell proliferation defects. We assume that in *Ada2b*⁸⁴² cells, the cycle is blocked in G2/M. In concert with that, we observed that the

*Ada2b*⁸⁴² mutation abolishes the expression of a mitotic regulator, *Map205*. The presence of ADA2b² rescued the *Map205* mRNA level, but the ADA2b¹ did not.

Finally, we analyzed the effect of *Ada2b*⁸⁴² mutation on the total cellular mRNA profile by microarray hybridization. The changes we observed in the level of specific mRNAs comparing wild type and *Ada2b*⁸⁴² samples support the conclusions we made from the study of individual genes. In *Ada2b*⁸⁴² mutants the expression of genes playing a role in eye pigment formation, in apoptosis and in mitosis can be detected. In addition, we also detected specific alterations in the expression of genes involved in cuticle formation and immunity. The determination whether these changes are primary or secondary effects of the loss of *Ada2b* requires further studies. A detailed analysis of the large amount of chip data and particularly a comparison of that with data obtained from mutants defective in other components of HAT complexes is in progress in our laboratory.

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőimnek, **Dr. Boros Imrének és Dr. Komonyi Orbánnak**, akik munkámat hozzáértően irányították és segítették. Különös tekintettel meg szeretném köszönni **Dr. Komonyi Orbán** minden tudományos segítségét és példamutató gondoskodását, amit a laboratóriumban eltöltött évek során irányomban tanúsított.

Köszönettel tartozom továbbá **Dr. Pápai Gábornak, Dr. Bodai Lászlónak, Újfaludi Zsuzsannának és Anita Curciu-nak** a kísérletek során nyújtott segítségükért, kritikus észrevételeikért és tudományos tanácsaikért.

Köszönet illeti **Dr. Szabad Jánost és Dr. Tora Lászlót**, amiért laborjukban dolgozhattam és az értékes módszerek elsajátításában pótolhatatlan segítséget nyújtottak.

Hálás vagyok **Ökrösné Katalin, Nagy Bettina és Csebella Bakota Adrienn** segítségéért, amellyel hozzájárultak a munkámhoz. Az ő segítségük és tapasztalatuk elengedhetetlen volt a gördülékeny munkához.

Továbbá köszönöm munkatársaimnak **Dr. Bálint Évának, Christina Popescu-nak, Bereczki Orsolyának, Tombácz Istvánnak, Pardi Norbertnek**, hogy a laborban baráti légkört teremtve együtt dolgozhattam velük.

Köszönetemet szeretném kifejezni **Szüleimnek és Bodó Gabriellának**, akik munkám során szeretettel támogattak.

8. A dolgozatban használt rövidítések

ADA :	<u>A</u> lteration <u>D</u> eficiency in <u>A</u> ctivation
ATAC	<i>Ada Two A containing Complex</i>
ATP	adenozil-trifoszfát
Cdk5:	Cyclin-dependent kinase 5
Cht4:	<i>chitinase4</i>
Cks30A:	Cyclin-dependent kinase subunit 30A
CREB p300/BP	CREB p300 binding protein
Cy:	<i>Curly</i>
CycA:	<i>Cyclin A</i>
Dtl:	<u>D</u> rosophila <u>t</u> at <u>l</u> ike protein
EGFP	enhanced green fluorescent protein
GCN5:	<u>G</u> eneral <u>C</u> ontrol <u>N</u> onderepressible- <u>5</u> '
GNAT	Gcn5-containing N-acetyltransferase complex
GTP	guanozil-trifoszfát
H3AcK14 (K9) :	<i>Hiszton 3 lizin 14 (lizin 9) acetiláció</i>
H3PS10:	<i>Hiszton 3 szerin 10 foszforiláció</i>
H4AcK5 (K12):	<i>Hiszton 4 lizin 5 (lizin 12) acetiláció</i>
HCF:	<i>host cell factor</i>
HDAC	histone deacetylase
HMG17, HMG1	high mobility group protein 17, 1
HPI	heterochromatic protein1
Hu:	<i>Humeral</i>
IGBMC	Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire
ISWI:	imitation-SWI
Ki ^S :	<i>King super</i>
Klp61F:	Kinesin-like protein at 61F
Lcp1 (4):	<i>larval cuticle protein 1 (4)</i>
LOH:	Loss Of Heterozygosity assay
Map205:	<i>Microtubule associated protein 205</i>
MOF:	males absent on the first
MORF	<u>m</u> onocytic leukemia zinc finger protein- <u>r</u> elated <u>f</u> actor
MOZ	<u>m</u> onocytic leukemia <u>z</u> inc finger protein

<i>Mwh</i>	multiple wing hair
MyoD	myogenic determination
MYST	MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 and Tip60 acetyltransferase superfamily
PCAF	p300/CBP-associating factor
PCR	polimerase chain reaction
<i>Rpb4:</i>	<i><u>R</u>NS <u>p</u>olimeráz <u>β</u> 4. <u>a</u>legysége</i>
<i>Sb:</i>	<i>Stubble</i>
SDS-PAGE	sodium-dodecyl-sulfate polyacrilamide gel electrophoresis
<i>Tb:</i>	<i>Tubby</i>
TBP	TATA binding protein
TRA 1	tumor rejection antigen 1
<i>UAS:</i>	<i><u>U</u>pstream <u>A</u>ctivation <u>S</u>equences</i>
<i>w:</i>	<i>white</i>

9. Irodalomjegyzék

1. **Aasland, R., A. F. Stewart, and T. Gibson.** 1996. The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIIB. *Trends Biochem Sci* **21**:87-8.
2. **Akhtar, A., and P. B. Becker.** 2000. Activation of transcription through histone H4 acetylation by MOF, an acetyltransferase essential for dosage compensation in *Drosophila*. *Mol Cell* **5**:367-75.
3. **Angus-Hill, M. L., R. N. Dutnall, S. T. Tafrov, R. Sternglanz, and V. Ramakrishnan.** 1999. Crystal structure of the histone acetyltransferase Hpa2: A tetrameric member of the Gcn5-related N-acetyltransferase superfamily. *J Mol Biol* **294**:1311-25.
4. **Baarends, W. M., J. W. Hoogerbrugge, H. P. Roest, M. Ooms, J. Vreeburg, J. H. Hoeijmakers, and J. A. Grootegoed.** 1999. Histone ubiquitination and chromatin remodeling in mouse spermatogenesis. *Dev Biol* **207**:322-33.
5. **Bannister, A. J., and T. Kouzarides.** 1996. The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* **384**:641-3.
6. **Barlev, N. A., A. V. Emelyanov, P. Castagnino, P. Zegerman, A. J. Bannister, M. A. Sepulveda, F. Robert, L. Tora, T. Kouzarides, B. K. Birshtein, and S. L. Berger.** 2003. A novel human Ada2 homologue functions with Gcn5 or Brg1 to coactivate transcription. *Mol Cell Biol* **23**:6944-57.
7. **Berger, S. L., B. Pina, N. Silverman, G. A. Marcus, J. Agapite, J. L. Regier, S. J. Triezenberg, and L. Guarente.** 1992. Genetic isolation of ADA2: a potential transcriptional adaptor required for function of certain acidic activation domains. *Cell* **70**:251-65.
8. **Boggs, B. A., B. Connors, R. E. Sobel, A. C. Chinault, and C. D. Allis.** 1996. Reduced levels of histone H3 acetylation on the inactive X chromosome in human females. *Chromosoma* **105**:303-9.
9. **Borrow, J., V. P. Stanton, Jr., J. M. Andresen, R. Becher, F. G. Behm, R. S. Chaganti, C. I. Civin, C. Disteché, I. Dube, A. M. Frischauf, D. Horsman, F. Mitelman, S. Volinia, A. E. Watmore, and D. E. Housman.** 1996. The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein. *Nat Genet* **14**:33-41.
10. **Boyer, L. A., M. R. Langer, K. A. Crowley, S. Tan, J. M. Denu, and C. L. Peterson.** 2002. Essential role for the SANT domain in the functioning of multiple chromatin remodeling enzymes. *Mol Cell* **10**:935-42.
11. **Briggs, S. D., M. Bryk, B. D. Strahl, W. L. Cheung, J. K. Davie, S. Y. Dent, F. Winston, and C. D. Allis.** 2001. Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **15**:3286-95.
12. **Brownell, J. E., and C. D. Allis.** 1996. Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr Opin Genet Dev* **6**:176-84.
13. **Candau, R., P. A. Moore, L. Wang, N. Barlev, C. Y. Ying, C. A. Rosen, and S. L. Berger.** 1996. Identification of human proteins functionally conserved with the yeast putative adaptors ADA2 and GCN5. *Mol Cell Biol* **16**:593-602.
14. **Champagne, N., N. R. Bertos, N. Pelletier, A. H. Wang, M. Vezmar, Y. Yang, H. H. Heng, and X. J. Yang.** 1999. Identification of a human histone acetyltransferase related to monocytic leukemia zinc finger protein. *J Biol Chem* **274**:28528-36.

15. **Clarke, A. S., J. E. Lowell, S. J. Jacobson, and L. Pillus.** 1999. Esa1p is an essential histone acetyltransferase required for cell cycle progression. *Mol Cell Biol* **19**:2515-26.
16. **DeLange, R. J., D. M. Fambrough, E. L. Smith, and J. Bonner.** 1969. Calf and pea histone IV. 3. Complete amino acid sequence of pea seedling histone IV; comparison with the homologous calf thymus histone. *J Biol Chem* **244**:5669-79.
17. **Dou, Y., X. Song, Y. Liu, and M. A. Gorovsky.** 2005. The H1 phosphorylation state regulates expression of CDC2 and other genes in response to starvation in *Tetrahymena thermophila*. *Mol Cell Biol* **25**:3914-22.
18. **Eberharter, A., and P. B. Becker.** 2002. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep* **3**:224-9.
19. **Eberharter, A., S. John, P. A. Grant, R. T. Utley, and J. L. Workman.** 1998. Identification and analysis of yeast nucleosomal histone acetyltransferase complexes. *Methods* **15**:315-21.
20. **Ericsson, C., I. L. Goldknopf, and B. Daneholt.** 1986. Inhibition of transcription does not affect the total amount of ubiquitinated histone 2A in chromatin. *Exp Cell Res* **167**:127-34.
21. **Feng, Q., H. Wang, H. H. Ng, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, K. Struhl, and Y. Zhang.** 2002. Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Curr Biol* **12**:1052-8.
22. **Garcea, R. L., and B. M. Alberts.** 1980. Comparative studies of histone acetylation in nucleosomes, nuclei, and intact cells. Evidence for special factors which modify acetylase action. *J Biol Chem* **255**:11454-63.
23. **Grant, P. A., L. Duggan, J. Cote, S. M. Roberts, J. E. Brownell, R. Candau, R. Ohba, T. Owen-Hughes, C. D. Allis, F. Winston, S. L. Berger, and J. L. Workman.** 1997. Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev* **11**:1640-50.
24. **Grant, P. A., A. Eberharter, S. John, R. G. Cook, B. M. Turner, and J. L. Workman.** 1999. Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes. *J Biol Chem* **274**:5895-900.
25. **Guelman, S., T. Suganuma, L. Florens, S. K. Swanson, C. L. Kiesecker, T. Kusch, S. Anderson, J. R. Yates, 3rd, M. P. Washburn, S. M. Abmayr, and J. L. Workman.** 2006. Host cell factor and an uncharacterized SANT domain protein are stable components of ATAC, a novel dAda2A/dGcn5-containing histone acetyltransferase complex in *Drosophila*. *Mol Cell Biol* **26**:871-82.
26. **Hirose, Y., and J. L. Manley.** 2000. RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes Dev* **14**:1415-29.
27. **Jin, Y., Y. Wang, J. Johansen, and K. M. Johansen.** 2000. JIL-1, a chromosomal kinase implicated in regulation of chromatin structure, associates with the male specific lethal (MSL) dosage compensation complex. *J Cell Biol* **149**:1005-10.
28. **Kadosh, D., and K. Struhl.** 1997. Repression by Ume6 involves recruitment of a complex containing Sin3 corepressor and Rpd3 histone deacetylase to target promoters. *Cell* **89**:365-71.
29. **Kaltschmidt, C., M. Muller, G. Brem, and R. Renkawitz.** 1994. DNase I hypersensitive sites far upstream of the rat tryptophan oxygenase gene direct developmentally regulated transcription in livers of transgenic mice. *Mech Dev* **45**:203-10.

30. **Kamei, Y., L. Xu, T. Heinzel, J. Torchia, R. Kurokawa, B. Gloss, S. C. Lin, R. A. Heyman, D. W. Rose, C. K. Glass, and M. G. Rosenfeld.** 1996. A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* **85**:403-14.
31. **Kamine, J., B. Elangovan, T. Subramanian, D. Coleman, and G. Chinnadurai.** 1996. Identification of a cellular protein that specifically interacts with the essential cysteine region of the HIV-1 Tat transactivator. *Virology* **216**:357-66.
32. **Kelley, R. L., and M. I. Kuroda.** 1995. Equality for X chromosomes. *Science* **270**:1607-10.
33. **Kelley, R. L., I. Solovyeva, L. M. Lyman, R. Richman, V. Solovyev, and M. I. Kuroda.** 1995. Expression of msl-2 causes assembly of dosage compensation regulators on the X chromosomes and female lethality in *Drosophila*. *Cell* **81**:867-77.
34. **Keohane, A. M., P. O'Neill L, N. D. Belyaev, J. S. Lavender, and B. M. Turner.** 1996. X-Inactivation and histone H4 acetylation in embryonic stem cells. *Dev Biol* **180**:618-30.
35. **Kimura, A., and M. Horikoshi.** 1998. Tip60 acetylates six lysines of a specific class in core histones in vitro. *Genes Cells* **3**:789-800.
36. **Kingston, R. E., C. A. Bunker, and A. N. Imbalzano.** 1996. Repression and activation by multiprotein complexes that alter chromatin structure. *Genes Dev* **10**:905-20.
37. **Korzus, E., J. Torchia, D. W. Rose, L. Xu, R. Kurokawa, E. M. McInerney, T. M. Mullen, C. K. Glass, and M. G. Rosenfeld.** 1998. Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science* **279**:703-7.
38. **Krogan, N. J., J. Dover, S. Khorrami, J. F. Greenblatt, J. Schneider, M. Johnston, and A. Shilatifard.** 2002. COMPASS, a histone H3 (Lysine 4) methyltransferase required for telomeric silencing of gene expression. *J Biol Chem* **277**:10753-5.
39. **Krogan, N. J., M. Kim, A. Tong, A. Golshani, G. Cagney, V. Canadien, D. P. Richards, B. K. Beattie, A. Emili, C. Boone, A. Shilatifard, S. Buratowski, and J. Greenblatt.** 2003. Methylation of histone H3 by Set2 in *Saccharomyces cerevisiae* is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* **23**:4207-18.
40. **Kusch, T., S. Guelman, S. M. Abmayr, and J. L. Workman.** 2003. Two *Drosophila* Ada2 homologues function in different multiprotein complexes. *Mol Cell Biol* **23**:3305-19.
41. **Kwon, T., J. H. Chang, E. Kwak, C. W. Lee, A. Joachimiak, Y. C. Kim, J. Lee, and Y. Cho.** 2003. Mechanism of histone lysine methyl transfer revealed by the structure of SET7/9-AdoMet. *Embo J* **22**:292-303.
42. **Lachner, M., D. O'Carroll, S. Rea, K. Mechtler, and T. Jenuwein.** 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**:116-20.
43. **Lerach, S., W. Zhang, H. Deng, X. Bao, J. Girton, J. Johansen, and K. M. Johansen.** 2005. JIL-1 kinase, a member of the male-specific lethal (MSL) complex, is necessary for proper dosage compensation of eye pigmentation in *Drosophila*. *Genesis* **43**:213-5.
44. **Levinger, L., and A. Varshavsky.** 1982. Selective arrangement of ubiquitinated and D1 protein-containing nucleosomes within the *Drosophila* genome. *Cell* **28**:375-85.
45. **Lin, X., and W. G. Nelson.** 2003. Methyl-CpG-binding domain protein-2 mediates transcriptional repression associated with hypermethylated GSTP1 CpG islands in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res* **63**:498-504.

46. **Ling, X., T. A. Harkness, M. C. Schultz, G. Fisher-Adams, and M. Grunstein.** 1996. Yeast histone H3 and H4 amino termini are important for nucleosome assembly in vivo and in vitro: redundant and position-independent functions in assembly but not in gene regulation. *Genes Dev* **10**:686-99.
47. **Loyola, A., G. LeRoy, Y. H. Wang, and D. Reinberg.** 2001. Reconstitution of recombinant chromatin establishes a requirement for histone-tail modifications during chromatin assembly and transcription. *Genes Dev* **15**:2837-51.
48. **Mao, Y., K. A. Pavangadkar, M. F. Thomashow, and S. J. Triezenberg.** 2006. Physical and functional interactions of Arabidopsis ADA2 transcriptional coactivator proteins with the acetyltransferase GCN5 and with the cold-induced transcription factor CBF1. *Biochim Biophys Acta*.
49. **Merlo, A., J. G. Herman, L. Mao, D. J. Lee, E. Gabrielson, P. C. Burger, S. B. Baylin, and D. Sidransky.** 1995. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* **1**:686-92.
50. **Miller, T., N. J. Krogan, J. Dover, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, M. Johnston, J. F. Greenblatt, and A. Shilatifard.** 2001. COMPASS: a complex of proteins associated with a trithorax-related SET domain protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:12902-7.
51. **Mizzen, C. A., X. J. Yang, T. Kokubo, J. E. Brownell, A. J. Bannister, T. Owen-Hughes, J. Workman, L. Wang, S. L. Berger, T. Kouzarides, Y. Nakatani, and C. D. Allis.** 1996. The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* **87**:1261-70.
52. **Muratoglu, S., S. Georgieva, G. Papai, E. Scheer, I. Enunlu, O. Komonyi, I. Cserpan, L. Lebedeva, E. Nabirochkina, A. Udvardy, L. Tora, and I. Boros.** 2003. Two different Drosophila ADA2 homologues are present in distinct GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes. *Mol Cell Biol* **23**:306-21.
53. **Nakagawachi, T., H. Soejima, T. Urano, W. Zhao, K. Higashimoto, Y. Satoh, S. Matsukura, S. Kudo, Y. Kitajima, H. Harada, K. Furukawa, H. Matsuzaki, M. Emi, Y. Nakabeppu, K. Miyazaki, M. Sekiguchi, and T. Mukai.** 2003. Silencing effect of CpG island hypermethylation and histone modifications on O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene expression in human cancer. *Oncogene* **22**:8835-44.
54. **Nakayama, J., J. C. Rice, B. D. Strahl, C. D. Allis, and S. I. Grewal.** 2001. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* **292**:110-3.
55. **Neuwald, A. F., and D. Landsman.** 1997. GCN5-related histone N-acetyltransferases belong to a diverse superfamily that includes the yeast SPT10 protein. *Trends Biochem Sci* **22**:154-5.
56. **Nickel, B. E., and J. R. Davie.** 1989. Structure of polyubiquitinated histone H2A. *Biochemistry* **28**:964-8.
57. **Nishida, H., T. Suzuki, S. Kondo, H. Miura, Y. Fujimura, and Y. Hayashizaki.** 2006. Histone H3 acetylated at lysine 9 in promoter is associated with low nucleosome density in the vicinity of transcription start site in human cell. *Chromosome Res* **14**:203-11.
58. **Norris, D. P., N. Brockdorff, and S. Rastan.** 1991. Methylation status of CpG-rich islands on active and inactive mouse X chromosomes. *Mamm Genome* **1**:78-83.
59. **Otero, G., J. Fellows, Y. Li, T. de Bizemont, A. M. Dirac, C. M. Gustafsson, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and J. Q. Svejstrup.** 1999. Elongator, a

- multisubunit component of a novel RNA polymerase II holoenzyme for transcriptional elongation. *Mol Cell* **3**:109-18.
60. **Park, P. H., R. Miller, and S. D. Shukla.** 2003. Acetylation of histone H3 at lysine 9 by ethanol in rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **306**:501-4.
 61. **Parthun, M. R., J. Widom, and D. E. Gottschling.** 1996. The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism. *Cell* **87**:85-94.
 62. **Puri, P. L., V. Sartorelli, X. J. Yang, Y. Hamamori, V. V. Ogryzko, B. H. Howard, L. Kedes, J. Y. Wang, A. Graessmann, Y. Nakatani, and M. Levrero.** 1997. Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation. *Mol Cell* **1**:35-45.
 63. **Qian, C., X. Wang, K. Manzur, Sachchidanand, A. Farooq, L. Zeng, R. Wang, and M. M. Zhou.** 2006. Structural Insights of the Specificity and Catalysis of a Viral Histone H3 Lysine 27 Methyltransferase. *J Mol Biol.*
 64. **Rea, S., F. Eisenhaber, D. O'Carroll, B. D. Strahl, Z. W. Sun, M. Schmid, S. Opravil, K. Mechtler, C. P. Ponting, C. D. Allis, and T. Jenuwein.** 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**:593-9.
 65. **Reifsnnyder, C., J. Lowell, A. Clarke, and L. Pillus.** 1996. Yeast SAS silencing genes and human genes associated with AML and HIV-1 Tat interactions are homologous with acetyltransferases. *Nat Genet* **14**:42-9.
 66. **Roman-Gomez, J., J. A. Castillejo, A. Jimenez, M. G. Gonzalez, F. Moreno, C. Rodriguez Mdel, M. Barrios, J. Maldonado, and A. Torres.** 2002. 5' CpG island hypermethylation is associated with transcriptional silencing of the p21(CIP1/WAF1/SDI1) gene and confers poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **99**:2291-6.
 67. **Ruiz-Carrillo, A., L. J. Weng, and V. G. Allfrey.** 1975. Processing of newly synthesized histone molecules. *Science* **190**:117-28.
 68. **Rusovici, R., Y. Y. Hui, and H. A. Lavoie.** 2005. Epidermal growth factor-mediated inhibition of follicle-stimulating hormone-stimulated StAR gene expression in porcine granulosa cells is associated with reduced histone H3 acetylation. *Biol Reprod* **72**:862-71.
 69. **Sakaguchi, K., J. E. Herrera, S. Saito, T. Miki, M. Bustin, A. Vassilev, C. W. Anderson, and E. Appella.** 1998. DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev* **12**:2831-41.
 70. **Schiltz, R. L., C. A. Mizzen, A. Vassilev, R. G. Cook, C. D. Allis, and Y. Nakatani.** 1999. Overlapping but distinct patterns of histone acetylation by the human coactivators p300 and PCAF within nucleosomal substrates. *J Biol Chem* **274**:1189-92.
 71. **Schneider, J., A. Wood, J. S. Lee, R. Schuster, J. Dueker, C. Maguire, S. K. Swanson, L. Florens, M. P. Washburn, and A. Shilatifard.** 2005. Molecular regulation of histone H3 trimethylation by COMPASS and the regulation of gene expression. *Mol Cell* **19**:849-56.
 72. **Schurter, B. T., S. S. Koh, D. Chen, G. J. Bunick, J. M. Harp, B. L. Hanson, A. Henschen-Edman, D. R. Mackay, M. R. Stallcup, and D. W. Aswad.** 2001. Methylation of histone H3 by coactivator-associated arginine methyltransferase 1. *Biochemistry* **40**:5747-56.
 73. **Shibata, K., and K. Ajiro.** 1993. Cell cycle-dependent suppressive effect of histone H1 on mitosis-specific H3 phosphorylation. *J Biol Chem* **268**:18431-4.

74. **Shiio, Y., and R. N. Eisenman.** 2003. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:13225-30.
75. **Shilatifard, A.** 2006. Chromatin Modifications by Methylation and Ubiquitination: Implications in the Regulation of Gene Expression. *Annu Rev Biochem.*
76. **Smith, E. R., A. Eisen, W. Gu, M. Sattah, A. Pannuti, J. Zhou, R. G. Cook, J. C. Lucchesi, and C. D. Allis.** 1998. ESA1 is a histone acetyltransferase that is essential for growth in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:3561-5.
77. **Sterner, D. E., and S. L. Berger.** 2000. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**:435-59.
78. **Stockinger, E. J., Y. Mao, M. K. Regier, S. J. Triezenberg, and M. F. Thomashow.** 2001. Transcriptional adaptor and histone acetyltransferase proteins in Arabidopsis and their interactions with CBF1, a transcriptional activator involved in cold-regulated gene expression, p. 1524-33, *Nucleic Acids Res*, vol. 29.
79. **Strahl, B. D., P. A. Grant, S. D. Briggs, Z. W. Sun, J. R. Bone, J. A. Caldwell, S. Mollah, R. G. Cook, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, and C. D. Allis.** 2002. Set2 is a nucleosomal histone H3-selective methyltransferase that mediates transcriptional repression. *Mol Cell Biol* **22**:1298-306.
80. **Szabad, J.** 1978. Quick preparation of *Drosophila* for microscopic analysis. *Drosophila Information Service* **53**.
81. **Szabad, J., and J. Szidonya.** 1980. Developmental analysis of fs(1)1867, an egg resorption mutation of *Drosophila melanogaster*. *Basic Life Sci* **16**:95-108.
82. **Taipale, M., and A. Akhtar.** 2005. Chromatin mechanisms in *Drosophila* dosage compensation. *Prog Mol Subcell Biol* **38**:123-49.
83. **Takechi, S., and T. Nakayama.** 1999. Sas3 is a histone acetyltransferase and requires a zinc finger motif. *Biochem Biophys Res Commun* **266**:405-10.
84. **Torchia, J., C. Glass, and M. G. Rosenfeld.** 1998. Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. *Curr Opin Cell Biol* **10**:373-83.
85. **Torchia, J., D. W. Rose, J. Inostroza, Y. Kamei, S. Westin, C. K. Glass, and M. G. Rosenfeld.** 1997. The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* **387**:677-84.
86. **Verger, A., J. Perdomo, and M. Crossley.** 2003. Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep* **4**:137-42.
87. **Verreault, A.** 2000. De novo nucleosome assembly: new pieces in an old puzzle. *Genes Dev* **14**:1430-8.
88. **Wallberg, A. E., E. M. Flinn, J. A. Gustafsson, and A. P. Wright.** 2000. Recruitment of chromatin remodelling factors during gene activation via the glucocorticoid receptor N-terminal domain. *Biochem Soc Trans* **28**:410-4.
89. **Wang, Y., W. Zhang, Y. Jin, J. Johansen, and K. M. Johansen.** 2001. The JIL-1 tandem kinase mediates histone H3 phosphorylation and is required for maintenance of chromatin structure in *Drosophila*. *Cell* **105**:433-43.
90. **West, M. H., and W. M. Bonner.** 1980. Histone 2B can be modified by the attachment of ubiquitin. *Nucleic Acids Res* **8**:4671-80.
91. **Wittschieben, B. O., G. Otero, T. de Bizemont, J. Fellows, H. Erdjument-Bromage, R. Ohba, Y. Li, C. D. Allis, P. Tempst, and J. Q. Svejstrup.** 1999. A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell* **4**:123-8.
92. **Xu, L., R. M. Lavinsky, J. S. Dasen, S. E. Flynn, E. M. McInerney, T. M. Mullen, T. Heinzel, D. Szeto, E. Korzus, R. Kurokawa, A. K. Aggarwal, D. W. Rose, C. K. Glass, and M. G. Rosenfeld.** 1998. Signal-specific co-activator domain requirements for Pit-1 activation. *Nature* **395**:301-6.

93. **Xu, W., D. G. Edmondson, and S. Y. Roth.** 1998. Mammalian GCN5 and P/CAF acetyltransferases have homologous amino-terminal domains important for recognition of nucleosomal substrates. *Mol Cell Biol* **18**:5659-69.
94. **Yeates, T. O.** 2002. Structures of SET domain proteins: protein lysine methyltransferases make their mark. *Cell* **111**:5-7.
95. **Zhang, Y., and D. Reinberg.** 2001. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* **15**:2343-60.

10. Függelék

A microarray kísérletben *Ada2b* hiányában csökkent expressziójú gének listája és expressziós változása.

AFFY próba	WT1	WT2	WT3	M1	M2	M3I	P érték T teszt	WT átlag	M átlag	Átlag arány Mutáns/Vad	Gén
141269_at	567	579	542	242	319	277	0,0002	563	280	0,50	CG8399
141314_at	57	86	75	12	21	15	0,0014	73	16	0,22	Lcp65Ag1
141397_at	1166	1926	2173	174	347	460	0,0052	1755	327	0,19	CG8502
141409_at	26	45	33	3	8	5	0,003	35	5	0,15	CG6164
141412_at	1416	1738	1953	482	483	675	0,0012	1702	547	0,32	CG6891
141439_at	33	44	47	11	22	11	0,0044	41	14	0,35	CG32302
141442_at	37	38	29	22	18	10	0,0084	35	17	0,48	CG33489
141513_at	30	17	21	9	14	6	0,0201	23	10	0,41	Caf1-180
141573_at	752	668	721	271	228	356	0,0003	714	285	0,40	CG17646
141672_r_at	194	197	162	78	81	100	0,0009	184	86	0,47	CG17597
141673_at	368	271	352	120	67	114	0,0013	330	100	0,30	CG8291
141687_at	82	71	102	21	29	24	0,0015	85	25	0,29	srp
141709_i_at	1111	831	1144	590	427	486	0,0043	1029	501	0,49	Tub84D
141760_at	104	124	95	10	17	36	0,0008	107	21	0,19	nAcR21C
141801_at	258	338	318	126	95	206	0,0082	305	142	0,47	CG31689
142019_at	17	19	17	7	12	7	0,0046	18	9	0,49	
142139_at	458	496	563	120	115	123	0,0001	506	119	0,24	CG3699
142182_s_at	103	132	120	54	41	78	0,0057	118	58	0,49	Ppn
142183_at	30	36	32	8	8	10	0,0001	32	8	0,26	Ppn
142206_s_at	435	475	562	175	79	153	0,0009	491	136	0,28	CG14527
142209_at	32	31	29	6	16	12	0,0016	31	11	0,36	
142279_at	15	21	34	2	7	4	0,0142	23	4	0,19	bw
142317_at	47	24	46	7	10	5	0,0078	39	8	0,20	CG10298
142348_at	74	75	71	35	18	45	0,0038	73	33	0,44	CG30004
142406_at	51	42	43	30	9	12	0,0084	45	17	0,37	CG6931
142415_at	111	134	133	45	50	14	0,0014	126	36	0,29	Nmda1
142453_at	282	252	302	102	91	131	0,0004	279	108	0,39	GNBP3
142455_at	344	343	383	114	124	137	5E-05	356	125	0,35	CG11779
142479_at	26	41	23	8	4	3	0,0064	30	5	0,16	GstE8
142515_at	74	113	97	20	10	24	0,0016	95	18	0,19	fau
142700_at	450	411	384	142	63	93	0,0002	415	99	0,24	CG31352
142886_at	41	62	41	18	17	26	0,0112	48	20	0,43	CG10165
142941_at	108	141	128	16	54	72	0,0074	126	47	0,38	Eip74EF
142996_at	99	54	90	18	42	38	0,0176	81	32	0,40	CG11033
143034_at	8	7	6	3	3	5	0,0056	7	3	0,47	CG14685
143044_at	64	49	63	16	9	5	0,0005	59	10	0,17	granny-smith
143093_at	1966	2107	2068	842	947	1180	0,0003	2047	990	0,48	Cat

AFFY próba	WT1	WT2	WT3	M1	M2	M3I	P érték T teszt	WT átlag	M átlag	Átlag arány Mutáns/Vad	Gén
143191_at	17	20	22	10	6	7	0,0016	20	8	0,39	Hsc70-1
143210_at	19	15	12	10	5	5	0,0148	16	7	0,43	kz
143219_at	208	212	204	100	54	127	0,0029	208	93	0,45	esg
143232_at	1800	1663	1695	521	529	917	0,0007	1719	656	0,38	Lcp1
143235_at	1525	1731	1727	301	307	505	9E-05	1661	371	0,22	Lcp4
143245_at	58	61	40	24	26	21	0,006	53	23	0,44	m1
143264_at	310	338	355	120	112	155	0,0002	334	129	0,39	Mlc1
143307_at	6	10	9	1	3	3	0,004	8	2	0,26	plu
143308_at	42	85	62	34	13	10	0,0199	63	19	0,30	Poxm
143418_at	81	87	60	20	24	13	0,0014	76	19	0,25	Yp3
143452_at	73	63	69	39	29	28	0,0006	68	32	0,47	Klp67A
143470_at	1798	2358	2130	362	703	421	0,0006	2095	495	0,24	LysX
143483_at	5	7	5	2	2	1	0,0041	6	2	0,31	argos
143533_at	65	66	49	9	19	15	0,001	60	14	0,23	Rb97D
143589_at	47	68	47	37	16	18	0,0175	54	23	0,44	Mdr50
143606_at	88	143	191	25	64	29	0,0175	141	39	0,28	Cyp18a1
143608_at	177	194	208	47	24	69	0,0004	193	47	0,24	Dbi
143666_at	71	56	46	22	37	14	0,0144	57	24	0,42	fzo
143696_at	139	113	164	40	65	32	0,0031	139	46	0,33	CG4038
143713_at	25	16	31	6	5	14	0,0201	24	8	0,35	MED20
143762_at	1175	1007	901	48	18	9	0,0001	1028	25	0,02	Eig71Eh
143763_at	1070	1135	990	323	130	129	0,0002	1065	194	0,18	Eig71Ei
143777_at	218	262	274	44	37	38	0,0001	251	40	0,16	Ahcy89E
143823_at	37	34	34	13	11	9	2E-05	35	11	0,31	Est9
143834_at	233	173	150	81	43	96	0,0094	185	73	0,40	CycB3
143869_at	291	354	295	102	107	200	0,0048	313	136	0,44	vri
143873_at	178	153	177	49	45	88	0,0012	169	61	0,36	Fsh
143945_at	131	134	200	43	52	55	0,0048	155	50	0,32	Scp2
144000_at	148	212	221	49	76	123	0,012	194	83	0,43	arg
144108_at	59	70	89	20	11	44	0,011	72	25	0,34	CG7694
144116_at	29	28	32	6	10	19	0,0054	30	11	0,38	CG4865
144147_at	1665	1803	1942	678	687	939	0,0005	1803	768	0,43	BM-40- SPARC
144222_at	33	65	42	4	16	11	0,0109	47	10	0,22	CG4793
144235_at	30	36	37	8	3	3	0,0002	34	5	0,14	CG8942
144263_at	22	27	30	14	13	2	0,0106	26	10	0,37	CG15262
144264_at	30	31	50	5	6	15	0,0085	37	9	0,23	CG15263
144283_at	429	605	559	132	234	265	0,0042	531	210	0,40	CG16876
144311_at	428	496	540	122	115	160	0,0003	488	133	0,27	yellow-c
144322_at	217	328	301	79	160	117	0,0081	282	119	0,42	CG18146
144603_at	31	24	32	13	7	6	0,0018	29	9	0,29	I(1)G0148
144619_at	19	18	17	11	6	9	0,0019	18	9	0,48	CG4547
144701_at	478	564	858	280	227	314	0,019	633	274	0,43	CG12116
144710_at	40	38	65	5	8	4	0,0045	48	5	0,11	Ppt1
144821_at	16	17	19	6	7	2	0,0008	17	5	0,30	CG32677
144884_at	111	100	100	44	48	42	6E-05	103	45	0,43	I(1)G0237
144905_at	19	14	22	8	11	6	0,0091	19	8	0,45	CG15738
144988_at	206	154	220	101	78	83	0,0038	193	87	0,45	CG32645
144996_at	43	33	32	8	8	27	0,0179	36	14	0,39	CG15743

AFFY próba	WT1	WT2	WT3	M1	M2	M3I	P érték T teszt	WT átlag	M átlag	Átlag arány Mutáns/Vad	Gén
145170_at	12	8	7	5	3	2	0,0199	9	3	0,37	CG12395
145200_at	59	51	40	7	14	14	0,0014	50	12	0,23	CG13010
145201_at	88	110	84	63	25	50	0,0131	94	46	0,49	CG13011
145236_at	3410	3865	3384	737	620	1205	0,0002	3553	854	0,24	CG12998
145327_s_at	2244	2884	2980	863	921	1224	0,0013	2703	1003	0,37	CG6900
145337_at	31	32	39	6	10	18	0,0035	34	11	0,34	CG7378
145341_i_at	236	227	128	25	20	18	0,0035	197	21	0,11	CG14191
145412_at	309	303	350	152	106	206	0,0035	321	155	0,48	CG12656
145466_at	113	101	132	45	55	56	0,0014	115	52	0,45	CG32521
145471_at	81	74	78	29	31	49	0,0016	78	36	0,47	CG1718
145527_at	33	34	36	21	12	11	0,0017	35	15	0,42	CG13690
145553_at	79	78	65	26	20	20	0,0002	74	22	0,29	CG4375
145568_at	19	21	10	3	6	7	0,02	17	5	0,32	CG14342
145572_at	37	23	34	19	6	4	0,0137	31	10	0,31	robo3
145581_at	75	52	55	31	13	24	0,0066	61	23	0,38	lea
145598_at	208	182	220	98	88	97	0,0004	204	94	0,46	CG17646
145603_at	13	27	17	4	9	4	0,0198	19	6	0,31	CG31665
145632_at	66	85	85	15	17	12	0,0003	79	15	0,19	robl22E
145645_at	23	29	26	4	7	4	0,0004	26	5	0,19	CG3528
145648_at	32	24	26	15	7	13	0,0046	27	12	0,43	Cyp309a2
145657_at	26	29	32	5	9	12	0,0009	29	9	0,30	CG9879
145677_at	22	34	31	15	18	5	0,0175	29	12	0,43	CG3117
145704_at	36	36	39	20	21	12	0,0018	37	18	0,47	E23
145793_at	51	62	58	14	28	13	0,0013	57	19	0,33	hoe2
145823_at	60	60	61	35	35	16	0,0033	60	28	0,47	nmr2
145861_at	12	20	19	8	6	3	0,0074	17	5	0,32	Ucp4B
145895_at	37	39	42	23	13	19	0,0013	39	18	0,47	CG13981
145896_at	761	755	874	280	319	440	0,0009	797	346	0,43	CG9508
145897_at	56	49	53	17	9	38	0,0116	53	21	0,41	CG9511
145920_at	19	28	23	5	6	11	0,0028	23	7	0,30	CG11188
145976_s_at	107	127	194	41	76	50	0,0185	143	55	0,39	CG31904
146030_at	602	986	943	322	381	445	0,0109	843	383	0,45	CG13394
146096_at	32	37	35	10	15	12	0,0002	35	12	0,35	CG4382
146267_at	51	67	71	9	30	29	0,0057	63	23	0,36	CG14945
146269_at	347	498	523	124	157	206	0,004	456	162	0,36	CG14946
146300_at	25	20	18	12	9	4	0,0059	21	8	0,39	CG15483
146325_at	726	618	777	233	277	285	0,0004	707	265	0,38	CG6043
146340_at	30	42	38	5	7	17	0,0031	37	10	0,26	CG16954
146350_s_at	2475	1934	1471	663	647	607	0,0052	1960	639	0,33	CG16885
146351_i_at	2199	1973	1320	1038	675	868	0,0134	1831	860	0,47	CG16885
146355_at	11	16	22	2	6	2	0,0123	16	3	0,21	CG18636
146381_at	41	30	62	14	7	19	0,0177	44	13	0,30	mdy
146406_at	172	190	187	73	73	64	3E-05	183	70	0,38	CG18563
146515_at	20	21	38	2	5	7	0,0114	26	5	0,19	CG13962
146568_at	53	37	72	1	2	2	0,0033	54	2	0,03	ppk13
146588_at	13	12	16	7	4	4	0,0017	13	5	0,35	CG17570
146602_at	14	11	11	4	7	2	0,0077	12	4	0,36	CG1421
146652_at	327	439	497	117	196	174	0,0047	421	162	0,39	CG17337
146684_at	42	21	47	10	11	10	0,0152	37	10	0,28	CG17266
146685_at	14	17	13	3	6	4	0,0014	15	4	0,28	CG15909

AFFY próba	WT1	WT2	WT3	M1	M2	M3I	P érték T teszt	WT átlag	M átlag	Átlag arány Mutáns/Vad	Gén
146793_at	43	22	25	5	5	3	0,009	30	4	0,14	CG14757
146814_at	229	188	180	92	41	95	0,003	199	76	0,38	CG12780
146850_at	146	194	255	25	44	54	0,0042	198	41	0,21	CG13748
146863_at	11	9	14	4	7	3	0,0133	11	5	0,44	CG13741
146880_at	96	102	112	18	41	56	0,0028	103	38	0,37	wun2
146900_at	60	52	51	29	11	39	0,0166	54	27	0,49	CG10459
147027_at	389	345	416	150	116	184	0,0006	383	150	0,39	CG30035
147028_i_at	793	788	838	355	404	450	0,0001	806	403	0,50	CG30035
147081_at	29	21	21	6	6	10	0,0028	24	7	0,31	CG13162
147121_at	11	10	12	4	6	2	0,0018	11	4	0,37	CG30488
147160_at	40	46	45	17	5	14	0,0007	44	12	0,28	CG13335
147173_at	15	11	11	5	2	3	0,0033	12	3	0,27	CG30485
147213_at	58	45	67	17	33	18	0,0075	57	23	0,40	Adgf-E
147218_at	10	12	16	7	8	5	0,016	13	6	0,49	CG12865
147230_at	46	27	52	9	14	8	0,0077	41	10	0,25	CG10265
147304_at	104	75	64	41	27	13	0,0105	81	27	0,34	CG6262
147337_at	610	1083	1250	96	212	330	0,0097	981	213	0,22	CG6429
147339_at	270	349	364	127	198	165	0,005	328	164	0,50	CG6472
147354_at	191	179	272	63	64	54	0,0032	214	60	0,28	CG15917
147420_at	9	8	11	6	3	4	0,0069	9	4	0,44	CG5719
147421_at	37	33	43	9	18	5	0,0023	37	11	0,29	CG14499
147444_at	226	252	366	31	89	94	0,0057	281	71	0,25	CG10924
147446_at	53	44	38	10	7	9	0,0007	45	9	0,19	CG30115
147449_at	53	58	49	8	31	17	0,0044	53	19	0,35	CG5327
147454_at	247	163	198	29	51	21	0,0014	203	34	0,17	
147484_s_at	22	20	18	6	8	13	0,0039	20	9	0,44	CG18606
147487_r_at	51	64	48	30	34	12	0,0126	54	25	0,47	CG18606
147497_at	2156	2651	2323	1077	1043	804	0,0006	2376	975	0,41	cer
147538_at	44	28	37	20	19	5	0,0166	36	15	0,41	CG13871
147540_at	63	38	73	10	16	14	0,0066	58	13	0,23	CG16739
147559_at	82	82	84	20	17	21	6E-07	83	19	0,23	CG13436
147588_at	179	227	227	81	133	50	0,0068	211	88	0,42	CG9344
147598_at	183	189	189	67	82	84	2E-05	187	78	0,42	Cht4
147654_at	16	15	26	7	10	5	0,0173	19	7	0,39	CG13501
147679_at	33	25	29	13	5	18	0,0084	29	12	0,41	CG4752
147754_at	41	35	29	6	23	18	0,017	35	16	0,44	CG13539
147772_at	48	69	46	31	26	14	0,0126	55	24	0,43	yellow-d2
147776_at	564	456	461	110	177	306	0,0059	494	198	0,40	CG9815
147882_at	551	555	641	71	132	151	0,0001	582	118	0,20	Mmp1
147927_at	46	41	46	29	3	3	0,0113	44	12	0,27	Roc1b
147955_at	24	24	13	9	9	7	0,0158	20	8	0,40	trio
147958_at	44	61	49	15	27	32	0,0098	51	25	0,48	bab2
147963_at	2045	2210	2417	599	397	790	0,0002	2224	595	0,27	CG9192
147964_at	48	31	57	26	14	12	0,016	45	17	0,38	CG9187
147971_at	51	68	62	30	33	26	0,0026	60	30	0,49	CG2213
148037_at	23	32	25	14	8	11	0,0044	27	11	0,41	DmsR-2
148058_at	135	169	165	54	28	102	0,0085	156	61	0,39	CG1246
148088_at	62	40	43	26	18	13	0,0111	48	19	0,40	CG14958
148106_s_at	5440	5644	4713	1255	501	1399	0,0002	5266	1052	0,20	dro6
148196_at	52	56	51	26	32	19	0,0014	53	26	0,48	CG12493
148215_at	13	8	11	5	4	5	0,0087	11	4	0,42	CG32423

AFFY próba	WT1	WT2	WT3	M1	M2	M3I	P érték T teszt	WT átlag	M átlag	Átlag arány Mutáns/Vad	Gén
148294_at	19	18	12	2	8	9	0,0149	16	6	0,36	CG18156
148356_at	82	101	113	27	12	51	0,0047	98	30	0,31	CG8492
148544_at	97	96	111	6	18	63	0,0079	101	29	0,29	CG6327
148546_at	44	62	51	14	10	33	0,0096	52	19	0,36	CG6310
148623_at	291	360	626	41	80	44	0,0113	426	55	0,13	CG11570
148631_at	33	33	32	21	21	7	0,0133	33	16	0,50	CG17154
148639_at	10	8	15	5	5	4	0,0188	11	5	0,41	CG6910
148843_at	127	103	156	22	32	43	0,0021	129	33	0,25	CG13075
148860_at	138	205	265	30	21	48	0,0053	203	33	0,16	CG4950
148880_r_at	6941	6644	5390	3442	2549	3440	0,0024	6325	3144	0,50	CG13060
148919_at	209	178	188	91	123	73	0,0026	191	95	0,50	DpseGA11985
148928_at	694	624	556	209	198	343	0,0018	625	250	0,40	CG14059
148960_at	32	26	43	19	6	5	0,0113	34	10	0,30	CG6333
148976_at	142	174	176	26	68	103	0,0085	164	66	0,40	cln3
148979_at	15	10	11	4	4	8	0,0158	12	5	0,45	CG7408
148982_at	713	690	813	50	48	85	3E-05	739	61	0,08	CG7402
149008_at	22	14	19	6	12	6	0,0127	18	8	0,42	CG18363
149049_r_at	2797	2771	2425	419	475	368	3E-05	2664	421	0,16	CG18294
149083_at	135	128	188	26	71	18	0,0057	150	38	0,25	schuy
149206_at	225	331	367	92	62	101	0,0037	307	85	0,28	CG14567
149209_at	329	450	609	55	106	195	0,0096	463	118	0,26	CG14565
149215_at	273	325	262	124	126	167	0,0017	286	139	0,48	CG7442
149218_at	166	158	248	38	49	43	0,0036	191	43	0,23	CS-2
149266_at	62	79	59	28	25	15	0,002	67	23	0,34	CG12582
149267_at	117	182	233	52	66	68	0,0136	177	62	0,35	CG14636
149280_at	15	9	8	6	2	1	0,0186	11	3	0,26	CG14651
149303_at	79	107	112	23	39	29	0,0017	99	30	0,30	CG14661
149305_at	5857	5767	5613	1407	2564	3996	0,0074	5746	2655	0,46	CG1124
149361_at	22	14	22	10	8	6	0,0085	20	8	0,41	CG14678
149367_at	134	185	273	16	32	5	0,0061	197	18	0,09	Obp83ef
149403_at	15	22	23	7	14	5	0,0199	20	9	0,45	CG15185
149409_at	87	93	99	40	38	48	0,0002	93	42	0,45	CG2336
149446_at	317	413	495	6	10	6	0,0007	408	7	0,02	CG14598
149474_at	102	120	115	2	17	10	6E-05	112	10	0,08	CG7900
149485_at	26	33	24	9	5	5	0,0014	28	6	0,22	CG11694
149528_at	40	81	86	7	16	13	0,0091	69	12	0,18	CG9837
149536_at	58	54	63	9	10	30	0,0021	58	16	0,28	CG31100
149542_at	31	30	34	9	13	9	1E-04	32	10	0,33	CG16734
149543_at	19	23	22	8	16	4	0,0172	22	9	0,43	CG16736
149657_at	54	59	51	33	14	33	0,0075	54	27	0,49	CG14696
149855_at	410	449	487	106	88	172	0,0003	449	122	0,27	Adgf-D
149886_at	96	109	78	50	53	10	0,0135	94	38	0,40	CG14840
149897_at	19	18	15	10	8	7	0,0016	17	8	0,48	CG31330
149931_at	20	18	14	4	3	3	0,0005	17	3	0,18	dpr9
149937_at	109	162	176	56	55	69	0,0066	149	60	0,40	CG6912
149964_at	80	71	74	37	27	44	0,0011	75	36	0,48	CG14872
149968_at	3259	3954	4080	1113	1509	1741	0,0009	3764	1454	0,39	CG5399
150016_at	168	158	159	56	58	41	3E-05	162	51	0,32	Pak3
150057_at	63	65	63	31	31	29	2E-06	64	30	0,48	CG12265
150196_at	17	11	17	4	2	7	0,0066	15	4	0,27	CG11626

AFFY próba	WT1	WT2	WT3	M1	M2	M3I	P érték T teszt	WT átlag	M átlag	Átlag arány Mutáns/Vad	Gén
150257_at	47	68	79	25	11	33	0,0112	65	23	0,35	MtnC
150262_at	68	65	62	21	14	4	0,0003	65	13	0,20	CG10881
150283_at	25	35	36	19	4	18	0,0198	32	14	0,43	CG3822
150284_at	156	198	212	25	36	10	0,0004	189	24	0,13	TotB
150302_at	41	38	39	22	6	4	0,0044	39	11	0,27	CG5810
150335_at	43	59	36	3	3	14	0,0035	46	7	0,14	fit
150341_at	18	20	15	6	2	12	0,0121	18	7	0,38	BG4
150412_at	78	68	85	25	51	39	0,0063	77	38	0,50	CG13833
150438_at	790	1107	1676	112	202	178	0,0085	1191	164	0,14	CG6763
150461_at	52	50	40	11	13	26	0,0031	48	17	0,35	CG31145
150466_at	96	68	107	16	19	48	0,008	90	28	0,31	Plip
150472_at	42	30	38	21	7	11	0,0069	37	13	0,36	CG13599
150475_at	27	34	22	18	8	12	0,0131	28	12	0,44	CG31140
150504_at	15	9	16	2	5	3	0,0081	13	3	0,24	CG17784
150530_at	604	1289	1465	90	213	210	0,0117	1119	171	0,15	
150565_at	588	750	813	151	210	327	0,0023	717	229	0,32	CG11852
150671_f_at	210	194	239	63	26	81	0,0009	214	57	0,26	CG5476
150706_at	1395	1350	1346	355	280	468	3E-05	1364	367	0,27	CG6131
150707_at	1181	1251	1292	278	264	407	4E-05	1242	316	0,25	CG15884
150716_at	477	451	556	93	101	147	0,0002	495	114	0,23	CG5896
150776_at	9	11	11	3	2	4	0,0003	10	3	0,28	CG1894
150779_at	3401	3138	3412	339	389	386	3E-06	3317	371	0,11	CG14062
150780_at	77	127	131	12	53	19	0,0091	112	28	0,25	CG9989
150836_at	205	310	354	74	90	154	0,0109	290	106	0,37	Obp99d
150946_at	37	22	39	3	5	6	0,0032	32	4	0,14	CG1499
150955_at	70	75	71	31	46	15	0,0052	72	31	0,42	CG2191
151003_at	232	288	349	69	74	142	0,0045	290	95	0,33	Buffy
151092_at	490	680	1263	20	38	90	0,0155	811	49	0,06	CG14244
151132_at	13	8	16	5	4	2	0,0119	12	4	0,29	CG11666
151142_at	131	90	98	44	48	62	0,0081	106	51	0,48	jbug
151217_at	38	40	61	1	1	1	0,0016	46	1	0,02	
151262_at	31	29	48	1	3	1	0,0024	36	2	0,05	
151268_i_at	1442	1339	1454	155	240	157	6E-06	1412	184	0,13	CG13069
151272_at	236	304	234	39	57	105	0,0016	258	67	0,26	
151287_at	205	253	347	42	54	48	0,0031	268	48	0,18	Nplp2
151301_at	544	614	506	136	117	162	0,0001	555	138	0,25	CG13315
151423_at	19	19	14	11	7	5	0,0092	17	8	0,44	CG15867
151433_at	12	15	16	5	11	4	0,018	14	6	0,45	CG16978
151438_at	12	9	10	4	3	2	0,0007	11	3	0,27	cenG1A
151442_at	433	415	467	128	160	205	0,0003	438	164	0,38	mol
151458_at	127	115	164	74	65	63	0,0053	135	67	0,50	CG31676
151496_s_at	688	868	871	313	333	337	0,0007	809	328	0,41	CG14526
151680_at	128	142	115	66	58	48	0,0008	128	57	0,44	CG31152
151826_at	4620	5759	5243	1506	1472	2209	0,0005	5207	1729	0,33	
151885_at	119	143	132	67	53	68	0,0007	131	63	0,48	CG9009
151938_at	30	30	32	13	3	3	0,001	31	6	0,21	CG18178
151961_at	530	522	523	149	165	194	6E-06	525	169	0,32	CG5397
151976_at	61	77	60	6	5	29	0,0027	66	13	0,20	kal-1
152059_at	414	405	382	161	188	195	5E-05	400	181	0,45	CG1516
152102_at	240	212	249	8	14	16	2E-05	234	13	0,05	CG9119
152104_at	5	10	10	2	1	3	0,0104	8	2	0,26	lpk1

AFFY próba	WT1	WT2	WT3	M1	M2	M3I	P érték T teszt	WT átlag	M átlag	Átlag arány Mutáns/Vad	Gén
152139_at	62	36	47	21	12	17	0,0087	48	17	0,35	CG17352
152155_at	806	1002	1006	295	448	536	0,003	938	426	0,45	CG9338
152171_at	19	27	33	13	10	13	0,0126	26	12	0,45	Gyc99B
152181_at	21	33	22	11	16	10	0,0175	25	13	0,49	CG9631
152183_at	72	81	103	50	28	37	0,0065	86	38	0,45	CG4680
152196_at	279	292	387	31	74	89	0,0013	319	65	0,20	CG10345
152200_at	43	58	53	2	7	1	0,0003	51	3	0,06	ry
152206_at	135	156	207	62	96	84	0,011	166	81	0,49	CG12024
152246_at	86	97	131	37	35	46	0,005	105	39	0,38	CG7888
152253_at	122	94	135	18	17	39	0,0015	117	25	0,21	CG12582
152321_at	95	102	103	22	35	18	8E-05	100	25	0,25	CG4462
152328_at	39	28	35	8	14	11	0,0017	34	11	0,33	CG3544
152348_at	24	23	27	13	5	11	0,0024	25	10	0,39	olf413
152382_at	142	152	201	37	47	100	0,0092	165	62	0,37	CG7149
152515_at	552	517	623	227	274	261	0,0004	564	254	0,45	Pgi
152556_at	59	63	72	17	11	34	0,0026	65	21	0,32	Ser7
152558_at	83	68	91	50	39	32	0,0043	81	40	0,50	CG3376
152565_at	472	655	555	156	134	285	0,0032	561	192	0,34	Zeelin1
152640_at	91	56	105	44	21	37	0,0178	84	34	0,40	CG13917
152654_at	102	94	100	56	32	49	0,001	99	46	0,46	CG15279
152664_at	28	29	31	7	9	9	3E-05	29	8	0,27	CG6059
152705_at	102	89	104	48	49	49	0,0002	99	49	0,49	Ark
152784_at	75	93	100	29	32	35	0,0008	90	32	0,36	CG6656
152798_at	61	74	82	18	20	11	0,0006	72	16	0,23	Cyp12c1
152804_at	52	70	36	9	12	25	0,0138	53	15	0,29	Est6
152848_at	507	503	537	264	235	210	6E-05	516	236	0,46	CG1698
152867_at	16	14	11	6	5	6	0,0044	13	6	0,44	CG7180
152885_at	52	90	71	12	10	36	0,0101	71	19	0,27	CG17843
152929_at	33	44	29	22	9	10	0,0103	35	13	0,37	CG4288
152932_at	196	318	385	52	41	53	0,0052	300	49	0,16	e
152974_at	111	104	120	39	71	29	0,0041	112	46	0,41	Ace
153000_at	116	151	160	27	55	98	0,0141	142	60	0,42	CG12105
153068_at	47	23	40	10	5	5	0,0079	37	7	0,18	capa
153088_at	252	290	341	125	129	103	0,0015	294	119	0,40	pst
153122_at	188	219	235	96	94	108	0,0007	214	99	0,46	ade2
153197_at	418	277	371	122	113	209	0,0079	356	148	0,42	Eip75B
153287_at	211	293	340	127	114	169	0,0121	281	137	0,49	CG2924
153367_at	1189	1596	1850	49	71	131	0,0008	1545	84	0,05	Ect3
153368_at	1060	1205	1196	451	520	514	0,0001	1153	495	0,43	fat-spondin
153371_at	107	134	148	8	12	44	0,0014	130	21	0,16	CG3630
153373_at	1212	1030	1327	526	375	617	0,0018	1190	506	0,43	CG8036
153391_at	651	432	381	191	126	158	0,009	488	158	0,32	CG16884
153393_at	121	105	101	6	45	38	0,0021	109	30	0,27	st
153397_at	40	35	43	24	15	19	0,0028	39	19	0,50	CG8494
153425_at	734	760	869	275	243	433	0,0014	788	317	0,40	CG8501
153426_at	134	220	172	48	20	54	0,0038	175	41	0,23	CG14523
153582_at	509	464	496	132	146	211	0,0002	489	163	0,33	CG13101
153652_at	177	185	265	75	66	86	0,0049	209	76	0,36	CG8449
153668_at	107	61	84	50	31	41	0,0192	84	41	0,48	CG4022
153672_at	61	73	82	10	26	41	0,0066	72	26	0,35	CG3587

AFFY próba	WT1	WT2	WT3	M1	M2	M3I	P érték T teszt	WT átlag	M átlag	Átlag arány Mutáns/Vad	Gén
153861_at	23	17	23	3	7	5	0,0015	21	5	0,24	CG6985
154027_at	44	31	25	15	9	12	0,0104	33	12	0,36	CG9114
154068_at	48	52	37	18	14	23	0,0029	46	19	0,41	CG9300
154082_at	64	66	57	15	18	30	0,0008	62	21	0,34	DsimHmr
154097_at	91	61	103	15	20	14	0,0028	85	16	0,19	chrb
154222_at	58	53	57	26	12	17	0,0005	56	19	0,33	CG1109
154266_at	98	94	112	24	27	27	8E-05	101	26	0,26	Ada2b
154273_at	505	578	632	237	276	280	0,0007	572	264	0,46	HmgD
154285_at	279	308	284	129	136	144	5E-05	290	136	0,47	CG5522
154318_at	45	94	75	16	24	34	0,0189	71	25	0,35	Cyp6a13
154391_at	642	722	530	272	293	247	0,0016	631	271	0,43	CG7777
154392_at	28	41	31	11	18	14	0,0067	34	15	0,44	CG6005
154466_at	301	273	420	139	170	152	0,0091	331	154	0,46	myoglianin
154485_at	476	497	467	193	228	273	0,0003	480	231	0,48	kel
154549_at	84	47	68	38	14	27	0,0176	66	26	0,40	CG14896
154582_at	73	70	78	36	20	41	0,0016	74	32	0,44	msi
154615_at	32	25	38	20	9	15	0,0117	32	14	0,45	CG3430
154661_at	218	250	289	60	114	94	0,0016	252	89	0,35	mdy
154691_at	223	195	303	59	70	90	0,0038	240	73	0,30	CG3502
154842_at	18	26	31	5	14	4	0,0123	25	8	0,31	CG3221
154850_at	943	1006	975	217	209	351	7E-05	975	259	0,27	CG8483
154866_at	70	57	59	34	33	25	0,0016	62	31	0,49	asp
154889_at	109	132	132	47	44	96	0,0139	124	62	0,50	Pli
155060_at	245	244	279	27	54	67	0,0001	256	50	0,19	CG8223

A microarray kísérletben Ada2b hiányában növekedett expressziójú gének listája és expressziós változása.

AFFY próba	WT1	WT2	WT3	M1	M2	M3I	P érték T teszt	WT átlag	M átlag	Átlag arány Mutáns/Vad	Gén
141299_at	19,1	41,8	30	57,9	76,5	49,5	0,0199	30,3	61,3	2,0231	CG12104
141306_at	30,1	50,4	51,3	210,7	193,1	191,5	4E-05	43,933	198,43	4,5167	CG5431
141338_at	161,5	114,9	114	320,8	356,8	206,8	0,0131	130,13	294,8	2,2654	CG1342
141375_at	351,1	249,9	206,9	1146	659,2	894	0,0064	269,3	899,73	3,341	CG5656
141384_at	3485	2551	1257	6551	4594	4539	0,0195	2431,1	5228,1	2,1505	CG12164
141406_at	37	27,1	39,5	83,8	131,7	77,3	0,0115	34,533	97,6	2,8263	CG8129
141440_at	1,5	2,9	13,2	23,7	18,9	21,1	0,0088	5,8667	21,233	3,6193	b
141441_at	18,8	12,7	16,3	76,9	111,7	119,4	0,0014	15,933	102,67	6,4435	CG8539
141449_at	6,2	4,9	4,1	179,9	190,4	85,1	0,0059	5,0667	151,8	29,961	CG33128
141469_at	9,5	10,3	18,4	263,2	252,2	184,9	0,0004	12,733	233,43	18,332	
141510_at	7,3	9	5,9	44,5	26,8	29,7	0,0046	7,4	33,667	4,5495	CG31801
141641_at	167,5	133,4	149	398,7	272,5	376,1	0,0038	149,97	349,1	2,3279	cher
141649_at	21,5	16,1	18,5	45,7	41	35,8	0,0012	18,7	40,833	2,1836	CG31110
141704_at	114,2	85,5	89,8	480,9	456,1	406,2	6E-05	96,5	447,73	4,6397	CG6214
141811_at	153,8	142,2	137,5	383,6	406,4	317,2	0,0006	144,5	369,07	2,5541	Psa

AFFY próba	WT1	WT2	WT3	M1	M2	M3I	P érték T teszt	WT átlag	M átlag	Átlag arány Mutáns/Vad	Gén
141964_at	1,8	2,6	2,3	5,6	6,7	4	0,0087	2,2333	5,4333	2,4328	
141976_at	10,5	20,2	16,5	31,3	37,6	33,3	0,0028	15,733	34,067	2,1653	
141996_at	26,4	9,4	8,9	148,9	158,2	139,5	4E-05	14,9	148,87	9,9911	
142117_at	7,6	10,8	1,4	18,7	16,3	15,7	0,012	6,6	16,9	2,5606	CG9754
142169_at	8,6	7,9	2,8	19,6	33,6	26	0,0054	6,4333	26,4	4,1036	CG4468
142193_at	18,1	10,9	9,6	52,9	24,4	46,9	0,0173	12,867	41,4	3,2176	pnt
142211_at	72,2	73,8	70,3	263,2	140,3	278,9	0,012	72,1	227,47	3,1549	CG15094
142212_at	186	141,2	90,1	641,6	368,2	553	0,0055	139,1	520,93	3,745	l(2)08717
142219_at	1174	1167	1253	3025	2674	2168	0,0024	1197,9	2622,4	2,1892	Ance-4
142236_at	103,6	137,8	66,7	451,8	403,5	373	0,0003	102,7	409,43	3,9867	CG11786
142248_at	97,1	117,4	96,8	253,1	206,3	187,8	0,0028	103,77	215,73	2,079	GLaz
142253_at	1,1	2,3	0,7	10,2	9	14,8	0,0028	1,3667	11,333	8,2927	CG10560
142288_at	6,3	6,8	5,5	11,8	13,9	12,6	0,0004	6,2	12,767	2,0591	CG18682
142293_at	94,7	109,9	99,8	336,3	268	272,6	0,0005	101,47	292,3	2,8807	kar
142324_at	104,5	87,8	74,4	156,7	180	199,8	0,002	88,9	178,83	2,0116	CG10618
142350_at	4,4	14,1	19,2	34,5	38,6	31,7	0,0047	12,567	34,933	2,7798	yellow-f2
142360_at	12,7	17	21,1	46,7	52,4	41,8	0,0008	16,933	46,967	2,7736	CG6704
142364_at	190,8	134,4	142,4	369,9	267,8	304,9	0,0051	155,87	314,2	2,0158	HBS1
142370_at	117,2	76,8	77,3	170,7	227,9	193,9	0,0037	90,433	197,5	2,1839	fus
142386_at	68,3	47,5	25,9	302,4	238,7	324,8	0,0005	47,233	288,63	6,1108	CG6484
142397_at	2	2,7	2	3,6	4,8	5,2	0,0063	2,2333	4,5333	2,0299	CG32833
142418_at	10,4	6,4	17,8	26,7	20,8	26,2	0,0137	11,533	24,567	2,1301	CG4641
142451_at	18,4	22,5	16,8	43,6	37,5	37,2	0,0008	19,233	39,433	2,0503	Su(Tpl)
142491_at	40,1	37,7	31,5	98,4	93,7	77	0,0008	36,433	89,7	2,462	CG11870
142492_at	20,1	27,2	30,5	81,2	83,8	55,6	0,0037	25,933	73,533	2,8355	Esp
142496_at	1,2	3,1	3,3	12,6	13,6	9,9	0,0009	2,5333	12,033	4,75	
142593_at	11,8	15,5	19,8	31,4	33,4	34,2	0,0011	15,7	33	2,1019	PTP-ER
142624_at	33,3	48,5	56,2	116,8	107,3	104,4	0,0006	46	109,5	2,3804	CG18542
142720_at	17,6	7,2	17,5	33,6	45,1	32,9	0,0058	14,1	37,2	2,6383	CG11660
142741_at	87,8	48,3	67,5	457,5	271,3	221,9	0,0133	67,867	316,9	4,6694	CG30101
142742_at	540,7	431,6	341,4	2241	1728	1367	0,0033	437,9	1778,6	4,0617	CG30101
142823_at	52,4	48,1	54,1	104,1	91	124	0,0025	51,533	106,37	2,064	rap
142868_at	12,2	5,5	4,5	51,2	62,2	37,3	0,0024	7,4	50,233	6,7883	CG6431
142902_at	4	6,6	9,8	23,8	39,3	45,5	0,0058	6,8	36,2	5,3235	CG12507
142930_at	14,1	8,6	8,2	31,9	27,3	26,1	0,0011	10,3	28,433	2,7605	CG7737
142950_at	16,2	4	19,4	145,2	128,4	126,2	5E-05	13,2	133,27	10,096	CG7953
142951_at	24,7	17,8	16	58,9	70,7	52,4	0,0012	19,5	60,667	3,1111	CG7916
142955_at	3,9	3,6	3	9,1	6,6	12,7	0,0145	3,5	9,4667	2,7048	CG5770
142959_at	2694	1922	1067	5071	3055	4791	0,0187	1894,4	4305,8	2,273	GCR(ich)
142962_at	13,6	2	10,2	33,4	30,6	31,8	0,0014	8,6	31,933	3,7132	CG6749
142969_at	518,7	629,2	682,5	1969	2227	2209	5E-05	610,13	2134,9	3,4991	Cys
143079_at	5,4	5,5	5	30,7	31,5	21,4	0,0011	5,3	27,867	5,2579	ase
143134_at	12,8	6,2	8,2	26,4	28,6	25,5	0,0006	9,0667	26,833	2,9596	Dsk
143147_at	79,1	148	121,1	193,8	274	363,6	0,0192	116,07	277,13	2,3877	Eip71CD
143181_at	1049	869,3	722,9	2182	1361	1774	0,0125	880,37	1772,4	2,0133	Gs2
143200_at	53,4	42,2	60	128,3	112,7	112,5	0,0004	51,867	117,83	2,2719	if
143222_at	85,4	59,8	47,3	280,7	206,8	165,8	0,0062	64,167	217,77	3,3938	Cyp303a1
143257_at	18,5	14,7	14,6	35,5	31,5	34,5	0,0003	15,933	33,833	2,1234	mei-W68
143276_at	1614	2402	2561	5828	5356	4693	0,0011	2192,5	5292,3	2,4139	MtnA
143299_at	1522	1540	1567	4067	3898	3652	2E-05	1542,8	3871,9	2,5096	Pepck

AFFY próba	WT1	WT2	WT3	M1	M2	M3I	P érték T teszt	WT átlag	M átlag	Átlag arány Mutáns/Vad	Gén
143309_at	4,9	2,3	1,8	13,5	8	7,3	0,0195	3	9,6	3,2	Poxn
143332_at	14,6	13	17,9	59,5	69,7	58,1	0,0001	15,167	62,433	4,1165	Sb
143346_at	52,8	46,4	42,5	130,2	191,4	138,8	0,0027	47,233	153,47	3,2491	Sgs3
143359_at	21,7	26,9	22,3	52,9	54,2	57	5E-05	23,633	54,7	2,3145	sog
143385_at	2,7	3,5	3,7	7,2	9,8	7,8	0,0021	3,3	8,2667	2,5051	Try
143401_at	4,4	3,9	2,3	21,8	25,9	13,3	0,0056	3,5333	20,333	5,7547	Uro
143464_f_at	2657	2809	2182	7808	6693	6991	0,0001	2549,4	7163,8	2,81	LysA
143466_f_at	2202	1881	1694	6590	5761	5566	0,0002	1925,8	5972,2	3,1011	LysS
143467_f_at	1303	1198	1038	5733	5243	4987	3E-05	1179,4	5321,1	4,5119	LysE
143534_at	42,7	46,1	56,7	147,9	80,2	113,2	0,0155	48,5	113,77	2,3457	Eip63F-1
143553_at	13,2	5,9	3,6	41,2	30,7	27,7	0,0035	7,5667	33,2	4,3877	Sox15
143605_at	1146	1379	1062	3027	3289	2992	7E-05	1195,5	3102,8	2,5955	Drs
143636_at	63	58,1	48,6	166,2	116	124,6	0,004	56,567	135,6	2,3972	dia
143673_at	1	2,6	3,4	9,5	7,1	6,4	0,0052	2,3333	7,6667	3,2857	Mst57Dc
143683_at	8,5	4,8	7,6	34,2	46,1	24,7	0,0056	6,9667	35	5,0239	byn
143754_at	9	6,4	10,1	21,8	19,8	18,3	0,0008	8,5	19,967	2,349	gcm
143768_at	4,4	1,2	4,6	18,6	8,3	12,4	0,0192	3,4	13,1	3,8529	Hr38
143790_at	28,9	50	39,8	70,6	101,4	91,2	0,0058	39,567	87,733	2,2174	Rala
143796_at	34,8	64,5	51,7	162,1	161,4	129,4	0,0009	50,333	150,97	2,9993	Try29F
143809_at	16,3	12,6	8,5	36,8	36,4	22,3	0,0107	12,467	31,833	2,5535	mbl
143817_at	7,5	2,7	3,9	14,5	14,9	12,3	0,0026	4,7	13,9	2,9574	tap
143926_at	9,7	4,9	5,3	27,7	15,6	18,7	0,0118	6,6333	20,667	3,1156	GluRIIB
143939_at	104,6	107,3	91,8	202	257	226,3	0,0008	101,23	228,43	2,2565	Lcp65Aa
143958_at	167,4	127	136,6	956,6	774,1	1326	0,0029	143,67	1019	7,093	Tsf1
144029_at	7,5	8	12,1	14,1	25,4	21,5	0,0185	9,2	20,333	2,2101	agt
144056_at	9,9	12,6	27,7	36,6	48,5	32,2	0,0193	16,733	39,1	2,3367	CG14780
144144_at	7,9	3,2	18,3	21,7	31,5	27,5	0,016	9,8	26,9	2,7449	Hus1-like
144150_at	304,2	207,2	352,3	663,2	650,9	608,3	0,0008	287,9	640,8	2,2258	tafazzin
144185_at	136,1	93,6	72,3	1333	1049	679	0,0042	100,67	1020	10,133	Osi6
144236_at	20,7	15,2	18,4	47,1	59,4	40,4	0,003	18,1	48,967	2,7053	A3-3
144370_at	2,6	2,7	2,7	4,3	5,8	7,8	0,0156	2,6667	5,9667	2,2375	CG11384
144378_at	130,1	112,2	107	234,1	289,5	217,8	0,0023	116,43	247,13	2,1225	CG11382
144417_at	4,7	4,3	3,2	6,9	12,4	8,6	0,0181	4,0667	9,3	2,2869	CG14417
144426_at	2,3	3,2	2,5	7,2	6,2	5,5	0,0015	2,6667	6,3	2,3625	CG14423
144521_at	404,1	444,7	325,5	3439	2317	3123	0,0008	391,43	2959,6	7,5608	CG15784
144570_at	114,9	72,4	52,7	290,9	255,9	163,9	0,0102	80	236,9	2,9613	CG5928
144578_at	4,4	7,2	4,1	12,5	10,6	12,1	0,0024	5,2333	11,733	2,242	Ca-1T
144660_at	1,1	1,4	1	2,8	5,9	3,7	0,0165	1,1667	4,1333	3,5429	CG15324
144676_at	3,2	2,4	1,2	6,5	8,4	5,1	0,0085	2,2667	6,6667	2,9412	CG2256
144690_at	3,1	1,2	3,6	10,4	22,5	17,1	0,0086	2,6333	16,667	6,3291	sdt
144703_at	8,3	13,6	5,6	33,1	36,1	31,7	0,0004	9,1667	33,633	3,6691	CG15349
144716_at	21	12,2	9,7	47	31,5	28,6	0,0163	14,3	35,7	2,4965	CG10648
144772_at	35	34,5	22,3	71,5	112,8	70,8	0,0099	30,6	85,033	2,7789	CG15249
144793_at	36,2	28,5	40,7	86,3	126,6	95,9	0,0029	35,133	102,93	2,9298	CG15307
144794_at	67,9	70,8	71,4	197,1	145,6	175,1	0,0012	70,033	172,6	2,4645	CG12641
144818_at	1,3	3	10,2	11,9	19,7	22,2	0,0169	4,8333	17,933	3,7103	CG9806
144819_at	2,1	1,9	2,3	10,6	14,1	14,3	0,0004	2,1	13	6,1905	CG2111
144824_at	119,7	83,9	87	215,9	191	214	0,0007	96,867	206,97	2,1366	CG1826
144843_at	2,1	2,4	0,9	13,9	18,3	11,9	0,0013	1,8	14,7	8,1667	CG1545
144851_at	1146	1351	1313	3729	2783	4145	0,0025	1269,9	3552,2	2,7972	CG15199
144860_at	7,2	11,1	5,3	19,4	18	14,5	0,0068	7,8667	17,3	2,1992	CG12624

AFFY próba	WT1	WT2	WT3	M1	M2	M3I	P érték T teszt	WT átlag	M átlag	Átlag arány Mutáns/Vad	Gén
144918_at	23	23,2	31,4	100,2	68,9	85,5	0,0017	25,867	84,867	3,2809	CG32656
144952_at	20,1	23	26,8	50,6	61,4	36,8	0,0117	23,3	49,6	2,1288	CG11085
144956_i_at	2	1,9	1,8	2,9	5,2	5,1	0,0147	1,9	4,4	2,3158	
144986_at	124,4	95,9	77,5	274,3	171,3	189,3	0,0157	99,267	211,63	2,132	rad
145014_at	74,4	71,2	68,1	181,2	193,5	168	7E-05	71,233	180,9	2,5395	CG15756
145048_at	219,4	217,6	177,1	556	529,1	456,3	0,0004	204,7	513,8	2,51	CG12481
145053_at	3,9	11,4	11,7	33,3	23	20,1	0,0128	9	25,467	2,8296	I(1)G0469
145054_at	30,1	14,1	24,7	55,7	58,3	48,9	0,0023	22,967	54,3	2,3643	I(1)G0469
145085_at	14,4	7,3	0,9	25,7	30,7	22	0,008	7,5333	26,133	3,469	CG9518
145087_at	4	1,8	0,9	31,8	19,2	23,1	0,0021	2,2333	24,7	11,06	CG9514
145088_at	40,6	39,1	39,5	91,8	130	140,2	0,0027	39,733	120,67	3,0369	CG14406
145149_at	2,2	2,7	6,2	14,6	7,3	12,6	0,0181	3,7	11,5	3,1081	CG8260
145275_at	2,8	7,3	10,6	13,8	14,1	17,9	0,0165	6,9	15,267	2,2126	CG15373
145293_at	9	5,1	14,3	37,7	37,8	22,6	0,0076	9,4667	32,7	3,4542	CG15061
145306_at	2,5	3,4	3	5,4	9,3	6	0,0169	2,9667	6,9	2,3258	CG15044
145348_at	2	7,7	9,4	25,7	28,7	20,4	0,0025	6,3667	24,933	3,9162	RhoGAP18B
145357_at	4,2	3,6	3,9	8,3	8,5	7,1	0,0005	3,9	7,9667	2,0427	
145358_at	5,4	7,2	7,3	11,1	19,2	22,4	0,0165	6,6333	17,567	2,6482	CG7876
145371_at	18,9	15,6	12,3	31,7	32,5	34,4	0,0006	15,6	32,867	2,1068	CG7884
145391_at	6,8	16,6	14,3	25	30,2	22,5	0,0116	12,567	25,9	2,061	CG12231
145431_at	270,5	261	350,2	1409	1150	1097	0,0004	293,9	1218,7	4,1465	CG12531
145477_at	1,9	3	2,7	6,9	5,1	5,1	0,0049	2,5333	5,7	2,25	CG1702
145519_at	0,7	0,6	1	2,1	2,2	1,8	0,0009	0,7667	2,0333	2,6522	CG12564
145529_at	3,1	3,3	3,5	12,1	7,4	11,6	0,0046	3,3	10,367	3,1414	kis
145608_at	3	1,9	5,2	6,8	6,2	7,2	0,0146	3,3667	6,7333	2	CG13692
145616_at	6	6,5	6	35,8	29,2	33,9	8E-05	6,1667	32,967	5,3459	CG15358
145680_at	116	101,1	104,1	277,5	288	286,2	3E-06	107,07	283,9	2,6516	lectin-22C
145681_at	184,6	198,4	199,9	424,9	505,6	430,2	0,0003	194,3	453,57	2,3344	CG31694
145722_at	0,8	2,1	2,1	2,9	3,6	4,3	0,0155	1,6667	3,6	2,16	CG31694
145759_at	29,5	16,2	23,4	46,1	55,7	44,9	0,0037	23,033	48,9	2,123	CG8853
145768_at	1,6	2	1	3,7	5,1	3,9	0,0034	1,5333	4,2333	2,7609	CG15432
145781_at	3,9	4,4	2,5	8,1	14,1	10,4	0,0084	3,6	10,867	3,0185	CG15627
145844_at	185	161,9	129,6	307,3	328,1	353,2	0,0006	158,83	329,53	2,0747	CG11147
145866_at	9,8	21,2	8,9	49,8	51,7	29,1	0,0107	13,3	43,533	3,2732	CG13995
145881_at	9,7	12,6	11,2	46,8	44,3	27,9	0,0044	11,167	39,667	3,5522	CG9486
145893_at	0,9	1,8	4,7	11,5	11,9	11,1	0,0008	2,4667	11,5	4,6622	CG9500
145964_at	7	5,7	8,6	20,2	30,2	28	0,0019	7,1	26,133	3,6808	CG13791
145997_at	3,4	8,9	7	30,1	49,8	39,4	0,0024	6,4333	39,767	6,1813	snoN
146060_at	937,8	944	821,7	2184	1995	1925	0,0001	901,17	2034,7	2,2579	CG9568
146080_at	17,9	2,6	13,1	33,6	38,5	22	0,0194	11,2	31,367	2,8006	CG3748
146086_at	2,9	4,9	2	6,5	7,6	9,8	0,0111	3,2667	7,9667	2,4388	CG3759
146121_at	3,6	3,1	5,7	12,8	11,4	7,9	0,0084	4,1333	10,7	2,5887	CG13133
146178_at	102,3	59,8	48,7	242,7	175,4	184,8	0,004	70,267	200,97	2,8601	CG31871
146194_at	0,9	1,3	1	2,5	3,1	3,6	0,0021	1,0667	3,0667	2,875	CG18561
146223_at	2,1	8,8	13,5	24,5	19,7	21	0,0098	8,1333	21,733	2,6721	CG14914
146225_at	8,3	17,3	9,2	25,3	41,2	26,4	0,015	11,6	30,967	2,6695	Ast-C
146272_at	7,5	37,3	31	51,5	64,7	56,4	0,0153	25,267	57,533	2,277	CG16996
146273_at	10	27,2	26,6	44,1	59,4	54,1	0,0061	21,267	52,533	2,4702	CG16997

AFFY próba	WT1	WT2	WT3	M1	M2	M3I	P érték T teszt	WT átlag	M átlag	Átlag arány Mutáns/Vad	Gén
146310_at	11,3	13,3	7,3	19,7	29,4	21,5	0,0102	10,633	23,533	2,2132	CG5122
146318_at	4,3	15,3	3,1	26,5	37,8	24,6	0,0088	7,5667	29,633	3,9163	CG15480
146338_at	1,6	1	1,8	7,8	5,8	6,9	0,0005	1,4667	6,8333	4,6591	CG16956
146362_at	51,6	46,2	30,5	162,7	169,4	160,5	3E-05	42,767	164,2	3,8394	CG13258
146384_at	160,2	160,2	91,8	509	495,8	491,9	5E-05	137,4	498,9	3,631	CG13282
146405_at	484,3	335	497,6	1104	799,7	1175	0,0048	438,97	1026,2	2,3377	CG6639
146429_at	4,9	1,3	3	22,6	32,8	24,5	0,001	3,0667	26,633	8,6848	CG15155
146503_at	382,4	200,9	303,3	688,7	583,8	573,3	0,0038	295,53	615,27	2,0819	TepIV
146592_at	2,5	13	8	31,1	49,8	24,8	0,0138	7,8333	35,233	4,4979	nompB
146756_at	25,2	29,8	16,1	70,4	76,4	38,5	0,0188	23,7	61,767	2,6062	CG2070
146813_at	3,2	5,7	7,3	13,7	11,4	8,8	0,0167	5,4	11,3	2,0926	CG14754
146821_at	14,2	6	20,3	24,9	30,3	27	0,0175	13,5	27,4	2,0296	rgr
146920_at	3,1	10,7	2,9	22,2	26	13,3	0,0153	5,5667	20,5	3,6826	CG12920
146931_at	4,2	10,6	11,9	32,7	22,4	26,2	0,0045	8,9	27,1	3,0449	CG12913
146949_at	22	28,8	17,2	40,4	49,5	51,5	0,0035	22,667	47,133	2,0794	Cyp49a1
146990_at	2,6	4,2	4,5	42,3	39,8	24,3	0,0025	3,7667	35,467	9,4159	CG13215
146996_at	162,6	150,8	126,5	448,7	293,1	484,3	0,0059	146,63	408,7	2,7872	CG13224
147000_at	40,9	24,6	25,2	88,2	80,1	106	0,0014	30,233	91,433	3,0243	CG13222
147013_at	1	1	1,9	3	4,4	2,5	0,0179	1,3	3,3	2,5385	sha
147014_at	10,9	17,7	12,8	36,6	35,3	25,8	0,0045	13,8	32,567	2,3599	Try
147030_at	2,6	2,2	4,2	7,9	12,9	8,9	0,0069	3	9,9	3,3	CG30035
147042_at	2545	2096	2060	5964	4599	4604	0,0021	2233,8	5055,8	2,2633	CG8986
147118_at	1,2	1,5	1,2	3,3	5	2,9	0,0101	1,3	3,7333	2,8718	CG12374
147119_at	1,2	2,3	3,6	11,3	4,9	9,9	0,0186	2,3667	8,7	3,6761	Cyp9h1
147126_i_at	29,5	19,7	27,1	293,2	251,5	172	0,002	25,433	238,9	9,3932	CG13324
147127_s_at	83,9	108,7	93,3	778,7	545,2	460,9	0,0032	95,3	594,93	6,2427	CG13324
147128_r_at	22,9	25,6	26,3	77,9	94,2	51	0,0087	24,933	74,367	2,9826	CG13324
147141_at	16,1	5,1	14,5	24	33,4	26,6	0,011	11,9	28	2,3529	CG17042
147167_at	4,9	4,7	4,6	22,7	25,9	18,8	0,0005	4,7333	22,467	4,7465	CG6280
147195_at	241	239,9	247	1919	1817	2488	0,0005	242,63	2074,6	8,5502	CG12505
147197_at	2,4	1,5	2,7	16,6	27,3	28	0,0021	2,2	23,967	10,894	CG13941
147210_at	64,1	73,4	75,2	511,3	701,1	490,5	0,0009	70,9	567,63	8,0061	CG12868
147288_at	2,5	2,2	4	7,4	8,5	6,1	0,0038	2,9	7,3333	2,5287	CG15701
147316_at	16,2	2,5	8,2	21,7	35,1	26,5	0,014	8,9667	27,767	3,0967	DAT
147319_at	383,9	351,1	284,8	1087	970,7	1006	6E-05	339,93	1021	3,0036	CG8317
147321_at	57,4	42,6	44,2	154,2	117,9	96,7	0,0063	48,067	122,93	2,5576	CG5065
147326_at	1,3	1,8	1,8	3,2	5,4	4,1	0,0085	1,6333	4,2333	2,5918	CG15617
147372_at	15,8	5,2	16,3	28	36,5	23,5	0,0162	12,433	29,333	2,3592	l(2)k07433
147443_at	23,3	20,8	3,9	34,6	45,5	34,9	0,0171	16	38,333	2,3958	CG5226
147515_at	13,2	8,2	7,5	17,9	23,7	22,2	0,0048	9,6333	21,267	2,2076	
147565_at	23	29,6	35,2	59,7	91	80,4	0,0042	29,267	77,033	2,6321	DpseGA10804
147608_at	10,3	19,1	12,5	37,8	49,3	41,2	0,0013	13,967	42,767	3,0621	CG4302
147620_at	10	10,2	12,2	20,3	31,2	20,3	0,0119	10,8	23,933	2,216	CG9822
147631_at	12,9	16,2	9,2	34,3	35,8	33,2	0,0003	12,767	34,433	2,6971	CG15678
147694_at	22,5	33	21	108,2	83	89,8	0,0006	25,5	93,667	3,6732	Cyp6d2
147699_at	181,6	218,8	258,4	1247	1392	941	0,001	219,6	1193,5	5,4347	CG4250
147707_at	0,8	1,2	1	2	2,3	2,5	0,0012	1	2,2667	2,2667	Obp58d
147839_at	87,1	48,4	62,4	144,1	111,7	157,6	0,0077	65,967	137,8	2,0889	CG16786
147892_at	28,7	22,2	27,5	37,4	66,5	55,7	0,0181	26,133	53,2	2,0357	CG12849

AFFY próba	WT1	WT2	WT3	M1	M2	M3I	P érték T teszt	WT átlag	M átlag	Átlag arány Mutáns/Vad	Gén
147951_at	59,2	52,7	64,6	470,6	373,2	331,5	0,0006	58,833	391,77	6,6589	CG13905
147959_at	36,2	104,9	74,3	200,7	172,3	205,1	0,0028	71,8	192,7	2,6838	CG13912
147980_at	121,2	65,4	62,7	218,5	337,8	205	0,0105	83,1	253,77	3,0538	robl62A
148023_at	13,1	11,1	8,4	25,5	31,4	17,2	0,0166	10,867	24,7	2,273	zormin
148056_at	231,4	224,4	180,3	435,4	402,4	507,8	0,0013	212,03	448,53	2,1154	CG14949
148057_at	145,8	128,8	92,9	530,3	328,4	376,8	0,005	122,5	411,83	3,3619	CG1143
148063_at	17,6	7,3	11,1	38,7	23,9	27,3	0,0145	12	29,967	2,4972	CG16976
148068_at	36,4	7,9	10,7	62	43,2	61,8	0,0137	18,333	55,667	3,0364	CG14952
148069_at	12,3	7,1	6	16,6	24,7	19,2	0,0095	8,4667	20,167	2,3819	CG9973
148084_at	365,4	371,5	372,9	1412	1067	1186	0,0006	369,93	1221,4	3,3018	CG14963
148087_at	0,8	0,9	0,5	1,4	1,4	1,7	0,004	0,7333	1,5	2,0455	CG14957
148090_at	10,3	5,1	22,3	42,5	39,6	54,5	0,0043	12,567	45,533	3,6233	gry
148103_at	1149	1437	1581	4487	4803	4271	5E-05	1389,1	4520	3,254	dro5
148105_at	26,3	8,4	6,3	72,6	89,7	34,9	0,0201	13,667	65,733	4,8098	CG14961
148137_at	127,8	110,2	78,1	213,8	291,8	186,5	0,0113	105,37	230,7	2,1895	CG14985
148155_at	236,6	191,8	137,8	1161	1196	713,8	0,0031	188,73	1023,6	5,4233	CG15007
148167_at	53,9	55,6	48,7	279,2	237,7	200,1	0,0006	52,733	239	4,5322	dyl
148171_at	55	67,4	60,6	124,8	121,3	136	0,0002	61	127,37	2,088	CG33514
148174_at	16,6	25,3	14,3	36,6	46	35,9	0,0056	18,733	39,5	2,1085	CG15020
148247_at	5,1	2	1	7,5	11,4	11,3	0,0072	2,7	10,067	3,7284	CG13291
148252_at	9,6	16,4	11	26,4	27,5	24,1	0,002	12,333	26	2,1081	CG6462
148254_at	22,6	29,3	21,6	61,2	75,8	45,4	0,0082	24,5	60,8	2,4816	Jon65Aii
148255_at	44,4	71,9	47,3	563,7	631,2	436,4	0,0005	54,533	543,77	9,9713	Jon65Ai
148259_at	266,6	234,9	187,2	3182	2647	2914	3E-05	229,57	2914,5	12,696	CG6602
148289_at	7,3	6	2,7	13,9	14,8	26,8	0,0198	5,3333	18,5	3,4688	CG14820
148308_f_at	6,6	6,9	5,8	19,3	13	14,4	0,0046	6,4333	15,567	2,4197	CG8629
148354_at	0,9	0,4	1,1	3,3	3,3	1,8	0,0105	0,8	2,8	3,5	SP2523
148355_at	14,9	20,4	9,9	37,8	29,9	38,2	0,0038	15,067	35,3	2,3429	CG7457
148373_at	8,5	4	6,4	13,1	17,1	13	0,0062	6,3	14,4	2,2857	CG7504
148416_at	113,3	64,6	36,9	678,9	394,2	387,3	0,0068	71,6	486,8	6,7989	CG32029
148417_at	123,1	87,7	70,4	666,9	410,3	382,8	0,0064	93,733	486,67	5,192	CG32029
148418_at	6,2	6,5	4,5	21,4	29,7	13,4	0,0147	5,7333	21,5	3,75	CG13305
148431_at	214,1	174,7	198,7	486,5	339,5	441,4	0,0036	195,83	422,47	2,1573	Tsp66E
148432_at	10,8	10,9	4,1	30,6	45,7	21,6	0,0156	8,6	32,633	3,7946	CG13313
148465_at	5	5,4	6,3	16,2	24,4	16,2	0,0042	5,5667	18,933	3,4012	CG3448
148479_at	482,7	609,7	390	1603	1392	1429	0,0002	494,13	1474,4	2,9838	CG18179
148492_at	18,9	28,6	21	45,3	53	45,8	0,0014	22,833	48,033	2,1036	llp3
148498_at	6,9	15,1	5,1	69,5	39,6	33,8	0,0141	9,0333	47,633	5,2731	CG14165
148503_at	8,7	6,1	2,3	24,1	23,4	13,2	0,0109	5,7	20,233	3,5497	CG14163
148514_at	15,5	2,8	2,8	26,1	24,5	20,1	0,0114	7,0333	23,567	3,3507	CG8065
148541_at	324,2	310,6	141,4	735,6	692,1	669,6	0,001	258,73	699,1	2,702	CG14147
148563_at	14,6	9,6	12,7	34,6	29,8	40,2	0,0013	12,3	34,867	2,8347	CG14142
148590_at	275,9	196,1	149,6	581,5	402,3	453,3	0,0069	207,2	479,03	2,3119	CG32091
148657_at	4,9	7	9,3	15,7	18,6	14,8	0,0028	7,0667	16,367	2,316	CG14122
148661_at	32,2	34,7	43	56,8	81,8	93,3	0,0113	36,633	77,3	2,1101	CG10660
148756_at	3,4	3,5	3,2	5,3	7,9	8,6	0,009	3,3667	7,2667	2,1584	HGTX
148866_at	111,4	97,5	98,5	245,8	254,1	183,4	0,0027	102,47	227,77	2,2228	CG13048
148885_at	1359	1006	1085	3122	2036	2397	0,0077	1150,2	2518,1	2,1892	CG4998
148969_at	22,4	24,4	13,9	46,9	38,8	41,7	0,0026	20,233	42,467	2,0988	Ccn
149081_at	9,8	14,8	14,7	31,3	21,6	29	0,0067	13,1	27,3	2,084	CG17732
149193_at	3,8	2,4	6,8	8,4	12,1	14,7	0,015	4,3333	11,733	2,7077	S1P

AFFY próba	WT1	WT2	WT3	M1	M2	M3I	P érték T teszt	WT átlag	M átlag	Átlag arány Mutáns/Vad	Gén
149329_at	150,4	135,6	147	388,3	277,1	249,4	0,0099	144,33	304,93	2,1127	CG2663
149376_at	320,5	245,8	181,2	1872	1342	1256	0,0016	249,17	1490,1	5,9805	Osi2
149381_at	29,7	24	22,4	99,3	142,5	57,9	0,0192	25,367	99,9	3,9382	Osi8
149382_at	189,5	173,3	151,7	1164	1093	875,7	0,0003	171,5	1044,1	6,0882	Osi9
149389_at	86,3	96,3	60,8	294,9	336	237,2	0,0012	81,133	289,37	3,5666	Osi15
149390_at	2,2	3,4	2,2	9,5	7,3	7,9	0,0009	2,6	8,2333	3,1667	Osi16
149402_at	41,4	30,7	38,1	78,7	75,4	78,3	0,0001	36,733	77,467	2,1089	CG15186
149441_at	0,9	0,8	0,7	3,1	1,7	1,8	0,0185	0,8	2,2	2,75	CG10029
149510_at	3	4,9	4,1	7,7	11,3	7,2	0,014	4	8,7333	2,1833	CG8007
149553_at	2,3	8,9	14,1	22	34,1	25,1	0,0101	8,4333	27,067	3,2095	Or85f
149588_at	3,3	9,4	10,9	28,1	20	22,7	0,0046	7,8667	23,6	3	CG8500
149589_at	36,8	39,5	23,9	92,4	74,6	61,1	0,0071	33,4	76,033	2,2764	CG12945
149618_at	66,3	63,5	53,8	175,6	114,5	120,1	0,0095	61,2	136,73	2,2342	l(3)IX-14
149627_at	23,2	15	9,7	31,1	38,4	34,6	0,0068	15,967	34,7	2,1733	CG11872
149642_at	11,1	19,9	15,7	32,8	47,5	28,7	0,0146	15,567	36,333	2,334	MED7
149701_at	10,4	16,2	16,5	48,1	80,8	57,5	0,0043	14,367	62,133	4,3248	CG6908
149738_r_at	58,4	61,2	49,4	189,7	160,8	110,3	0,0072	56,333	153,6	2,7266	
149756_at	35,5	42,4	32,1	84,2	85,3	70,5	0,0008	36,667	80	2,1818	GstD2
149761_at	5,3	7,5	5,9	20,7	42,2	21,5	0,0181	6,2333	28,133	4,5134	GstD7
149775_at	5,3	4,8	6,6	15,4	12,7	14,1	0,0004	5,5667	14,067	2,5269	Sas
149789_at	1,7	3,6	2,7	12,1	8,3	9,9	0,0019	2,6667	10,1	3,7875	CG11600
149806_at	3,1	1,6	3,5	12,7	10,7	10,1	0,0005	2,7333	11,167	4,0854	beat-Vb
149838_at	286,8	305,1	369,2	1153	821,9	1155	0,0016	320,37	1043,3	3,2565	CG14375
149867_at	134,1	126	119,4	326,1	245,3	248,8	0,0027	126,5	273,4	2,1613	CG12537
149878_at	9,4	15,6	18,8	34,8	34,1	31,6	0,0015	14,6	33,5	2,2945	Kif19A
149913_at	13,3	8,9	19,3	43,6	35,9	37,8	0,0013	13,833	39,1	2,8265	CG7552
149948_at	32,5	34,6	27,9	139,2	100,5	77,3	0,0076	31,667	105,67	3,3368	CG14866
149958_at	8,6	11,8	12,2	23,4	35,4	22,8	0,0093	10,867	27,2	2,5031	CG6118
149962_at	10,4	3,8	8,1	19,9	30,8	18,1	0,0123	7,4333	22,933	3,0852	CG14871
149993_at	1,6	2,7	1,7	4,3	4,1	5,6	0,0052	2	4,6667	2,3333	CG17631
150005_at	2,4	1,7	3,2	7,2	5,1	9,7	0,0124	2,4333	7,3333	3,0137	CG17929
150006_at	3,1	4,6	4,6	7,9	11,2	16,3	0,0183	4,1	11,8	2,878	CG10309
150032_at	3,4	1,4	2,1	5,2	5,3	5,6	0,0034	2,3	5,3667	2,3333	CG14893
150054_at	45,3	54,1	35,8	109,1	92,2	71,2	0,0099	45,067	90,833	2,0155	CG5255
150060_at	78,4	71,7	83,2	150,5	220,1	160,7	0,0053	77,767	177,1	2,2773	CG4090
150061_at	4	5	4,9	17,7	10,1	10,2	0,017	4,6333	12,667	2,7338	beat-IIb
150086_at	315,8	170,7	137,3	1362	855,9	962,5	0,0032	207,93	1060,1	5,0981	CG14327
150127_at	54,5	43,2	48,1	126,8	100,7	113,3	0,0007	48,6	113,6	2,3374	CG7142
150149_at	40,9	20,4	17,8	73,4	61,9	55,6	0,0071	26,367	63,633	2,4134	CG14304
150161_at	121,3	180,7	151,2	343,8	436,4	569,5	0,0058	151,07	449,9	2,9782	CG14302
150214_at	8,2	10,4	14	53,7	41,1	32,2	0,0041	10,867	42,333	3,8957	CG7432
150227_at	10,6	6,9	2,9	41,9	32,5	24,6	0,0044	6,8	33	4,8529	CG4733
150233_at	11,9	24,9	12,4	82,3	74,5	73,3	0,0001	16,4	76,7	4,6768	CG4783
150245_at	20,6	17,5	6,7	56,4	40,4	30,7	0,0163	14,933	42,5	2,846	CG31209
150289_at	472,2	442,2	495,4	1762	1771	1206	0,002	469,93	1579,8	3,3617	CG5697
150295_at	30,5	16,2	23,4	45,8	56,5	55,2	0,0027	23,367	52,5	2,2468	CG7044
150306_at	16,5	11,1	12,7	28,4	34,1	30,8	0,0008	13,433	31,1	2,3151	CG5892
150319_at	78,4	55,9	53,5	151	125,6	175	0,0029	62,6	150,53	2,4047	CG15497
150344_at	10,3	3,4	2,3	23,1	25,9	14,6	0,0099	5,3333	21,2	3,975	CG13407
150361_at	1,3	3	2,1	7,1	7,9	5,4	0,0031	2,1333	6,8	3,1875	CG13856
150368_at	27,7	17,8	21,4	62,7	39,7	46,3	0,0107	22,3	49,567	2,2227	CG13845

AFFY próba	WT1	WT2	WT3	M1	M2	M3I	P érték T teszt	WT átlag	M átlag	Átlag arány Mutáns/Vad	Gén
150386_at	26,9	17,9	6	59,2	95,2	52,5	0,0117	16,933	68,967	4,0728	loco
150401_at	38,9	40,3	36,3	72,4	123	80	0,014	38,5	91,8	2,3844	CG13840
150411_at	8,3	2,6	2,1	13,2	32,6	33,5	0,0165	4,3333	26,433	6,1	CG6688
150430_at	1,3	1,6	4,2	6,6	6,5	9,8	0,0104	2,3667	7,6333	3,2254	CG13836
150434_at	6,5	19,9	21,6	32,9	40,3	31,2	0,0137	16	34,8	2,175	CG4467
150453_at	2	2,7	0,9	4	3,8	6,2	0,0198	1,8667	4,6667	2,5	CG10168
150474_at	644,1	542,7	402,2	1628	1136	1216	0,0045	529,67	1326,6	2,5047	CG12268
150522_at	15,9	8,5	23,8	30,5	48,7	42,9	0,012	16,067	40,7	2,5332	CG13632
150538_at	3,3	5,8	8,9	18	15,9	12,6	0,0068	6	15,5	2,5833	CG10845
150575_at	1,5	1,5	1	4,3	3,8	2,2	0,0163	1,3333	3,4333	2,575	CG11878
150599_at	4,4	16,1	12,2	22,4	30,3	28,6	0,0091	10,9	27,1	2,4862	Lgr3
150638_at	3,7	4,9	3	10,1	7,1	9,7	0,0048	3,8667	8,9667	2,319	CG8968
150653_at	4,4	3,6	2,5	12,8	7,7	13,4	0,0073	3,5	11,3	3,2286	CG6069
150734_at	8,6	7	12,3	22,4	17,5	26,7	0,007	9,3	22,2	2,3871	CG5402
150748_at	9,2	3,4	2,9	12,2	13,6	12,3	0,011	5,1667	12,7	2,4581	CG12877
150819_at	5,9	4,5	3,3	25,8	15,8	24,6	0,0028	4,5667	22,067	4,8321	CG14506
150825_at	73,6	74,7	71,4	158,1	187,2	176,4	0,0001	73,233	173,9	2,3746	CG7567
150831_at	644,4	740,3	784,6	1771	1330	1805	0,0023	723,1	1635,1	2,2612	Obp99a
150855_at	4,1	8,8	10,9	28,1	29	24	0,0008	7,9333	27,033	3,4076	CG15517
150856_at	7,7	19,9	24	34,4	47,8	40,3	0,0097	17,2	40,833	2,374	CG15515
150888_at	1,6	2,6	3,1	5,5	6	4	0,0107	2,4333	5,1667	2,1233	CG15534
150895_at	18,3	16,9	21	39	58,2	43,8	0,0043	18,733	47	2,5089	PH4SG1
150903_at	630,4	469,9	368	1212	771,4	1042	0,0127	489,43	1008,5	2,0605	CG9717
150918_at	22,2	38,7	36,6	68,3	66,9	91,2	0,0052	32,5	75,467	2,3221	CG15550
150943_at	515,1	436,1	262,5	1525	1461	782	0,0134	404,57	1256	3,1046	lox
150953_at	33,1	39,9	31,5	138,1	103,5	78,7	0,0072	34,833	106,77	3,0651	CG11550
150984_at	4,1	3,3	4,8	10,1	19,3	13,5	0,0099	4,0667	14,3	3,5164	CG1732
151009_at	21,8	20,5	3,1	33,3	44,7	37	0,0141	15,133	38,333	2,533	CG10928
151027_at	3,7	8	3,1	41	60,8	44,3	0,0011	4,9333	48,7	9,8716	CG31410
151076_at	0,4	0,7	0,5	2,5	1,8	2,5	0,0011	0,5333	2,2667	4,25	CG13841
151112_s_at	16,6	15	2,2	129,8	101	105,5	0,0003	11,267	112,1	9,9497	
151195_i_at	1021	1124	1084	2449	2961	2958	0,0003	1076,4	2789,4	2,5914	CG15353
151196_r_at	669,1	835,7	654	1435	1942	1781	0,0017	719,6	1719,5	2,3895	CG15353
151219_at	23,2	33,5	33,2	108,2	83,6	55,4	0,0142	29,967	82,4	2,7497	CG15919
151220_at	2,2	2,5	4,1	14,6	12,5	12	0,0003	2,9333	13,033	4,4432	
151227_f_at	11,9	8,1	9	25,6	24,6	15,2	0,0129	9,6667	21,8	2,2552	Sox15
151242_at	0,9	1,8	0,9	2,5	2	2,8	0,0158	1,2	2,4333	2,0278	
151246_at	9,5	14,4	10,5	80,9	71,5	40,5	0,0063	11,467	64,3	5,6076	CG12899
151247_at	39,8	37	24,6	78,6	72,8	74,4	0,0006	33,8	75,267	2,2268	
151265_at	18,5	23,3	22,2	105,6	101,2	77,9	0,0005	21,333	94,9	4,4484	CG13038
151293_f_at	29,7	54,8	32,7	141,1	85,9	99,6	0,0096	39,067	108,87	2,7867	CG33271
151294_at	2,3	1,8	2,4	4,3	4,3	5,2	0,0012	2,1667	4,6	2,1231	CG32070
151310_at	52,6	19,2	35,8	277	208,3	167,4	0,0028	35,867	217,57	6,066	CG8620
151372_at	9,1	24,7	7,4	45,1	66,5	35,6	0,0148	13,733	49,067	3,5728	
151404_at	49,6	29,6	31,1	99,8	78,5	73,7	0,005	36,767	84	2,2847	
151414_at	1,1	3,3	1,8	6,5	6,2	3,8	0,0164	2,0667	5,5	2,6613	CG13998
151452_at	74	85,9	56	2291	1667	1370	0,0016	71,967	1775,8	24,676	CG17325
151484_i_at	0,2	1,9	0,4	5,3	5,1	2,6	0,0133	0,8333	4,3333	5,2	tim
151491_at	4,2	8,1	7,5	15,6	23,3	12,8	0,0171	6,6	17,233	2,6111	CG30079
151567_at	26,6	13,1	25,2	54,5	65	49,1	0,0027	21,633	56,2	2,5978	CG1607
151587_at	103,3	96,5	82,5	181,7	196,2	209,3	0,0003	94,1	195,73	2,0801	CG13252

AFFY próba	WT1	WT2	WT3	M1	M2	M3I	P érték T teszt	WT átlag	M átlag	Átlag arány Mutáns/Vad	Gén
151601_at	2,9	4,2	0,8	5,9	7,9	8,6	0,0097	2,6333	7,4667	2,8354	Dscam
151632_i_at	21,7	19,8	24,5	83,8	53,6	77,5	0,003	22	71,633	3,2561	pr-set7
151633_r_at	37,7	50,2	25,4	92,1	90,5	96,4	0,0008	37,767	93	2,4625	pr-set7
151650_at	7,4	17	13,1	26	34,2	32,5	0,004	12,5	30,9	2,472	CG18542
151664_at	121,3	141,9	114,1	402,2	291,2	336,6	0,0014	125,77	343,33	2,7299	Gtp-bp
151681_at	164,2	106,8	158,8	307,7	354,7	239,6	0,0072	143,27	300,67	2,0987	CG32306
151724_at	134	150,8	126,4	369,5	360,9	259,1	0,003	137,07	329,83	2,4064	CG4386
151726_at	16,8	19,9	8,7	48,3	49,7	59,4	0,0008	15,133	52,467	3,467	CG30104
151771_at	248,7	241	286,6	1825	1312	1664	0,0005	258,77	1600,1	6,1836	CG31374
151781_at	1,1	1,4	1,8	3,7	9,4	8,7	0,016	1,4333	7,2667	5,0698	CG5107
151792_at	10,2	7	7,2	27,9	19,2	15,2	0,0157	8,1333	20,767	2,5533	CG32432
151796_at	1,6	2,8	0,8	4,7	4,3	5,3	0,0048	1,7333	4,7667	2,75	Pph13
151817_at	28	33,6	23,3	395,9	381,5	284,4	0,0004	28,3	353,93	12,506	CG8329
151860_at	13,3	8,7	2,9	25,1	19,6	20,5	0,0089	8,3	21,733	2,6185	Rh3
151892_at	1,1	2,5	5	13,7	7,9	9,2	0,0121	2,8667	10,267	3,5814	CG7708
151936_at	151,3	164,6	167,9	319,4	385,7	269	0,0044	161,27	324,7	2,0134	CG9216
151937_at	500,3	305,2	254,2	763,7	726,5	870,5	0,0037	353,23	786,9	2,2277	CG1213
151974_at	106,5	73	89,6	143,9	231,5	227,6	0,0105	89,7	201	2,2408	CG8312
151989_at	57	79,8	62	214,1	194,8	147,4	0,0024	66,267	185,43	2,7983	CG3036
152026_at	14,3	18,5	13,4	38,4	84,6	76,1	0,0117	15,4	66,367	4,3095	CG4757
152165_at	1,9	0,4	1,4	6,4	7,4	9,6	0,0016	1,2333	7,8	6,3243	CG11489
152238_at	0,4	0,9	0,4	2	1,1	2,1	0,0157	0,5667	1,7333	3,0588	CG6004
152265_at	1,7	11,5	5,2	99,5	92	40,3	0,0097	6,1333	77,267	12,598	CG11892
152313_at	17,3	18,5	10,3	62,7	75,2	65,2	0,0002	15,367	67,7	4,4056	Cyp6a17
152425_at	16,4	6,5	10,2	41,7	47,3	43,4	0,0003	11,033	44,133	4	Fmo-2
152437_at	42,6	53,3	49,3	106,6	88,9	122,9	0,0025	48,4	106,13	2,1928	ldgf5
152484_at	22,4	14,3	20	92,4	62	74,8	0,0016	18,9	76,4	4,0423	CG7549
152494_at	12,5	7,1	16,7	29,8	19,3	28,2	0,0167	12,1	25,767	2,1295	Cyp6w1
152506_at	461,1	446,6	393,8	2032	1391	1970	0,0013	433,83	1797,5	4,1432	CG7874
152521_at	2,5	3,5	0,9	52,3	39,4	38,1	0,0004	2,3	43,267	18,812	CG1441
152602_at	309,7	258,5	259,9	619	476,7	610,3	0,002	276,03	568,67	2,0601	CG4196
152648_at	109,3	114,9	112,9	932	823,2	738,9	0,0001	112,37	831,37	7,3987	CG2736
152714_at	62,4	55,4	91,6	307,5	321,8	260,9	0,0002	69,8	296,73	4,2512	CG3397
152765_at	105,2	90,2	53,2	244,5	216,7	242,5	0,0005	82,867	234,57	2,8307	CG11353
152790_at	12,5	3,2	6,5	15,3	25,9	21,2	0,0154	7,4	20,8	2,8108	CG6204
152926_at	112,6	128,2	95,1	244,3	293,2	192,6	0,0063	111,97	243,37	2,1736	CG10570
152934_at	85,1	110,1	71,9	189,8	198,2	152,4	0,0036	89,033	180,13	2,0232	CG3857
152966_at	115,6	110,9	68,2	885,8	589,4	492,9	0,0047	98,233	656,03	6,6783	CG7724
152995_at	65,5	119,6	103,7	232,7	284,9	191,4	0,0056	96,267	236,33	2,455	CG18316
153035_at	366,7	314,6	345,7	892,4	581,6	771,7	0,0057	342,33	748,57	2,1867	Corp
153048_at	54,5	54,2	43,6	137,9	120,8	85,7	0,0077	50,767	114,8	2,2613	CG12855
153071_at	1367	962,6	989,6	3072	2164	2473	0,0039	1106,3	2569,5	2,3227	CG7220
153080_at	11,6	11,3	13,5	33,6	33,2	40,6	0,0003	12,133	35,8	2,9505	CG8854
153085_at	40,7	46,4	28,4	87,4	88,3	66,1	0,0047	38,5	80,6	2,0935	Rh5
153087_at	52,4	39,6	62	180,8	159	163	0,0001	51,333	167,6	3,2649	CG8654
153101_at	23	24,8	22,5	69,5	84,9	66,8	0,0004	23,433	73,733	3,1465	CG15675
153165_at	201,5	162,7	178,9	354,4	406,9	378,1	0,0002	181,03	379,8	2,098	Cip4
153172_at	26,9	34,6	39,5	116	112,5	88,3	0,0008	33,667	105,6	3,1366	CG31886
153231_at	135,8	159	200,6	368,6	325,9	389,3	0,0009	165,13	361,27	2,1877	CG8791
153258_at	512,3	538,4	466,9	1372	939,5	1025	0,0053	505,87	1112,1	2,1984	CG4860
153402_at	52,3	60,7	43,8	115,3	79	122,5	0,0102	52,267	105,6	2,0204	CG1847

AFFY próba	WT1	WT2	WT3	M1	M2	M3I	P érték T teszt	WT átlag	M átlag	Átlag arány Mutáns/Vad	Gén
153516_at	21,6	33,1	16,5	50,8	52,5	59,7	0,0028	23,733	54,333	2,2893	Cyp6a22
153538_at	489,3	535,5	492,9	1373	1095	1377	0,0006	505,9	1281,7	2,5335	CG8839
153567_at	9,1	7,6	8,1	26,9	31,1	40,3	0,0018	8,2667	32,767	3,9637	CG13847
153662_at	5,6	2,3	11,7	22,9	26,6	15,9	0,0108	6,5333	21,8	3,3367	CG18468
153688_at	13,1	12,7	20,1	30,6	45,9	34,5	0,0069	15,3	37	2,4183	CG16718
153723_at	10,4	10,4	10,6	26,1	20,6	20,8	0,0013	10,467	22,5	2,1497	Ephrin
153839_at	183,9	174,7	221,1	429,9	366,9	420,9	0,0005	193,23	405,9	2,1006	sra
153902_at	24,6	20,9	25,8	94,3	85,2	56,6	0,0043	23,767	78,7	3,3114	navy
153936_at	1,7	4,1	3,6	10	6,9	6,4	0,013	3,1333	7,7667	2,4787	CG2990
153941_at	29,6	27,9	31,1	334,2	415,4	273,2	0,0008	29,533	340,93	11,544	Fst
153951_at	297,1	307,5	219,6	1061	964,5	634,9	0,0049	274,73	886,63	3,2273	ImpE2
153974_at	17,4	3,8	7,7	28,4	43,5	26,8	0,0127	9,6333	32,9	3,4152	CG7747
154011_at	42,2	45,2	35,3	108,6	111,9	102,6	4E-05	40,9	107,7	2,6333	VhaM9.7-1
154031_at	145,4	148,2	139	490,4	417,2	467,5	7E-05	144,2	458,37	3,1787	Chit
154077_at	80,1	61,6	95,5	188,4	168,1	191,9	0,0005	79,067	182,8	2,312	CG31729
154100_at	50,7	52,6	38	94,5	89,8	104,9	0,0008	47,1	96,4	2,0467	CG1244
154151_at	44,2	59,9	67,4	180,2	127,4	153,2	0,0022	57,167	153,6	2,6869	CG12075
154231_at	350,6	340,9	318,6	1775	1557	1158	0,0015	336,7	1496,8	4,4454	Osi14
154343_at	47,9	31,9	42	127,7	132,7	178	0,0016	40,6	146,13	3,5993	CG9509
154378_at	55,3	52,8	45,4	136	96,3	109,1	0,0033	51,167	113,8	2,2241	CG4785
154499_at	16,7	17,5	7	46	41	49,2	0,0008	13,733	45,4	3,3058	CG10492
154515_at	13,8	9,3	2,6	36,4	21,3	28,9	0,0101	8,5667	28,867	3,3696	drosha
154546_at	6,1	3	7,5	13,8	14,7	17,2	0,0022	5,5333	15,233	2,753	CG6293
154547_at	56,7	61,2	72,6	140,4	112	129,8	0,0013	63,5	127,4	2,0063	CG7536
154623_at	47,2	83,9	71,2	248,9	193	235,7	0,0007	67,433	225,87	3,3495	CG15893
154699_at	67,2	48,8	43,4	248,2	180,5	129	0,0098	53,133	185,9	3,4987	ftz-f1
154734_at	34,9	30,2	33,2	60,6	80,4	55,8	0,0064	32,767	65,6	2,002	CG7456
154740_at	13,6	1,5	6,7	20,5	17,3	21,2	0,0143	7,2667	19,667	2,7064	CG31793
154781_at	14,2	9,6	13,5	24,7	36,4	25,1	0,0082	12,433	28,733	2,311	CG30427
154837_at	69,4	111,5	84,4	197,6	155,1	194,8	0,0035	88,433	182,5	2,0637	CG5002
154985_at	539,2	409,7	301,8	3279	2316	1287	0,0158	416,9	2293,8	5,5021	CG9083
155001_at	62,6	78,6	66,2	147,5	131	139	0,0003	69,133	139,17	2,013	CG8321
155067_at	10,1	6,9	12,1	24	18,1	16,3	0,0122	9,7	19,467	2,0069	nbs
155108_at	9,1	5	7,5	15,5	16,9	17	0,001	7,2	16,467	2,287	CG1575
155122_at	32,5	24,3	13,7	129,6	112,2	67,8	0,0071	23,5	103,2	4,3915	CG9411