

Proteaszóma szubsztrátok felismerési mechanizmusának genetikai analízise című OTKA pályázat részletes zárójelentése

Az APC katalitikus moduljával kapcsolatos eredmények

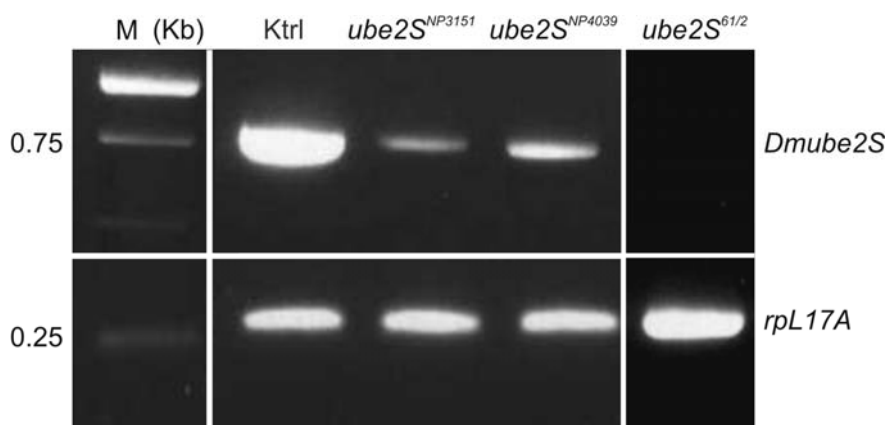
A sejtciklus szabályozásában fontos szerepet játszó ubikvitin-függő fehérjelebontás központi szereplője a legalább 13-15 alegységből álló hatalmas komplex, az APC (anaphase promoting complex). Az APC-n belül két alkompex, a katalitikus és a szubsztrátkötő/szabályozó alkompexek különíthetők el, melyeken belül a legtöbb alegység evolúciósan konzervált. A katalitikus alkompexet az Apc2 és Apc11 alegységek alkotják a humán és élesztő APC-ben; ezek egyikéhez kapcsolódik az ubikvitint szállító E2 enzim. Munkánk kezdetéig a *Drosophila* modell organizmusban csak az Apc2/Mr alegység volt ismert.

1. Letális P elem inszerciós mutánsok jellemzésével azonosítottuk a *lemming* (*lmg*) gént. Homozigóta *lmg* lárvák agyából készített preparátumok citológiai vizsgálata során túlkondenzálódott mitótikus kromoszómákat, magas mitótikus indexet és magas metafázis – anafázis arányt, kromoszóma szegregálódási hibákat, valamint nagyszámú aneuploid és poliploid sejteket figyeltünk meg. Ezek a sejtosztódás metafázis-szerű gátlására utaltak. A *lmg* gént plazmid-menekítési módszerrel klónoztuk. A *lemming* gén klónozásával és szekvenálásával sikerült azonosítanunk az APC katalitikus alegységét - az Apc11 fehérjét - kódoló gént ecetmuslicában. Kimutattuk, hogy a *lemming* lokusz rendkívüli szerkezetű, ún. dicisztronos elrendezésű, ami a prokarióták operonjaira emlékeztetve két kódoló régiót (ORF) tartalmaz tandem elrendezésben. Ezeket *lmgA* és *lmgB* cisztronoknak neveztük el. Kimutattuk, hogy a génről egy dicisztronos mRNS íródik át, amelynek legalább egy része, további érési folyamatban monocisztronos mRNS-sé hasad. Meghatároztuk, hogy az 5'-végi *lmgA* ORF kódolja a *Drosophila* APC/C komplex Apc11 alegységét. Ezt a tényt a nagyfokú szekvencia homológia (80% feletti aminosav azonosság) mellett az is alátámasztotta, hogy heterológ komplementációs kísérletekben a *Drosophila* *lmgA* ORF menekítette a sarjadzó élesztő Apc11 mutánsok jellegzetes mutáns fenotípusát. Genetikai és fizikai interakciós kísérletekben kimutattuk, hogy a Lmg fehérje specifikus kölcsönhatást mutat az APC/C Apc2/Mr alegységével, a Vihar ubikvitin konjugáló (E2) enzimmal. Munkánk teremtette meg annak feltételeit, hogy az Apc11 alegységet (és az APC komplex funkcionális analízisét) egy genetikailag jól kezelhető, soksejtű intakt organizmusban is vizsgálni lehessen.

Fenti eredményeinkből egy közlemény született: Nagy O, Pál M, Udvardy A, Shirras CA, Boros I, Shirras AD, Deák P. (2012) **lemmingA encodes the Apc11 subunit of the APC/C in *Drosophila melanogaster* that forms a ternary complex with the E2-C type ubiquitin conjugating enzyme**, Vihar and Morula/Apc2. *Cell Division* 7(1):9.

2. Élesztő hármashibrid kísérleteink eredménye azt mutatta, hogy az Apc2/Mr és Apc11/Lmg alegységek együttesen interakciót mutatnak a *CG8188* gén által kódolt fehérjével. Ez a fehérje nagyfokú szekvencia hasonlóságot mutat a humán Ube2S fehérjével, ami ugyancsak egy ubikvitin konjugáló (E2) enzim, és szerepet tulajdonítanak neki az APC-függő poliubikvitin lánc létrehozásában a már monoubikvitinált célfehérjéken. Feltételezzük, hogy a *CG8188* fehérje ubikvitin konjugáló enzimmént működik *Drosophilában*, ezért a *CG8188* gén mutáns alléljait vizsgáltuk. A fentiek alapján a *CG8188* gént és termékét *DmUbe2S* elnevezéssel láttuk el. A gén P elem inszerciós alléljai életképesnek bizonyultak. Ez a fenotípus magyarázható a vizsgált allélek hipomorf jellegével: a képződő kevés géntermék elegendő a gén funkciójának ellátásához, ezért null allélokat állítottunk elő. A gén 5' vége előtt 85 bázispárra elhelyezkedő P{GawB}CG8188NP4039 elem remobilizálásával 400 olyan vonalat

hoztunk létre, amelyek a P elem ugrása következtében a *white* (*w+*) szemszín markert elvesztették. A közöttük megbújó deléciós mutánsokat PCR reakcióval azonosítottuk, és szekvenálással meghatároztuk a deléciók pontos méretét. A *DmUbe2S*^{50/1} jelöltben 910 bázispáros deléció képződött, amely eltávolította a gén csaknem kétharmadát, beleértve az ubikvitin-kötő (UBC) domént kódoló régiót. A *DmUbe2S*^{61/2}-ben 1409 bázispáros deléciós képződött, amely eltávolította a gén teljes kódoló régióját, tehát a *DmUbe2S*^{61/2} null allélnak tekinthető (lásd 1. ábra).



1. ábra A génextpresszió mértékének vizsgálata RT-PCR-rel az *DmUbe2S* mutánsokban.

Ktrl: kontroll; M: molekulásúly marker. Felső sorban a *DmUbe2S* génre specifikus primerekkel kapott PCR termékek láthatóak a vad típusban (Ktrl) és a *DmUbe2S* mutánsokban. Bemérési kontrollként a *rpL17A* transzkripció szintet használtuk (alsó sor).

Mindkét *DmUbe2S* deléciós mutánsnak vizsgáltuk az életképességét és mitotikus fenotípusát is. A *DmUbe2S*^{50/1} és a *DmUbe2S*^{61/2} homozigóta állatok életképeseknek és fertiliseknek bizonyultak. A harmadik stádiumos lárvák agyának és imágókorongjainak fejlődésében és morfológiájában nem tapasztaltunk eltérést a kontrollhoz képest. Mitotikus fenotípusukat megvizsgálva nem volt szignifikáns eltérés a vad típusú állatok fenotípusától. Ezek a kísérleti eredmények arra utalnak, hogy a *DmUbe2S* E2 enzimnek – a humán *Ube2S* enzimmel ellentétben – nincs, vagy elhanyagolható szerepe lehet az APC/C-függő poliubikvitin láncok létrehozásában normál körülmények között.

A *DmUbe2S*^{61/2} genetikai kölcsönhatást mutat a *morula*, *lemming* és *vihar* génekkel. A *DmUbe2S* és *vihar* valamint a *morula* és *lemming* gének közötti kölcsönhatást genetikai interakciós kísérletekben is vizsgáltuk. A *DmUbe2S*^{61/2} allél felhasználásával *DmUbe2S*^{61/2}; *mr*² és *Dmube2S*^{61/2}; *lmg*⁰³⁴²⁴, valamint *DmUbe2S*^{61/2}; *vihar*^{S110501}/*vihar*^{KG02013} kettősmutánsokat állítottunk elő, és vizsgáltuk fenotípusukat. Először megvizsgáltuk, hogy a kiindulási egyes mutánsokhoz képest eltolódik-e a kettősmutánsok letálfázisa. Ehhez minden vonalból 500-500 L2 stádiumú lárvát gyűjtöttünk és követtük egyedfejlődésüket (1. táblázat). A *mr*² homozigóták 30%-a életképes, a nőstények sterilek. A *DmUbe2S*^{61/2}; *mr*² homozigóták 100%-a elpusztult a kikelés előtti farát adult P15(i) stádiumban. Mitotikus fenotípusukat megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a *mr*² mutáns mitotikus indexéhez és metafázis-anafázis arányához képest a *DmUbe2S*^{61/2}; *mr*² kettős mutánsokban kissé megemelkedik mitózisban és metafázisban lévő sejtek száma (2. táblázat). A *mr*² mutánsokból készített preparátumokon poliploid sejteket egyáltalán nem találtunk, ezzel szemben a *DmUbe2S*^{61/2}; *mr*² homozigóták mitózisban lévő sejtjeinek 2.4±2.2 %-a poliploidnak bizonyult (2. táblázat).

Genotípus	Letálfázis
<i>DmUbe2S61/2</i>	Életképes
<i>DmUbe2SNP3151</i>	Életképes
<i>DmUbe2SNP4039</i>	Életképes
<i>lmg03424</i>	Farát adult P15(i)
<i>DmUbe2SNP3151; lmg03424</i>	Farát adult P15(i)
<i>DmUbe2SNP4039; lmg03424</i>	Farát adult P15(i)
<i>viharS110501/ viharKG02013</i>	90% életképes, farát adult P15(i)
<i>DmUbe2S61/2; viharS110501/ viharKG02013</i>	Farát adult P15(i)
<i>lmg03424</i>	Farát adult P15(i) (500 lárvából 57,6±4,2%)
<i>DmUbe2S61/2; lmg03424</i>	Farát adult P15(i) (500 lárvából 33,4±4,1%)
<i>mr²</i>	30% életképes, nőtény steril, farát adult P15(i),
<i>DmUbe2S^{61/2}; mr²</i>	Farát adult P15(i)

1. táblázat A *DmUbe2S*, a *DmUbe2S*; *lmg*, a *DmUbe2S*; *mr²*, valamint *DmUbe2S*; *vihar* mutánsok letálfázisának kvantitatív meghatározása.

A *lmg⁰³⁴²⁴* homozigóták 57,6±4.2%-a farát adult P15(i) bábstádiumban pusztul el, míg a *DmUbe2S^{61/2}*; *lmg⁰³⁴²⁴* homozigótáknak csak 33.4±4.1%-a jut el eddig a stádiumig (1. táblázat). Azonban *lmg⁰³⁴²⁴* erős mitotikus fenotípusához viszonyítva a *DmUbe2S^{61/2}*; *lmg⁰³⁴²⁴* kettősmutánsokban nem tudtunk kimutatni szignifikáns különbséget (2. táblázat).

A *vihar^{S110501}/ vihar^{KG02013}* transzheterozigóták 90%-a életképes, azonban a kikelést követően azonnal vagy 1-2 napon belül elpusztulnak (1. táblázat). Ezzel szemben a *DmUbe2S^{61/2}*; *vihar^{S110501}/ vihar^{KG02013}* kettősmutánsok farát adult P15(i) bábstádiumban pusztultak el. Mitotikus fenotípusukban drasztikus változást tapasztaltunk a *vihar* transzheterozigótákhoz képest (2. táblázat). A kettősmutánsokban több mint háromszorosra emelkedett a mitózisban lévő sejtek száma, valamint több mint kétszeresére a metafázis-anafázis arány. A *vihar* mitózisban lévő sejtjeinek 17.5±0.9% túlkondenzált kromoszómát tartalmaz, a *DmUbe2S^{61/2}*; ez az érték a *vihar* kettősmutánsokban 77.1±7.3%-ra emelkedett (2. táblázat).

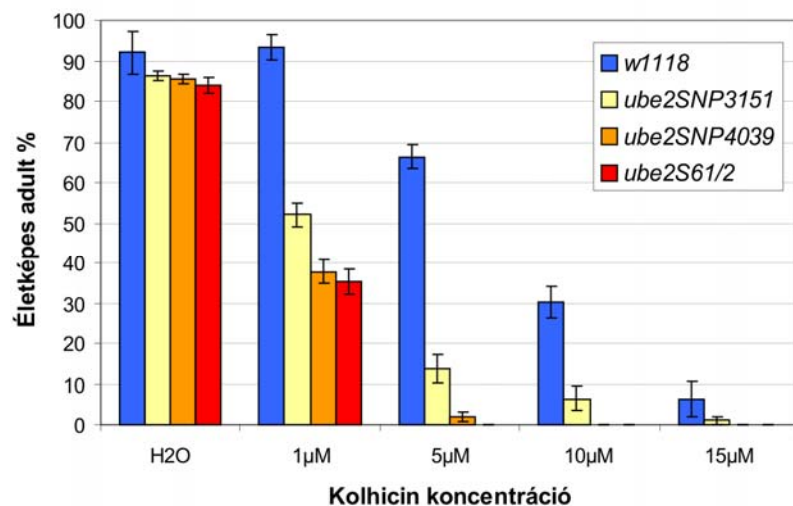
Genotípus	Preparátum/ Látómező	Mitotikus index	M:A arány	Polyploid %	Apoptózis index	Túlkondenzált kromoszóma %
<i>w¹¹¹⁸</i>	5/150	1,5±0,1	3±0,3	0	0,5±0,1	0
<i>ube2S^{61/2}</i>	5/150	1,5±0,2	3,1±0,1	0	0,7±0,2	0
<i>mr²</i>	6/174	1,4±0,1	3,3±0,4	0	1,1±0,3	0
<i>mr²; DmUbe2S^{61/2}</i>	8/234	2,1±0,5	4,6±0,8	2,4±2,2	1,6±0,4	0
<i>lmg⁰³⁴²⁴</i>	6/135	4,1±0,8	4,5±0,7	19,6±5,6	1,4±0,3	40,4±2,9
<i>DmUbe2S^{61/2}; lmg⁰³⁴²⁴</i>	5/150	4,9±0,5	4,1±0,3	17,9±7	0,9±0,3	37,1±4,1
<i>vih^{S110501}/ vih^{KG02013}</i>	10/271	2,6±0,7	2,8±0,8	7,6±2,9	1±0,3	17,5±0,9
<i>DmUbe2S^{61/2}; vih^{S110501}/ vih^{KG02013}</i>	6/119	8,5±0,9	6,6±2,4	6,6±2,4	1.6±0,4	77,1±7,3

2. táblázat Az *DmUbe2S^{61/2}*, a *vihar* és a *DmUbe2S^{61/2}*; *vihar* mutánsok mitotikus fenotípusának kvantitatív meghatározása. Preparátum/Látómező: A vizsgált preparátumok és mikroszkóp látómezők száma. A mitotikus index megadja a mitózisban lévő sejtek számát egy-egy mikroszkóp látómezőben. A poliploid % megadja a több mint két kromoszóma garnitúrával rendelkező sejtek számát a mitotikus sejtek százalékában kifejezve. Az apoptotikus index megmutatja az apoptotikus sejtek számának átlagát egy mikroszkóp látómezőben. A túlkondenzált kromoszóma % megadja túlkondenzált kromoszómákat tartalmazó sejtek számát a mitotikus sejtek százalékában kifejezve.

A fenti eredmények arra utalnak, hogy ugyan a *DmUbe2S* gén nem létfontosságú, azonban jól kimutatható genetikai kölcsönhatást mutat a *morula*, *lemming* és *vihar* génekkel.

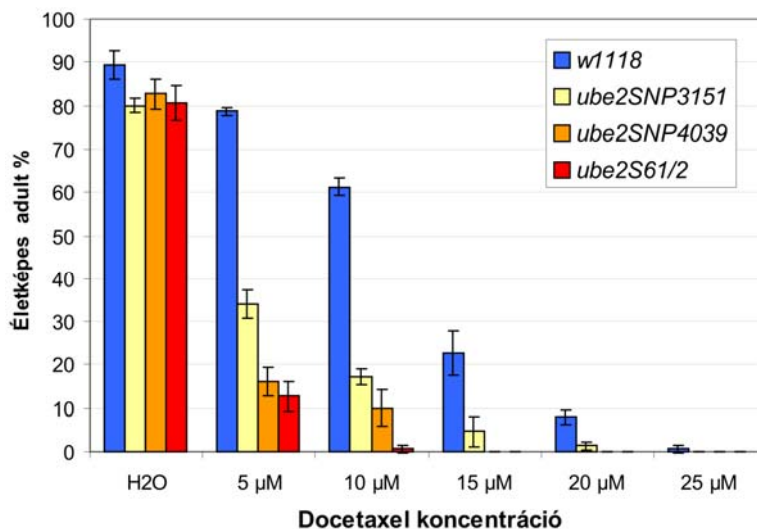
A *DmUbe2S* mutánsok érzékenyek mitózist gátló szerekkel szemben. Noha a *DmUbe2S* funkció kiesése *Drosophilában* nem bizonyult kritikusnak az APC/C-függő ubikvitilációs folyamatban, az előzőekben ismertetett genetikai interakciós kísérleteink és irodalmi adatok alapján feltételeztük, hogy esetleg az APC/C működését meghatározó orsó-összeszerelési ellenőrzési mechanizmusban lehet szerepe. Ennek tesztelésére *DmUbe2S* mutánsok kolhicin és docetaxel mitotikus gátlószerekkel szembeni érzékenységét vizsgáltuk. Ezek a szerek a mikrotubulusok normális működését gátolva, aktiválják az orsó-összeszerelési ellenőrzési mechanizmust.

A vad típusú állatokra 1 μ M kolhicin még nem bizonyult toxikusnak, az állatok több mint 90%-a életképes, fertilis imágóvá fejlődött (2. ábra). Ezzel szemben a *DmUbe2S* hipomorf és null mutánsai kevesebb, mint 50%-ban éltek túl a kezelést. 5 μ M-os koncentrációnál a vad típusú állatok 70%-a túlél, azonban a *DmUbe2S* mutánsoknál ez az érték 15% alá csökken, sőt a *DmUbe2S*^{61/2} null mutáns esetében a letalitás 100%-os volt. A 10 és 15 μ M koncentrációjú kolhicin hatására a vad típusú állatoknak még 30%-a, illetve 8%-a életképes, de a *DmUbe2S*^{NP4039} hipomorf mutánsoknál ez az érték átlagosan csak 6% és 1%-nak bizonyult (2. ábra).



2. ábra. A *DmUbe2S* mutánsok érzékenységeik kolhicinnel szemben. Az oszlopok különböző végkoncentrációban alkalmazott kolhicin hatását mutatják az életképességre. Az életképes adult % megadja a kezelt állatokból kifejlődött imágók arányát.

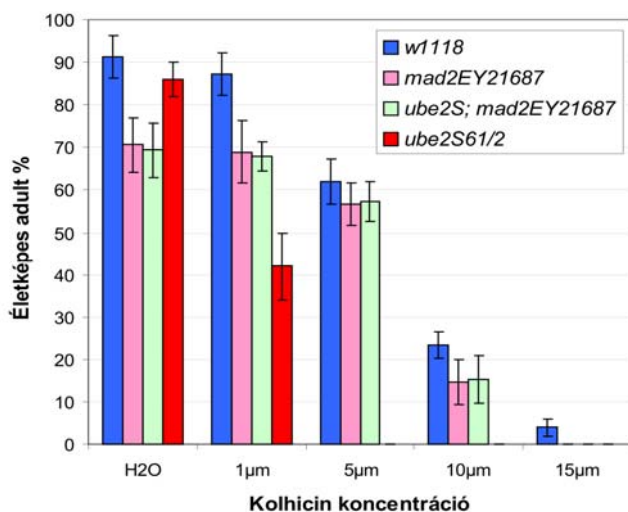
A docetaxel kezelés hatására a *DmUbe2S* mutánsok a kolhicin kezeléshez hasonló érzékenységet mutattak (3. ábra). A vad típusú állatok az 5 μ M docetaxel kezelést 80%-ban túlélnek, míg az *DmUbe2S* mutánsoknál csak 10-30%-a. 15 μ M koncentrációnál a vad típusú állatok 25%-a életképes imágóvá fejlődött, azonban a *DmUbe2S*^{NP4039} és *DmUbe2S*^{61/2} mutánsokra 100%-ban letálisnak bizonyult (3. ábra).



3. ábra A *DmUbe2S* mutánsok érzékenységét mutatják docetaxellel szemben. Az oszlopok különböző végkoncentrációban alkalmazott docetaxel hatását mutatják az életképességre. Az életképes adult % megadja a kezelt állatokból kifejlődött imágók arányát.

A fenti kísérleti eredmények azt bizonyítják, hogy a *DmUbe2S* mutánsok nagyfokú érzékenységet mutatnak az orsó-összeszerelési ellenőrzési mechanizmust aktiváló kolhicin és docetaxel mitotikus gátlószerekkel szemben. Ez alapján feltételezhető, hogy a *DmUbe2S* génnek az orsó-összeszerelési ellenőrzési mechanizmusban lehet szerepe *Drosophilában*.

A *mad2* funkció hiánya menekíti az *DmUbe2S* kolhicin érzékenységét. Megvizsgáltuk, hogy mi történik a *DmUbe2S* mutánsainkban kolhicin kezelés hatására, ha az orsó-összeszerelési ellenőrzési mechanizmus inaktív állapotban van. Ehhez az orsó-összeszerelési ellenőrzési mechanizmusban résztvevő egyik gén, a *mad2* szemilevális alléljével (*mad2^{EY216871}*) és a *DmUbe2S^{61/2}*-el kettős mutánst állítottunk elő. A *DmUbe2S^{61/2}; mad2^{EY216871}* homozigóta lárvákat - az előzőekben ismertetett kísérletekben és az ezekben használt végkoncentrációkban - kolhicinnel kezeltük (4. ábra).



4. ábra A *mad2* menekíti *DmUbe2S* kolhicinnel szembeni érzékenységét. Az oszlopok különböző végkoncentrációban alkalmazott kolhicin hatását mutatják az életképességre. Az életképes adult % megadja a kezelt állatokból kifejlődött imágók arányát %-ban kifejezve.

Azt tapasztaltuk, hogy mind a $mad2^{EY216871}$, mind pedig a $DmUbe2S^{61/2}$; $mad2^{EY216871}$ kettős homozigóták a vad típusú állatokhoz hasonló érzékenységi fenotípust mutattak. Még a legnagyobb, 15 μ M végkoncentrációban alkalmazott kolhicin hatására is voltak életképes imágóvá fejlődött állatok (4. ábra). Kontrollként a $DmUbe2S^{61/2}$ mutánst használtuk, amely a korábbi kísérletekben kapott eredményekhez hasonlóan, csak a legkisebb koncentrációban alkalmazott kolhicint élték túl. Ez az eredmény azt mutatja, hogy a Mad2 hiánya képes volt menekíteni a DmUbe2S mitotikus gátlást kiváltó szerekekkel szembeni érzékenységét, és ugyancsak azt támasztja alá, hogy a $DmUbe2S$ génnek az orsó-összeszerelési ellenőrzési mechanizmusban van szerepe Drosophilában.

A DmUbe2S-sel kapcsolatos eredményeinket eddig egy tudományos konferencián ismertettük: (Nagy O, Pál M, Udvardy A, Boros I, Shirras AD, Deák P. **The catalytic module of the Anaphase Promoting Complex in *Drosophila melanogaster***, Ubiquitin-like Molecules in Disease Meeting, Cambridge, UK, 2011).

Az eredményeket tartalmazó kézirat elkészült, ezért reményeink szerint még 2012-ben folyóiratcikk formában is megjelenik.

3. Az APC alegységeket kódoló géneket érintő mutánsok izolálása és jellemzése lehetőséget adott arra, hogy egy tudományos együttműködés keretében (Mary A. Lilly, Cell Biology and Metabolism Branch, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, NIH, Bethesda, MD, USA) megvizsgáljuk az APC szerepét a módosult sejtciklus, az endomitózis, vagy endoreduplikáció szabályozásában. Ez a speciális sejtciklus - amelyben ismétlődő DNS replikációs ciklusok játszódnak le sejtosztódás nélkül - igen elterjedt mind a növény, mind pedig az állatvilágban. Munkánk kezdetéig rendelkezésre álló kísérleti adatok arra utaltak, hogy az endomitózis szabályos lefutása a Ciklin E/Cdk2 komplex oszcilláló aktivitásának köszönhető. Kísérleteinkben a petekamrákban található politén dajkasejtek kialakulását követtük APC alegység-mutánsokban és vad típusú állatokban. Alegység-mutánsaink részletes genetikai és immunhisztokémiai analiziséből nyert adatok arra utalnak, hogy az APC ciklikus aktivitást mutat az endoreduplikációs ciklusok során, és ez szükséges a ciklusok szabályos lefutásához. Az APC aktivitási görbéje éppen ellentétes a Ciklin E/Cdk2 komplex aktivitási görbéjével: amikor az egyik komplex aktivitása magas, akkor a másik aktivitása minimális, és fordítva. Alacsony APC és magas Ciklin E/Cdk2 aktivitási periódus teszi lehetővé a replikációs origók ismétlődő feltöltődését, és így az G/S endociklusok lefutását. Eredményeink hozzájárultak a sejtciklus szabályos lefutását biztosító oszcillátor természetének meghatározásához.

Ezekből az eredményekből egy közlemény született: Narbonne-Reveau K., Senger S., Pal M., Herr A., Richardson H.E., Asano M., **Deak P.** and Lilly M.A. (2008) **APC/C^{Fzr/Cdh1} promotes cell cycle progression during the *Drosophila* endocycle**, *Development* 135(8):1451-1461.

Poliubikvitin-kötő receptorokkal kapcsolatos eredmények

A projektnek ez a része folytatása a pályázat egyik résztvevője, Udvardy Andor, egy korábbi OTKA pályázatának, amely 2007-ben zárult le, ezért ezeket a vizsgálatokat ő fogta össze és irányította. Előállítottuk az eddig ismert poliubikvitin receptorokat kódoló gének mutánsait és az ezekre specifikus transzgenikus RNS-interferencia vonalakat. Ezt követően meghatároztuk a poliubikvitin receptorokat kódoló gének expressziójának egyedfejlődési mintázatát. Létrehoztuk a mutánsok kettős és hármas-mutáns kombinációit, és vizsgáltuk ezek fenotípusát. Kiderült, hogy a nem létfontosságú *Ddi1* és *Rad23* gének kettős mutánsai is életképesek. Meghatároztuk, hogy a *p54-Ddi1*, *p54-Rad23*, valamint a *Dsk2-Ddi1* és *Dsk2-*

Rad23 kettős mutánsok letális fenotípusa megegyezik a *p54* és *Dsk2* mutánsok báb-letális fenotípusával. A létfontosságú *p54* és *Dsk2* gének mutánsaiban nem figyelhető meg a poliubikvitinált fehérjék jelentős felhalmozódása, ezért feltételezzük, hogy ezek letalitásáért nem a funkció általános kiesése, hanem egy bizonyos létfontosságú fehérje szabályos degradációjának a zavara felelős. Megállapítottuk, hogy a *Dsk2* túltermelése okozta fejlődési rendellenességek és letalítás menekíthető volt a *p54* receptor túltermelésével. Kimutattuk, hogy a *Dsk2* receptor proteaszómához való kötődéséhez szükséges a *p54* receptor jelenléte. Végül bizonyítottuk, hogy a *p54* fehérje ubikvitináltsági állapota határozza meg fizikai kölcsönhatását az extraproteaszómás poliubikvitin receptorokkal.

Az eddig ismert poliubikvitin receptorokkal kapcsolatos vizsgálati eredményeink arra utaltak, hogy valószínűleg további, még ismeretlen ubikvitin receptorok működhetnek a sejtekben. Bioinformatikai módszerek felhasználásával sikerült azonosítani egy új poliubikvitin receptor gént, ami a *Drosophila* adatbázisban, a FlyBase-ben a *CG31528* jelölést viseli. Az általunk azonosított új ubikvitin receptor szekvencia-analízise arra utal, hogy a már ismert Ub-receptorok közül a *Dsk2*-vel mutat legnagyobb hasonlóságot. Mivel a *CG31528* génnek nincs mutáns allélja, ezért transzgenikus RNS-interferencia vonalakat állítottunk elő, amelyekben az élesztő GAL4 transzkripció faktorral szövet és fejlődési-stádium specifikusan gátoltuk a gén expresszióját. Eredményeink azt mutatják, hogy általános GAL4-driverekkel (*actin5C-GAL4*, vagy *daughterless-GAL4*) indukálva, az RNS-interferencia jelentős mértékben (mintegy 90%-al) csökkentette a gén kifejeződést, aminek eredményeként szemiletalális fenotípust kaptunk. Ez az eredmény arra utal, hogy a *CG31528* gén a *Dsk2* és *p54* génekkel együtt az esszenciális poliubikvitin receptort kódol. Az új receptor részletes jellemzését kapacitáshiány miatt nem tudtuk elvégezni a pályázat futamideje alatt.

Poliubikvitin-kötő receptorokkal kapcsolatos eredményeinket három közleményben közzeltük:

Lipinszki Z, Kiss P, Pál M, Deák P, Szabó A, Hunyadi-Gulyas E, Klement E, Medzihradzky KF, Udvardy A. (2009) **Developmental-stage-specific regulation of the polyubiquitin receptors in *Drosophila melanogaster***, *Journal of Cell Science*, 122:3083-92.

Lipinszki Z, Pál M, Nagy O, Deák P, Hunyadi-Gulyas E, Udvardy A. (2011) **Overexpression of *Dsk2*/dUbqln results in severe developmental defects and lethality in *Drosophila melanogaster* that can be rescued by overexpression of the *p54*/Rpn10/S5a proteasomal subunit**, *FEBS Journal*, 278(24):4833-44.

Lipinszki Z, Kovács L, Deák P, Udvardy A. (2012) **Ubiquitylation of *Drosophila p54*/Rpn10/S5a regulates its interaction with the UBA-UBL polyubiquitin receptors**, *Biochemistry* 51(12):2461-70.

Dezubikvitináló enzimekkel kapcsolatos eredmények

Jelentős előrehaladást értünk el azoknak az ubikvitin-kötő fehérjéknek a jellemzésében, amelyek funkciója a poliubikvitin lánc eltávolítása a szubsztrát fehérjékről, és/vagy monoubikvitinekre történő hasítása. Ezeket dezubikvitinázoknak, vagy DUB enzimeknek nevezzük. A DUB-okat kódoló gének azonosításában bioinformatikai módszereket alkalmaztunk, kihasználva azt a tényt, hogy a dezubikvitiláló enzimek aminosav-szekvenciája evolúciósan konzervált.

Negyven DUB-ot kódoló gént azonosítottunk *Drosophilában*. Az UniProt adatbázisban fellelhető ismert élesztő és humán DUB szekvenciákat felhasználva BLAST keresést végeztünk. A bioinformatikai munka első lépése az egyes DUB alosztályokra jellemző konzervált katalitikus domének azonosítására korlátozódott. Ennek során 24 USP, 7 OTU, 4 UCH, 1 MJD és 4 JAMM alosztályba sorolható *Drosophila* dezubikvitiláló enzim-szekvenciát azonosítottunk. A továbbiakban a szekvenciák katalitikus doménjein kívüli részeket

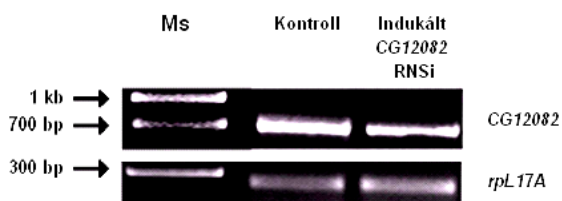
vizsgáltuk, és az egyes *Drosophila* DUB-okhoz humán és (amennyiben létezik) élesztő ortológokat rendeltünk. Az ortológok azonosítását megkönnyítette az a tény, hogy a legtöbb dezubikvitiláló enzimnek a konzervált katalitikus doménon kívül egyéb funkcionális doménjei is ismertek. Ilyenek például az ubikvitin kötő domének, mint az UBP típusú cink-ujj domén (ZnF-UBP), az ubikvitin interakciós motívum (UIM) vagy az ubikvitin asszociációs domén (UBA). Az egyes domének jelenléte vagy hiánya, illetve sorrendje jellemző egy adott dezubikvitiláló enzimre. Ezeket az információkat felhasználva 21 élesztő és 53 humán DUB-nak 40 *Drosophila* ortológját azonosítottuk. A számbeli különbség onnan adódott, hogy egyes esetekben egy élesztő DUB több *Drosophila* fehérje ortológja, illetve egyes *Drosophila* DUB-oknak két vagy több humán ortológja is van. Ennek magyarázata az lehet, hogy a többsejtűek evolúciója során többször bekövetkezett gén, vagy genom duplikáció.

A homológia szűréssel azonosított *Drosophila* DUB géneket érintő 58 transzgenikus RNS interferencia vonalat és 16 P elem inszerciós törzset sikerült beszereznünk. Egyes génekre több független transzgenikus RNS interferencia vonal és P elem inszerciós mutáns is rendelkezésünkre állt, így lehetőségünk nyílt egy adott gén több független alléljának vizsgálatára is. Azt, hogy a vizsgált DUB-ok közül melyek funkciója létfontosságú, úgy állapítottuk meg, hogy az egyes géneket érintő RNS interferencia indukálása után megvizsgáltuk az állatok életképességét és fertilitását, megállapítottuk a letálfázist. A P elem inszerciós mutánsok esetében a homoizogóták letálfázisát néztük. A különböző allélok letálfázisára vonatkozó információkat összegezve megállapítottuk, hogy 17 DUB gén hiánya nem befolyásolja az állatok életképességét és fertilitását, továbbá 2 DUB hiánya esetén az állatok túléltek ugyan a felnőtt korig, de sterilek voltak. Huszonegy DUB hiánya eredményezett eltérő fokú letalitást, ebből 3 esetben szemiletális, 7 esetben farát adult letális, 3 báb és 8 lárva letális fenotípust tapasztaltunk a gén csendesítése vagy hiánya eredményeként.

Megvizsgáltuk a törzsek citológiai fenotípusát is, és ennek során három gént azonosítottunk, amelyek funkciójának kiesése jelentősen megnövekedett apoptózist eredményezett. Ezek közül a *CG12082* gént vizsgáltuk részletesen.

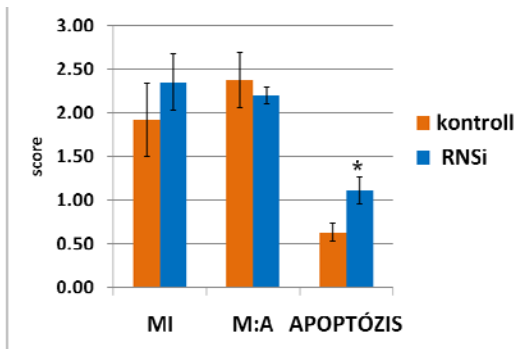
A *CG12082* gén csendesítése apoptotikus fenotípust eredményez. A *CG12082* génre specifikus RNS interferenciát egy általános expressziót biztosító *aktin5C-Gal4* driverrel indukáltuk. Az RNS interferencia hatására lecsökkent a *CG12082* génről képződő mRNS mennyisége (5. ábra), ami az állatok pusztulását okozta korai bábstádiumban.

A géncsökkentett lárvák agyából mitotikus preparátumokat készítettünk, amelyeken összesen 150 látómezőt számoltunk le. Meghatároztuk a mitózisban lévő sejtek arányát, a mitotikus indexet (MI), a metafázis-anafázis arányt (M:A) és az apoptózisban lévő sejtek arányát, vagyis az apoptózis indexet.



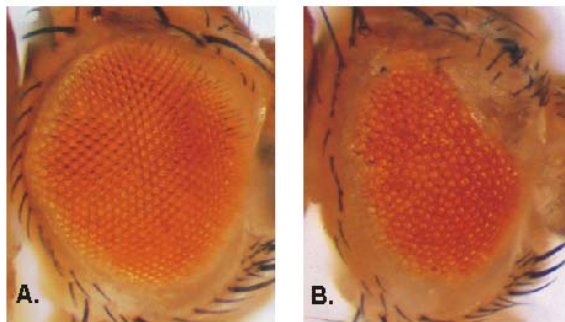
5. ábra Az indukált *CG12082* specifikus RNS interferencia (felső sor, jobboldali minta) lecsökkentette a célgénről képződő mRNS mennyiségét a nem indukált kontrollhoz képest (felső sor, baloldali minta). Az *rpL17A* bemérési kontroll mutatja, hogy az összes RNS mennyisége hasonló (alsó sor) mindkét mintában.

Kontroll preparátumokat a nem indukált transzgenikus RNS interferencia konstrukciót hordozó lárvákból készítettünk. A mitotikus indexben és a metafázis-anafázis arányban nem volt szignifikáns eltérés a kontroll és a *CG12082* géncsökkentett állatok között. Ezzel szemben az apoptózis index szignifikánsan különbözött, a normális érték duplájára emelkedett a *CG12082* géncsökkentett lárvák agyában (6. ábra).



6. ábra A *CG12082* indukált RNS interferencia törzs mitotikus fenotípusa. Az apoptózis index megemelkedett a géncsendesített állatokban (RNSi). MI: mitotikus index, M:A: metafázis:anafázis arány, APOPTÓZIS: az apoptózis index. -*-gal a szignifikáns különbséget jelöltük, * $<0,05$.

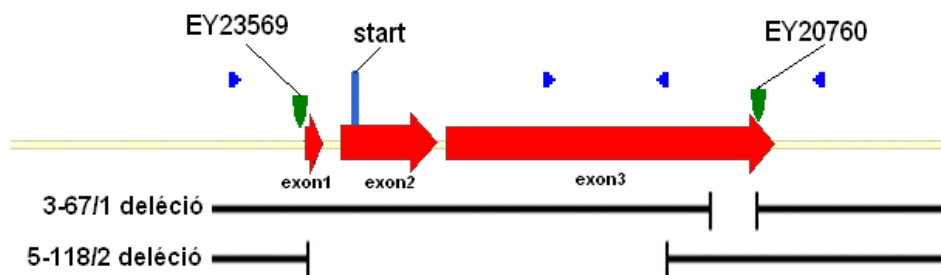
Orceinnel festett lárvális agypreparátumokon az erősen festődő, lekerekített apoptótikus sejtek számának jelentős megemelkedését tapasztaltuk, ami arra utal, hogy a *CG12082* gén szerepet játszhat az apoptózis szabályozásában. Ezt az apoptótikus fenotípust egy másik módszerrel is megvizsgáltuk. A *Drosophila* genetika eszköztára lehetővé tette, hogy a transzgenikus RNS interferenciát csak a szemben indukáljuk. Ebben az esetben az állatok kifejlődtek, a géncsendesítés okozta fenotípust csak az imágók szemének morfológiája mutatta. A *CG12082* génre specifikus RNS interferenciát egy szem-specifikus *ey-Gal4* driverrel indukálva az imágók szeme durva felszínű lett, szabálytalanul elhelyezkedő facettákkal (7. ábra).



7. ábra Vad típusú (A) és a szem-specifikus *ey-Gal4* driverrel indukált *CG12082* RNS interferenciát hordozó állat (B) szeme. A szemkezdemény sejtek apoptózisa rendellenes facetták kialakulásához vezet a géncsendesített állatokban.

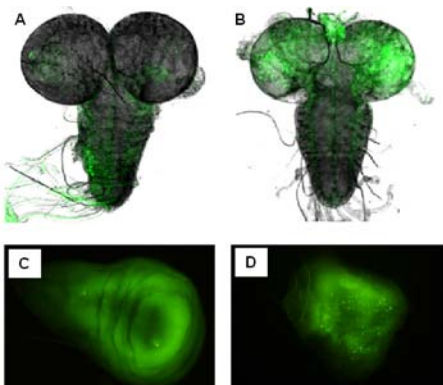
Ez a fenotípus szintén a *CG12082* gén apoptózisban játszott szerepére utalt, mivel irodalmi adatokból ismert, hogy az ehhez hasonló érdes szemfelületet, a szabálytalanul elhelyezkedő facettákat a szemkezdemény sejtek idő előtti elhalása okozza.

A *CG12082* gén deléciós alléljainak erős apoptótikus fenotípusa van. Egy erősebb fenotípus reményében a *CG12082* gén 5' nem kódoló régiójába, illetve a 3' régióba inszertálódott P elemek remobilizációjával két deléciós null allélt állítottunk elő (8. ábra). A deléciókat a gént közrefogó primerpárral végzett PCR segítségével detektáltuk. Szekvenálással pontosan meghatároztuk a deléciók hosszát és töréspontjait. Az 5' P elem remobilizációjával előállított 5-118/2 deléció 2147 bp kiterjedésűnek bizonyult, ami kiejti a *start* kodont és a kódoló szekvencia jelentős részét, így a génről nem képződhet mRNS és fehérje sem. A 3' P elem remobilizációjával egy kisebb, 275 bp hosszúságú deléciót kaptunk, amit 3-67/1 jelöléssel láttunk el. Ez eltávolítja az enzim aktív centrumát és az UBA2 domént kódoló szekvenciát, így a csonka mRNS-ről nem képződhet funkcionális fehérje.



8. ábra A *CG12082* gén szerkezete és a deléción kiterjedése. Pirossal a gén exonjai vannak kiemelve. A fekete vonalakon látható megszakított rész a deléción kiterjedését jelöli. Zöld nyilak a P elemek inszerciós helyét, a kis kék nyilak a delécións (génen kívül eső) és RT primerek (az exon3-ban) kötőhelyét jelöli.

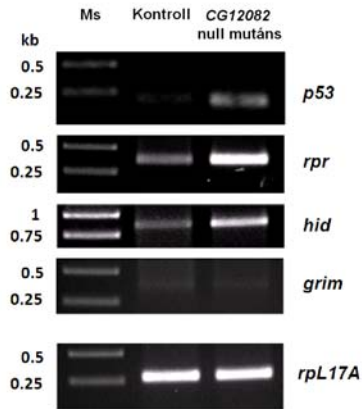
Mindkét delécións mutáns fejlődése L3 lárvastádiumban állt le, tehát az RNS interferencia okozta bábstádiumbeli letalitáshoz viszonyítva a delécións allélok erősebb fenotípust produkálnak. Ezt tapasztaltuk a delécións mutánsok apoptótikus fenotípusában is. Ehhez a *CG12082*^{3-67/1}/*CG12082*^{5-118/2} delécións transzheterozigóta, illetve a homozigóta lárvák agyából és szárny imaginális diszkuszaiból készített, akridin narancssal festett preparátumokat vizsgáltunk. Az L3 stádiumban stagnáló lárvák agyában és imágókorongjaikban nagymértékben megemelkedett az apoptótikus sejtek száma (9. ábra, B és D).



9.ábra A vad típusú (A és C) és *CG12082* delécións transzheterozigóta (B és D) lárvák agyából (B) illetve szárny diszkuszából (D) akridin narancs festéssel készített preparátumok. Az 5-118/2 és 3-67/1 delécións homozigóták agya is a transzheterozigótákéhoz hasonló fenotípust mutatott. A kis zöld pontok az apoptótikus sejteket jelölik.

A *CG12082* delécións null mutánsokban tapasztalt erős apoptótikus fenotípus alátámasztotta a gén szerepét az apoptózis szabályozásában. A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy ez a szabályozó szerep p53 függő, vagy attól független mechanizmus szerint valósulhat meg. Ezt a kérdést a proapoptótikus marker gének expressziójának vizsgálatával válaszoltuk meg.

A *CG12082* mutánsokban megemelkedik a p53-függő proapoptótikus gének expressziója. Az apoptózis p53-függő, vagy független útvonalat követhet. A *reaper* (*rpr*), *hid* és a *grim* proapoptótikus gének *Drosophilában* gátolják az apoptózis inhibitor fehérjéket (IAP-eket) és így hozzájárulnak a kaszpázok aktivációjához. Közülük a *rpr* és a *hid* p53-függő, míg a *grim* p53 független. RT-PCR-rel megvizsgáltuk ezeknek a proapoptótikus géneknek az expresszióját a *CG12082* null mutáns lárvák agyában. Azt tapasztaltuk, hogy a *p53*, a *rpr* és a *hid* gének expressziója megemelkedik a *CG12082* delécións null mutánsokban (10. ábra). Ugyanakkor a *grim* normálisan nagyon alacsony expressziója változatlan marad. Ez arra utal, hogy a mutánsokban tapasztalt apoptótikus fenotípus p53-függő útvonalat követ. A *CG12082* gén által kódolt fehérje ennek az útvonalnak a szabályozásában játszhat szerepet.

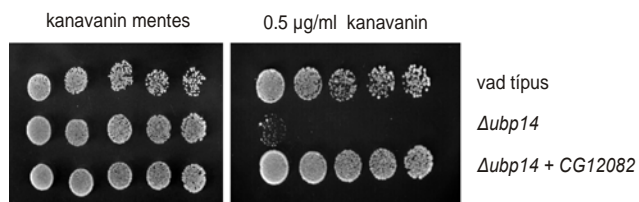


10. ábra A proapoptotikus gének expressziója a *CG12082* mutáns agyában és imágókorongjaiban. A *rpr*, a *hid* és a *p53* gén expressziója megemelkedett, ellenben a *grim* expressziója nem változott.

A *CG12082* gén a humán USP5 és az élesztő Ubp14 ortológját kódolja. *CG12082* *Drosophila* génről képződő feltételezett fehérje szekvenciájának bioinformatikai analízise azt mutatta, hogy ez a DUB enzim a humán USP5 illetve az élesztő Ubp14 fehérjékkel mutat nagymértékű (60%-os) szekvencia homológiát. Ezekben az enzimekben a poliubikvitin láncokkal való kölcsönhatásért az UBPs típusú cinkujj (ZnF-UBP) illetve az UBA1 és UBA2 funkcionális domének a felelősek. A poliubikvitin lánc hasítását a ciszteint és hisztidineket tartalmazó aktív centrum végzi. Az említett doméneket azonosítottuk a *Drosophila* fehérjében is, sőt ezek topológiai elrendezése is megegyezik. A doméneken belül fokozottabb konzerváltság figyelhető meg, ami funkcionális jelentőségüket bizonyítja.

Hasonló szerkezetükből adódóan, ezek a fehérjék hasonló folyamatokban játszhatnak szerepet. A funkcionális megfelelés úgy vizsgálható legkönnyebben, hogy megnézzük, vajon az egyik organizmusból származó fehérje képes-e ellátni egy másik organizmusban a hozzá hasonló szerkezetű fehérje feladatát. Mi az élesztő Ubp14 és a *Drosophila* ortológja közötti funkcionális homológiát vizsgáltuk egy heterológ menekítési kísérlet keretében.

A *CG12082* menekíti az élesztő *Ubp14* mutáns kanavanin-érzékeny fenotípusát. Arginin hiányában a táptalajhoz adagolt arginin analógot, a kanavanint, a sejtek beépítik a fehérjéikbe. A kanavanin beépülése azonban térszerkezeti változásokhoz vezet, és a károsított fehérjék poliubikvitilálódnak és a proteaszóma lebontja őket. Az *Ubp14* mutáns élesztősejtekben a kanavanin által károsított fehérjék nem bomlanak le, így a felhalmozódó rossz térszerkezetű fehérjék aggregátumai toxikusak ezekre a sejtekre. Ez a magyarázata az *Ubp14* mutáns élesztősejtek kanavanin-érzékeny fenotípusának (11. ábra).

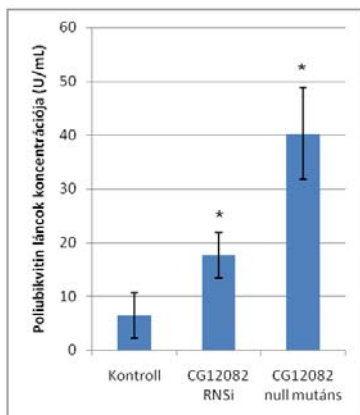


11. ábra Vad típusú és különböző genotípusú *Ubp14* mutáns élesztősejtek (*Δubp14*) növekedése kanavanin-mentes és 0.5 µg/ml kanavanint tartalmazó táptalajon. Az élesztők lineáris hígítási sorban voltak szélesztve, az egyes oszlopok az előző koncentráció felére hígított élesztő szuszpenzióknak felelnek meg.

Heterológ transzformációs kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy a *Drosophila CG12082* cDNS-t az *Ubp14* mutáns élesztőben kifejeztetve menekítette azok kanavanin-érzékeny fenotípusát, tehát a *Drosophila* fehérje képes ellátni az élesztő Ubp14 funkcióját (11. ábra).

A *CG12082* géntermék hiányában felhalmozódnak a poliubikvitin láncok. Ismert, hogy az *Ubp14* gén gátlása élesztőben a poliubikvitin láncok felhalmozódásához vezet. Ez avval magyarázható, hogy az enzim funkciója a proteaszómális fehérjedegradáció után visszamaradt

poliubikvitin láncok elbontása. A *CG12082* RNS interferencia és null mutánsokon poliubikvitin specifikus ELISA-val végzett méréseink azt mutatták, hogy *CG12082* funkció hiányában, *Drosophilában* is felhalmozódnak a poliubikvitin láncok (12.ábra).



12. ábra A poliubikvitin láncok koncentrációja a *CG12082* gén expressziójának csenyesítése (RNSi) és szekvenciájának kiejtése esetén. * a szignifikáns különbséget jelöli, * $<0,05$.

A hipomorf fenotípust mutató RNS interferenciás állatok esetében a poliubikvitin láncok koncentrációja 2,5-szöröse volt a vad típusénak. A deléciós null mutáns esetében a poliubikvitinek koncentrációjának emelkedése elérte a vad típusban mért érték hatszorosát.

A poliubikvitin láncok feldarabolásában játszott evolúciósan konzervált funkció megerősíti, hogy a *Drosophila CG12082* gén terméke az élesztő Ubp14 és a humán USP5 ortológja, ezért a gént és termékét *DmUsp5* jelöléssel láttuk el. A poliubikvitin processzálsági funkció konzerváltsága alapján feltételezhető, hogy a fehérje apoptózis szabályozásában játszott szerepe is evolúciósan konzervált lehet. Itt ismertetett eredményeink tudományos jelentőségét emeli, hogy az USP5 apoptotikus funkcióját még nem vizsgálták más organizmusban.

A *Drosophila* DUB-okkal és *DmUsp5* vizsgálatával kapcsolatos eredményeinket eddig két hazai és három nemzetközi tudományos konferencián ismertettük:

Kovács L, Nagy O, Pál M, Popescu O and Deák P: **Characterization of the *DmUsp5* deubiquitylation gene in *Drosophila melanogaster***, FEBS Advanced Lecture Course, Trends in Genetics: Genomic Instability and Pathways of Response, Jereván, Örményország, 2011.

Kovács L, Nagy O, Pál M, Popescu O and Deák P: **Az USP5 és az apoptózis kapcsolata *Drosophila melanogaster*ben**, Magyar Biokémiai Egyesület 2011. évi Vándorgyűlése, Pécs, 2011.

Kovács L, Nagy O, Pál M, Popescu O and Deák P: **Characterization of the *DmUsp5* deubiquitylation gene in *Drosophila melanogaster***, Ubiquitin-Like Molecules in Disease Meeting, Cambridge, Egyesült Királyság, 2011.

Kovács L, Nagy O, Pál M, Popescu O és Deák P: **Egy dezubikvitiláló enzim genetikai jellemzése *Drosophilában***, IX. Magyar Genetikai Kongresszus és XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Siófok, 2011.

Kovács L, Nagy O, Popescu O and Deák P.: **Deubiquitylation and apoptosis**, From molecules to life and back FEBS 3+ Meeting, Opatija, Horvátország, 2012.

Az eredményeket tartalmazó kézirat elkészült, ezért reményeink szerint még 2012-ben folyóiratcikk formában is megjelenik.

Kérem, hogy a projekt eredményességének minősítését az OTKA később módosítsa a zárójelentésben említett két kézirat sikeres közlésének függvényében.

Szeged, 2012. augusztus 28.

Deák Péter