

XIII. Erdélyi Tudományos Diákköri Konferencia

Kolozsvár, 2010. május 14–16.

## **Az *Usp5* gén szerepe az apoptózis szabályozásában**

**Szerző:**

**Kovács Levente**

Babes-Bolyai Tudományegyetem  
Biológia-Geológia kar  
Molekuláris biotechnológiák szak  
Msc. II. évfolyam

**Témavezetők:**

**Dr. Deák Péter**

Tudományos főmunkatárs  
MTA SZBK Biokémiai Intézete

**Prof. Octavian Popescu**

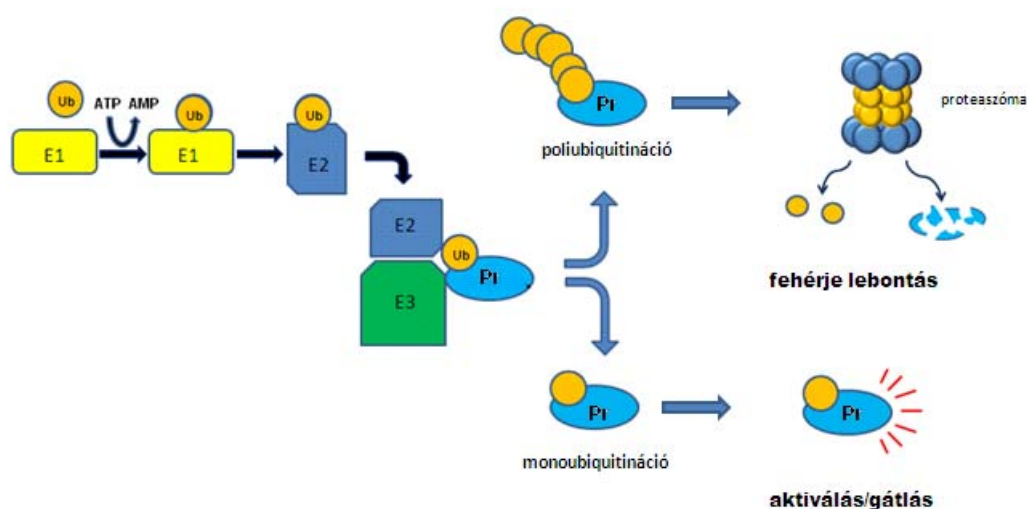
Tudományos főmunkatárs  
Kolozsvári Interdiszciplináris  
Kísérleti Kutatóközpont  
Molekuláris Biológiai Intézet

<b>1. TARTALOMJEGYZÉK</b>	<b>1</b>
2. BEVEZETŐ	2
2.1. AZ UBIKVITINÁCIÓ MECHANIZMUSA ÉS SZEREPEI	2
2.2. A DEZUBIKVITINÁLÓ ENZIMEK	3
2.3. AZ UBIKVITIN-PROTEASZÓMA RENDSZER SZEREPE AZ APOPTÓZIS SZABÁLYOZÁSÁBAN	4
3. CÉLKITŰZÉSEK	6
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	7
4.1. A FELHASZNÁLT <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> TÖRZSEK	7
4.2. BIOINFORMATIKAI MÓDSZEREK	7
4.2. SZEMIKVANTITATÍV, REVERZ TRANZSKRIPCIO KAPCSOLT PCR (RT-PCR)	7
4.3. DELÉCIÓS MUTÁNSOK ELŐÁLLÍTÁSA P ELEM REMOBILIZÁCIÓVAL	8
4.4. MITÓTIKUS KROMOSZÓMA PREPARÁTUMOK KÉSZÍTÉSE	9
4.5. APOPTÓZIS FESTÉS AKRIDIN NARANCCSAL	9
4.6 A MUTÁNSOK LETÁLFÁZISÁNAK MEGHATÁROZÁSA	10
5. EREDMÉNYEK	11
5.1. 24 USP-T KÓDOLÓ GÉNT AZONOSÍTOTTUNK DROSOPHILÁBAN	11
5.2. A <i>CG12082</i> GÉN A HUMÁN USP5 STRUKTURÁLIS ORTOLÓGJÁT KÓDOLJA	11
5.3. A <i>DROSOPHILA</i> Usp5 RNSi ALLÉLJÁNAK MITÓTIKUS FENOTÍPUSA	12
5.4. A <i>CG12082</i> GÉN DELÉCIÓS ALLÉLJAINAK ERŐS APOPTÓTIKUS FENOTÍPUSA VAN	13
5.5. A <i>CG12082</i> MUTÁNSOKBAN MEGEMELKEDIK A PRO-APOPTÓTIKUS GÉNEK EXPRESSZIÓJA	16
6. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	18
7. IRODALMI HIVATKOZÁSOK	19
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	21
9. FÜGGELÉK	22

## 2. BEVEZETŐ

### 2.1. AZ UBIKVITINÁCIÓ MECHANIZMUSA ÉS SZEREPEI

Az ubikvitináció során egy fehérjére kovalens kötással egy ubikvitin molekula vagy több ubikvitinből álló poliubikvitin lánc kapcsolódik. Az ubikvitin egy 76 aminosavból álló polipeptid, amelynek terminális glicin (G76) aminosava izopeptid kötással kapcsolódhat a szubsztrát fehérje egyik lizin aminosavához (Pickart, 1998). Ebben a folyamatban egy három komponensű enzimkaszád vesz részt (1. ábra).



**1. ábra** Az ubikvitináció mechanizmusának vázlata. Ub: ubikvitin; E1: ubiquitin-aktiváló enzim; E2: ubiquitin-konjugáló enzim; E3: ubiquitin-ligáz, Pr : célfehérje.

Az első lépésben az ubikvitint az E1, vagy ubiquitin-aktiváló enzim ATP és  $Mg^{2+}$  jelenlétében aktiválja. Ezt követően az E2, ubiquitin-konjugáló enzim átveszi az ubikvitint, tioészter kötést létesítve vele. A harmadik lépésben az E3 ubiquitin-ligáz kölcsönhatásba lép mind az aktivált ubikvitin megkötő E2-vel, mind a szubsztrát fehérjével, katalizálja az izopeptid kötés kialakulását a célfehérje valamely kitüntetett lizinjének  $\epsilon$ -aminocsoportja és az ubikvitin C-terminális Gly76 karboxil-csoportja között (Hochstrasser, 1996). Mivel ez utóbbi enzim ismeri fel és köti meg a szubsztrát fehérjéket ez határozza meg a folyamat specificitását. A reakciósor többszöri ismétlődésével alakul ki a poli-ubikvitin lánc. A poli-ubikvitin láncban az első ubikvitin lizin aminosava és a következő ubikvitin C-terminális glicin aminosava között alakul ki az izopeptid kötés. A K48 lizinen keresztül kapcsolódó poli-

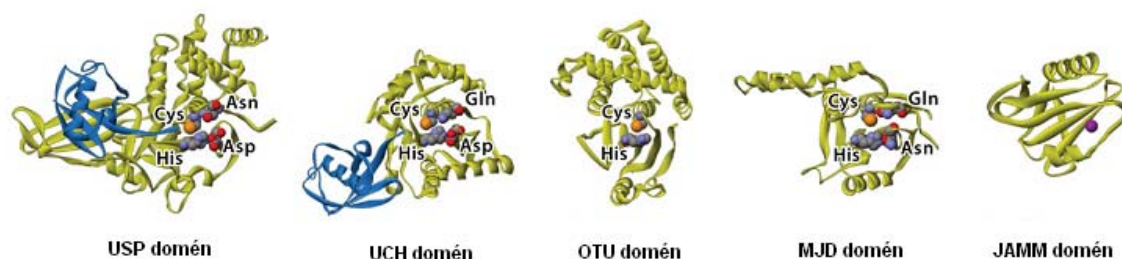
ubikvitin lánc a célfehérjét a 26S proteaszóma általi lebontásra itéli. A K63 típusú ubikvitin lánc a fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakításában játszik szerepet.

Ha a szubsztrát fehérje enzimaktivitással rendelkezik akkor annak egyet ubikvitin molekulával történő megjelölése (mono-ubikvitinációja) olyan konformáció változásokat idézhet elő, amely megváltoztathatja aktivitását.

Az ubikvitináció olyan alapvető sejtbiológiai folyamatokban játszik szerepet, mint például a génexpresszió szabályozása, fehérjelebontás, enzimaktivitás szabályozása, vagy különböző jelátviteli utak működésének modulálása (Pickart és Eddins, 2004). Nélkülözhetetlen a szerepe a sejtciklus szabályozásában és a programozott sejthalál (apoptózis) kontrollálásában.

## 2.2. A DEZUBIKVITINÁLÓ ENZIMEK

Mint a foszforilálásnak a defoszforilálás, úgy az ubikvitinációnak is meg van a folyamatot ellentétes irányban katalizáló megfelelője. Ezt a reakciót a dezubikvitináló enzimek (dezubikvitinázok, DUB-ok) hajtják végre, amelyek képesek eltávolítani az ubikvitint a polipeptidekről. A DUB-ok a proteázok szupercsaládjába tartoznak. A katalízisben szerepet játszó konzervált doménjeik alapján öt alosztályát különíthetjük el a dezubikvitinázoknak: ubikvitin specifikus proteázok (USP), ubikvitin C-terminális hidrolázok (UCH), Machado-Joseph domént tartalmazó proteázok (MJD), OTU domént tartalmazó proteázok (OTU), JAMM motívumot tartalmazó proteázok (JAMM). Az első négy alosztály enzimeit cisztein proteázok, a JAMM-ok pedig a metalloproteázok osztályába tartoznak (Nijman és mtsai, 2005). A DUB alosztályok konzervált katalitikus doménjeit a 2. ábra szemlélteti.



**2.ábra** A dezubikvitináló enzimek alosztályaira jellemző konzervált katalitikus domének szerkezete. Cisztein proteázok esetében a cisztein, a hisztidin és az aszparaginsav képezik a katalitikus triádot, amelynek tiolészteráz aktivitása felszakítja az ubikvitin és a célfehérje vagy a két ubikvitin közötti kötést. Van der Waals gömbökkel a katalitikus centrum, sárgával az enzim, kékkel pedig az ubikvitin van jelölve (Nijman és mtsai, 2005, *Cell* 123: 774 alapján).

A dezubikvitinázok aktivitásának köszönhetően az ubikvitin illetve a poli-ubikvitin lánc eltávolítható a szubsztrátról, így annak az aktivitása megváltozhat vagy megnőhet a féléletideje a sejtben belül. Ugyanakkor egyes DUB-ok monomerekre bontják a szabad poli-ubikvitin láncokat ezáltal hozzájárulnak a sejt felhasználható monoubikvitin készletének fenntartásához (Amerik és mtsai, 1997).

Az ubikvitinációval elletétben a dezubikvitináló enzimek csak az utóbbi évtizedben váltak intenzíven kutatottá. Sorra azonosítottak élesztő és emlős dezubikvitinázokat, de a működési mechanizmusuk és a biológiai folyamatokban betöltött funkciójuk kevésbé tisztázott.

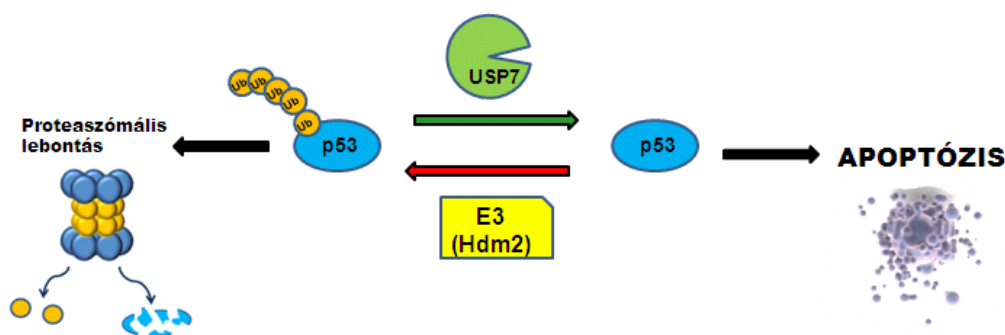
### **2.3. AZ UBIKVTIN-PROTEASZÓMA RENDSZER SZEREPE AZ APOPTÓZIS SZABÁLYOZÁSÁBAN**

A programozott sejthalál vagy más néven apoptózis a többsejtű organizmusokat felépítő sejteknek egy meghatározott program szerinti szabályozott öngyilkossága. Egyrészt bekövetkezhet külső jelek hatására, például vírusfertőzéskor a makrofágok által kiváltott halálszignálok vagy az egyedfejlődés során a túlélési faktorok megvonása következtében. Másrészt a sejtet károsító stressz hatások, a DNS-t károsító sugárzások egy szintén apoptózishoz vezető belső, mitokondriális jelátviteli útvonalat indukálnak. Mindkét útvonal végső soron az apoptózis végrehajtó fehérjéit, a kaszpázokat aktiválja (Fésüs és Fenyőfalvi, 2009). E folyamat szabályozásában jelentős szerepet játszik ubikvitin-proteaszóma rendszer is (Bader és Steller, 2009)

A kaszpázokat normál körülmények között inaktív állapotban tartó apoptózis gátló fehérjék (IAP-k) tulajdonképpen E3 ubikvitin-ligáz enzimek (Yang és mtsai, 2000). Apoptótikus jel hiányában BIR doménjük segítségével megkötik a kaszpázokat és degradatív módon poli-ubikvitinálják őket, ezáltal az kaszpázok mennyiségét alacsony szinten tartják a sejtben. Ugyanígy módon szabályozzák más pro-apoptótikus fehérjék mennyiségét is. Ezáltal az IAP-k ubikvitin-ligáz aktivitása gátat szab a spontán apoptózisnak. Apoptótikus jelzésre azonban az IAP-k önmaguk ubikvitinációját (autoubikvitináció) és proteaszómális lebontását katalizálják, lehetőséget teremtve a kaszpázok aktiválódására és az apoptózis beindulására.

A DNS károsodások hatására indukálódó p53 fehérje szabályozása is az ubikvitin-proteaszóma rendszeren keresztül valósul meg (3.ábra). A HDM2 E3 ubikvitin-ligáz poli-

ubikvitinálja a p53-at és ezáltal proteaszómális lebontásra ítéli. Az USP7 dezubikvitináló enzimnek is szerepe van a p53-on függő apoptótikus folyamatok szabályozásában. Apoptótikus stimulus hatására a HDM2 működésével ellenkező módon eltávolítja a poliubikvitin láncot a p53-ról, ezáltal stabilizálva azt. Ezt követően a p53 a belső, mitokondriális útvonal aktiválásán keresztül a sejt apoptótikus halálát idézi elő (Ventii és Wilkinson, 2008).



**3. ábra** Az ubikvitin-proteaszóma rendszer szerepe a p53 pro-apoptótikus transzkripciós faktor szabályozásában. Normál körülmények között az HDM3 ubikvitin-ligáz, apoptótikus jelzések hatására pedig az USP7 dezubikvitináz hatása érvényesül.

Az USP7-en kívül más dezubikvitináló enzimek is szerepet játszhatnak az apoptózis szabályozásában. Az Et (Emperor's thumb – A császár hüvelykujja) dezubikvitinázról bebizonyították, hogy a fehérje hosszú formája gátolja, rövid formája pedig stimulálja az apoptózist (Ribaya és mtsai, 2009).

Számos kísérlet igazolta az ubikvitin-proteaszóma rendszer nélkülözhetetlen szerepét az apoptózis szabályozásában. Azonban e rendszer dezubikvitinázokat magába foglaló komponense kevésbé jellemzett. Ezeknek az enzimeknek az apoptózisban betöltött szerepe kapcsán számos kérdés nyitva maradt. Az én kísérleteimnek is a célja a sejtciklus szabályozásban és az apoptózisban szerepet játszó dezubikvitináló enzimek azonosítása és működési mechanizmusának vizsgálata.

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

A dezubikvitináló enzimeket eddig elsősorban élesztőben és emlősökben, humán sejtvonalakban azonosították és vizsgálták. Az egyes alosztályokba tartozó dezubikvitinázok szerkezete nagyfokú homológiát mutat, viszont a többsejtű organizmus életében betöltött szerepük kevésbé tisztázott. A DUB-ok funkciójának megismerését segítené, ha azonosítanánk és vizsgálnánk őket a többsejtű eukarióta modellorganizmusban, *Drosophila melanogaster*ben.

Az *ecetmuslica* egy évszázados laboratóriumi múltra visszatekintő modellorganizmus, teljes genomszekvenciája ismert. Széles genetikai eszköztárral rendelkezik, ami az egyes gének mutációinak előállításában hatékonyan alkalmazható. A Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézetének Intracelluláris Fehérjedegradáció munkacsoportjában kidolgozott módszerek állnak rendelkezésre a sejtosztódás szabályozásában és az apoptózisban szerepet játszó gének azonosítására.

Célom, és feladatom a sejtosztódásban és az apoptózisban szerepet játszó ubikvitin specifikus proteáz (USP) alosztályba tartozó dezubikvitináló enzimek azonosítása és jellemzése *Drosophilában*. Ezt a következő lépésekene keresztül terveztünk megvalósítani:

1. humán és élesztő DUB-ok *Drosophila* ortológjait kódoló gének azonosítása bioinformatikai módszerekkel.
2. RNS interferenciás és P elem inszerciós allélok beszerzése törzsközpontokból
3. a beszerzett törzsek jellemzése letálfázisuk és a célgén expressziójának csökkenése szempontjából.
4. a letális fenotípust mutató, a célgén funkcióját igazoltan érintő mutánsok mitótikus és apoptótikus fenotípusának meghatározása
5. funkció sérülés esetén mitótikus/apoptótikus fenotípushoz vezető gének esetén azok funkcióját tovább vizsgálni, új, erősebb allélokat előállítani.

## **4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

### **4.1. A FELHASZNÁLT *DROSOPHILA MELANOGASTER* TÖRZSEK**

A kísérletekben felhasznált törzseket standard *Drosophila* kukoricadara- élesztő táptalajon tartottuk. A kísérleteket 25 °C- on végeztük. A törzsgyűjtemény a 18 °C-on tartottuk fenn. A homológia szűréshez szükséges RNS interferenciás és P elem inszerciós vonalakat Bloomington (Indiana university, USA), Bécsi és a Szegedi *Drosophila* törzsközpontokból szereztük be. A deléciós mutánsok előállításához használt *CG12082<sup>EY23569</sup>* és *CG12082<sup>EY20760</sup>* P elem inszerciós vonalakat szintén a Bloomington-i törzsközpontból rendeltük. A használt genetikai markerek leírása megtalálható a FlyBase-ben (<http://flybase.org>). A vizsgálni kívánt letális allélokot vagy transzgenikus konstrukciókat hordozó kromoszómákat *CyO*; *CyO,GFP*; *SM6*, *TM3*, *Sb Ser* és *TM6b*, *Tb Hu* balanszer kromoszómák fölött tartottuk fenn.

### **4.2. BIOINFORMATIKAI MÓDSZEREK**

Elsősorban a Nijman és mtsai (2005) összefoglaló közleményben leírt humán dezubikvitináló enzimeknek kerestük a *Drosophila* ortológjait. Az homológia szűrés során a Flybase, NCBI és UniProt adatbázisokat és azok BLAST kereső programjait használtuk. Egyes esetekben a lokális összehasonlításokkor a JustBio honlap Aligner programját vettük igénybe.

### **4.2. SZEMIKVANTITATÍV, REVERZ TRANZKRIPCIÓ KAPCSOLT PCR (RT-PCR)**

Az egyes gének expressziójának mérésére a mintákból átírt cDNS-en telítési ciklusszám alatti ciklussal, DNASTAR programmal tervezett specifikus, valamint kontrollként a *Drosophila L17* riboszómális fehérjét kódoló génre tervezett *rpL17A* primerpárokkal polimeráz láncreakciót végeztünk. Telítési ciklusszám alatt a képződő termék mennyisége arányos a templát DNS mennyiségével.

A megfelelő állatokból az RNS mintákat Tri Reagent extrakciós kittel (Sigma) izoláltuk. Amennyiben szükséges volt, a mintákat RQ1 RNase-Rfree DNase-zal kezeltük (Promega). Az RNS minták épségét gélelektroforézissel ellenőriztük; a nem degradálódott



mintákban jól látható 2kb-nál a 18S riboszómális RNS alkotta éles sáv. 5 $\mu$ g totál RNS templátról M-MuLV reverz transzkriptázzal (Fermentas) random hexamer primert használva cDNS-t szintetizáltunk. A polimeráz láncreakciókat Go-Taq (Promega) hőstabil polimerázzal végeztük, standard körülmények között (2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 0.2 mM primer). Az *rpL17A* primerekkel kapott termék mennyisége alapján kalibráltuk a specifikus primerekkel végzett PCR reakciókba bemért templát mennyiségeket. A PCR-termékeket agaróz gélelektroforézissel szétválasztva detektáltuk. A homológia szűrésben használt összes primer szekvenciáját e dolgozat keretében nem részletezem. A *CG12082* gén vizsgálatához felhasznált primerek:

*rpL17A* upper: 5'-GTGATGAACTGTGCCGACAA-3'

lower: 5'-CCTTCATTTCCGCCCTTGTTG-3'

*CG12082* RT upper: 5'-CGACCCGGCCAACGACTTCAAT-3'

lower: 5'-CCGCCTCGTCAAATGCAAACCTTCA-3'

### 4.3. DELÉCIÓS MUTÁNSOK ELŐÁLLÍTÁSA P ELEM REMOBILIZÁCIÓVAL

Kísérleteim során a *Drosophila* P-elemére épülő mutagenézis technikával hoztam létre a deléciós mutáns törzseket. A módszer lényege, hogy a célgén közelében lévő P elemet transzpozáz bevitelével kivágjuk a genomból. A P elem kivágódása legtöbbször pontosan történik meg, ezt precíz kivágódásnak nevezzük. Az eseteknek egy részében a kivágódás nem precíz, ezért a P elemmel szomszédos szekvencia egy része is elveszik, és deléció keletkezik. A deléciót a célgénre specifikus primerek segítségével, PCR-rel tudjuk azonosítani. A reakcióban a deléciós kromoszómáról kisebb termék keletkezik, mint a vad típusról.

A *CG12082* jelű, 3. kromoszómás gén P elem inszerciós alléljaiból (*CG12082<sup>EY23569</sup>* és *CG12082<sup>EY20760</sup>*) kiindulva hoztam létre a gén érintő deléciókat.

A *CG12082<sup>EY23569</sup>/TM3* és *CG12082<sup>EY20760</sup>/TM3* szüzeket tömegben *w<sup>+</sup>*, *Df(3R)C4/TM3*, *Sb P(Δ2-3)*, transzpozáz termelő hímekhez kereszteztem. Az utódok közül *CG12082<sup>EY23569</sup>/TM3, Sb P(Δ2-3)* vagy *CG12082<sup>EY20760</sup>/TM3, Sb P(Δ2-3)* hímekben történik meg a P elem remobilizációja, ezért ezeket az úgynevezett „*jump-startereket*” egyesével harmadik kromoszómás balanszert hordozó *TM3, Sb Ser /TM6b, Tb Hu* szüzekhez kereszteztük. A kikelő utódok között kerestünk P elemet vesztett, fehér szemű egyedeket, ezeket balanszer kromoszóma segítségével törzsbe állítottuk. A P elem precíz kivágódásakor

visszaáll a vad fenotípus, az ilyen kromoszómára nézve homozigóta legyek életképesek és fertilisek. A *CG12082* gént érintő deléció a P elemeken kívülre, a szomszédos génekbe tervezett primerekkel végzett PCR-reakcióval azonosítottam.

Felhasznált primerek:

*CG12082* deléció upper: 5'-GCAAAACAACGCCGAAAACACTG-3'

lower: 5'-AGCTGCGTGTAAGATGGGAGACC-3'

A PCR reakcióhoz templátként a MACHEREY-NAGEL NucleoSpin® Tissue kittel illetve a BDGP (*Berkeley Drosophila Genome Project*) „1 légy PCR” protokoll alapján izolált DNS-t használtam.

1 légy PCR: 0.5µl 20mg/ml ProteinázK-val kiegészített 50µl SB pufferben (10mM TrisCl pH8.2, 1mM EDTA, 25mM NaCl) homogenizálunk egy legyet vagy bábót, fél óráig 37°C-on inkubáljuk, majd 95°C-on 2 perc alatt inaktiváljuk az enzimet. Az így kapott oldat közvetlenül belemérhető a PCR-reakcióba vagy 4 °C tárolható.

#### **4.4. MITÓTIKUS KROMOSZÓMA PREPARÁTUMOK KÉSZÍTÉSE**

Vándorló harmadik stádiumos lárvák agyát 0.7%-os NaCl-ban boncoltuk, az imágókorongokat eltávolítottuk. Az agyakat 45%-os ecetsavban fixáltuk. Ezután 45%-os ecetsavban oldott orceinnel festettük 4 percig, és 60%-os ecetsavval mostuk őket. Végül a tárgylemezre helyeztük 60%-os ecetsavban oldott 5%-os orceinbe, majd lefedve préseltük a preparátumot. Egy preparátumon kb. 30 látómezőt vizsgáltunk Olympus BX 51 fáziskontraszt mikroszkóppal. Az értékeléshez 100x-os nagyítású immerziós lencsét használtunk.

Az orcein megfesti az osztódó sejtekben kialakuló kromoszómákat. A mitotikus fenotípust a mitózisban lévő sejtek száma, az anafázis-metafázis aránya és az apoptotikus sejtek száma alapján értékeltük, vad típusú preparátumokhoz viszonyítva.

#### **4.5. APOPTÓZIS FESTÉS AKRIDIN NARANCCSAL**

Vándorló harmadik stádiumos lárvák fejét 1,6 µg/ml akridin narancs festéket tartalmazó PBS cseppben 5 percig festjük. Ezt követően 3 X 5 percig mossuk PBS-ben. Az utolsó mosás során eltávolítjuk a fej többi részét, az agyat meg az imágókorongokat friss PBS cseppben tárgylemezre helyezük. A preparátumot epifluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáljuk és fotózzuk.

#### 4.6 A MUTÁNSOK LETÁLFÁZISÁNAK MEGHATÁROZÁSA

A letálfázis alatt az értjük, hogy egy adott gén funkciójának kiesése milyen fejlődési stádiumban okozza az állatok pusztulását. Ennek meghatározása érdekében kis Petri-csészékbe öntött agar, gyümölcsle és cukor alapú táptalajra helyezett 5 cm átmérőjű és 12 cm magas csövekben petéztettük a RNS interferencia konstrukciót meghajtó keresztezéseket, illetve a mutánsokat. Az optimális mennyiségű petezés érdekében 30-30 pár legyet helyeztünk a petéztetőkbé. A fehér peték és lárvák jobb észrevehetősége érdekében aktív szénrel előzőleg feketére festettük a táptalajt. A Petri-csészéket 12 óránként cseréltük.

A letálfázis meghatározásához egyidős, második stádiumos lárvákat gyűjtöttünk a Petri-csészékről fiolákba. A meghajtott konstrukciót hordozó illetve homozigóta lárvák azonosítását a második stádiumban kifejeződő *Tb* marker segítségével végeztük (az RNSi-t meghajtó drivert nem hordozó lárvák, illetve a heterozigóták mutatták a *tubby* fenotípust). Allélonként 200-400 lárvát gyűjtöttünk ki ötvenesével fiolákba és nyomon követtük az egyedfejlődésüket. A különböző stádiumokat Bainbridge és Bownes 1981-es közleményében leírtak alapján határoztuk meg.

## **5. EREDMÉNYEK**

### **5.1. 24 USP-T KÓDOLÓ GÉNT AZONOSÍTOTTUNK DROSOPHILÁBAN**

31 humán USP fehérjének 24 *Drosophila* ortológját azonosítottuk. A számbeli különbség onnan adódott, hogy bizonyos esetekben két humán dezubikvitináznak közös volt a *Drosophila* ortológja. Ennek a magyarázata az evolúció során többször bekövetkezett gén és genom duplikációk, amelyek közös ősrre visszavezethető homológ fehérjéket eredményezhetnek. Az egyes ortológok az USP-kre jellemző katalitikus cisztein és hisztidin doméneken kívül a fehérje más szakaszain is nagymértékű hasonlóságot mutattak.

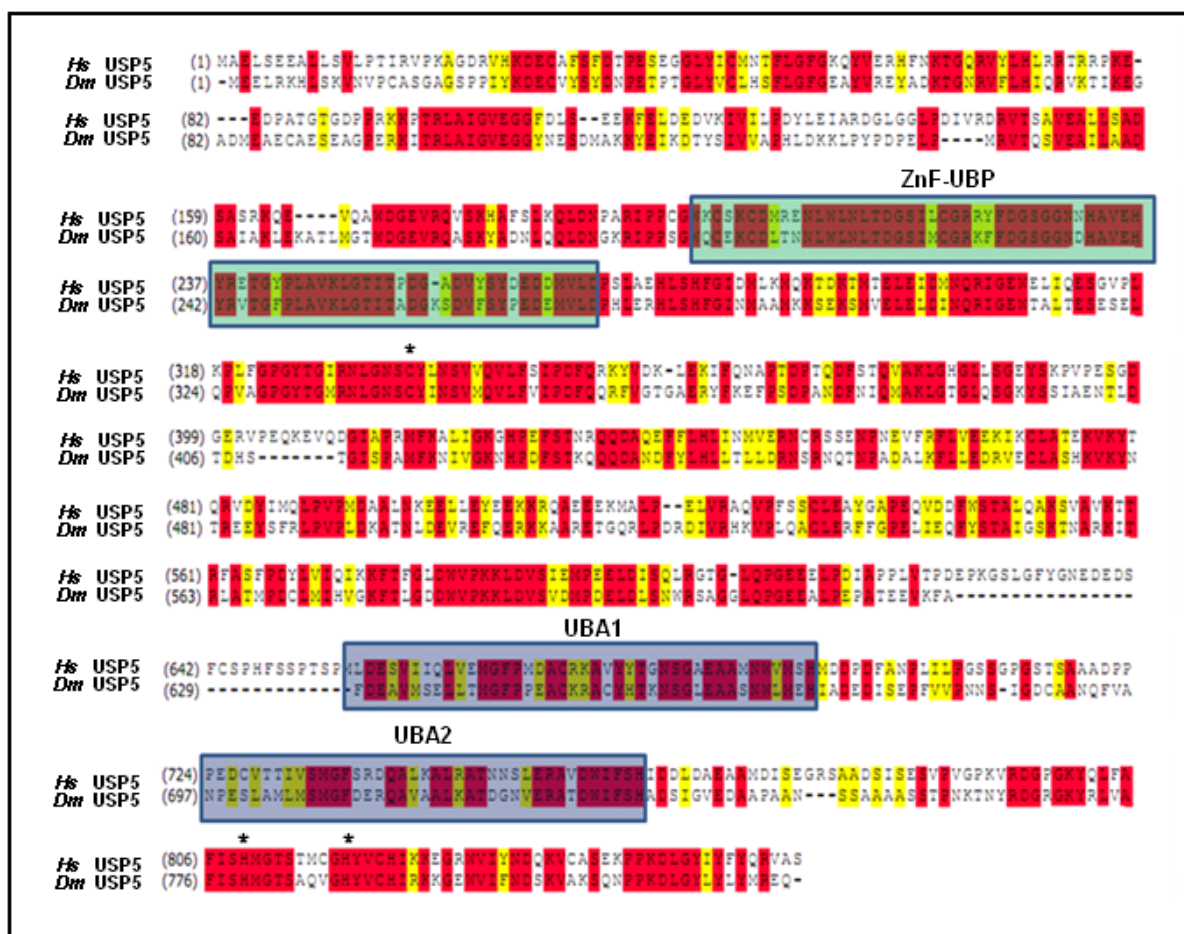
A potenciális *Drosophila* USP-ket kódoló géneknek 28 RNS interferenciás és 9 P elem inszerciós allélját sikerült beszereznünk. A letálfázis meghatározás után megállapítottuk, hogy ezekből az allélokból 12 darab életképes és fertilis, 2 darab életképes és steril, 8 darab szemletális, 4 darab farát adult, 2 darab báb és 9 darab lárva állapotban vezet az állatok pusztulásához. Az RT-PCR-rel megvizsgált allélok közül 21 esetben igazoltuk, hogy az adott allél csökkenti a gén expresszióját, míg 11 esetben nem tapasztaltunk változást a gén expressziójában a kontrollhoz képest. A célgént expresszióját igazoltan befolyásoló allélokat hordozó törzseknek megvizsgáltuk a mitótikus fenotípusát. Csupán három esetben tapasztaltuk változást a mitótikus fenotípusban. A homológia szűrés részleteit a függelékben mellékeltem I. táblázatban tüntettem fel.

A továbbiakban a humán USP5 *Drosophila* ortológját kódoló *CG12082* jelzésű gént vizsgáltam részletesebben, mivel RNSi alléljának esetében a további vizsgálatra érdemes mitótikus fenotípust tapasztaltunk.

### **5.2. A *CG12082* GÉN A HUMÁN USP5 STRUKTURÁLIS ORTOLÓGJÁT KÓDOLJA**

Az UniProt adatbázisban található humán USP5 fehérje szekvenciáját a FlyBase BLAST kereső programba illesztve a *CG12082 Drosophila* génről képződő fehérjét kapjuk, mint legnagyobb hasonlóságot mutató szekvenciát. A fehérje teljes hosszán nagymértékű a homológia és az adott pozícióban található aminosavak 48 % -a azonos. A poli-ubikvitinnel való kölcsönhatásáért felelős UBP típusú cinkujj (ZnF-UBP) illetve az UBA1 és UBA2

doméneket alkotó aminosavak jelentős része azonos a két fehérjében. A két aminosav szekvencia összehasonlítása a 4. ábrán látható.

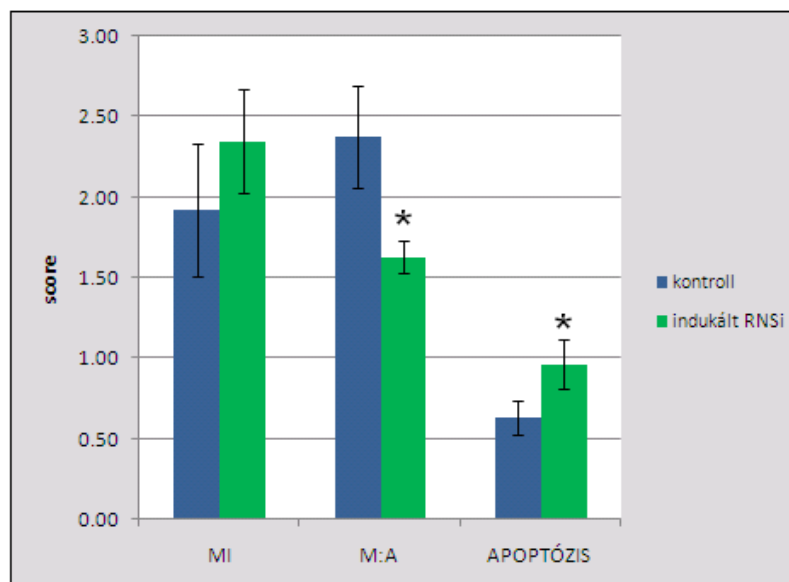


4. ábra A humán USP5 (*Hs USP5*) és a *Drosophila* USP5 (*Dm USP5*) fehérjék szerkezetének összehasonlítása. Piros színnel az azonos, sárgával a hasonló aminosavak vannak kiemelve. Csillagokkal a katalitikus cisztein és hisztidin aminosavak vannak jelölve. Halvány zöld, illetve kék kiemeléssel az USP5 ubikvitin kötésében szerepet játszó UBPs típusú zinkujj (ZnF-UBP) illetve UBA1 és UBA2 doménjét alkotó aminosavak vannak jelölve. Látható, hogy a fehérje teljes hosszában nagymértékű a homológia.

### 5.3. A *DROSOPHILA* USP5 RNSi ALLÉLJÁNAK MITÓTIKUS FENOTÍPUSA

A CG12082 RNSi meghajtott RNSi allélját hordozó L3 vándorló lárvákból 5 darab mitotikus preparátumot készítettünk. Ezeket összesen 150 látómezőt leszámolva határoztuk meg a mitotikus indexet (MI), a metafázis-anafázis arányt (M:A) és az apoptózis indexet. Négy darab kontroll preparátumot a nem meghajtott RNSi konstrukciót hordozó lárvákból

készítettünk. A kapott adatok alapján meghatározott mitótikus fenotípust az 5. ábrán látható grafikon szemlélteti.

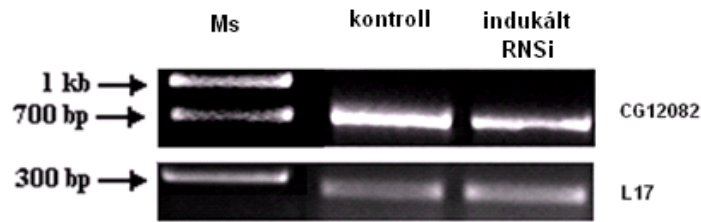


**5. ábra** A *CG12082* indukált RNSi alléljának mitótikus fenotípusa. MI: mitótikus index, M:A: metafázis:anafázis arány, APOPTÓZIS: az apoptózis index.

A mitótikus indexben nem tapasztaltunk eltérést. A metafázis:anafázis arány szignifikánsan alacsonyabb volt a megemelkedett anafázisban lévő sejtek száma miatt. Az indukált RNSi vonal esetében az apoptózis index szignifikánsan magasabb volt, a preparátumokban sok volt az apoptótikus sejt.

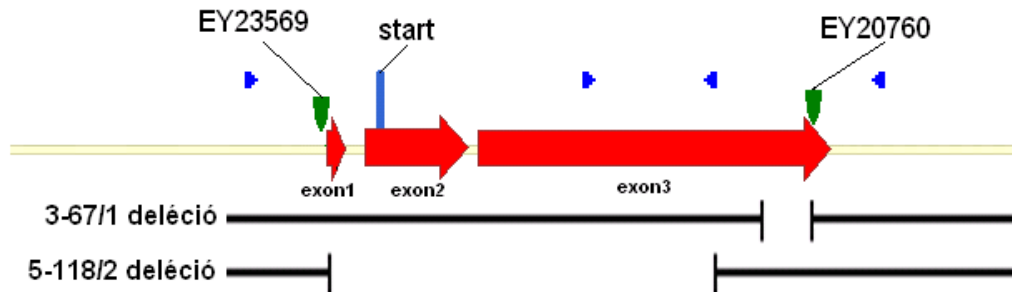
#### **5.4. A *CG12082* GÉN DELÉCIÓS ALLÉLJAINAK ERŐS APOPTÓTIKUS FENOTÍPUSA VAN**

Mivel az RNS interferenciás allélok csak lecsökkentik a célgénről képződő mRNS mennyiségét, de azt nem képesek teljes mértékben eliminálni, ezért csak hipomorf fenotípus megnyilvánulását okozhatják. A *CG12082* gén esetében az RNSi allélnál csak gyenge mitótikus fenotípust tapasztaltunk, amelyet a géntermék kis mértékű csökkenése okozhat (6. ábra).



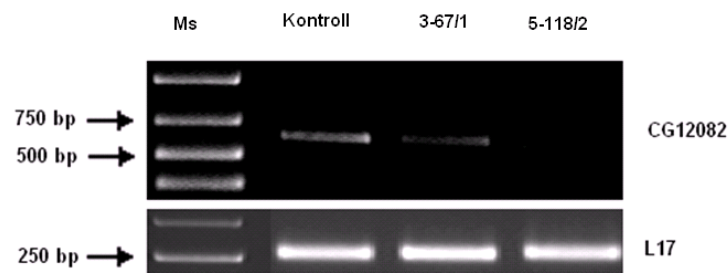
**6.ábra** A *CG12082* RNSi allél lecsökkenti a gén expresszióját. Felső sorban a *CG12082*-re specifikus RT primerekkel kapott termékek, az alsó sorban az L17 bemérési kontroll látható.

Egy erősebb fenotípus reményében a *CG12082* gén 5' nem kódoló régiójába, illetve a 3' régióba inszertálódott P elemek remobilizációjával két deléziós allélt állítottam elő (7.ábra).



**7.ábra** A *CG12082* gén szerkezete és a deléciók kiterjedése. Pirossal a gén exonjai vannak kiemelve. A fekete vonalakon látható megszakított rész a deléció kiterjedését jelöli. Zöld nyilak a P elemek inszerciós helyét, a kis kék nyilak a deléziós (génen kívül eső) és RT primerek (az exon3-ban) kötőhelyét jelöli. A deléciók elnevezésénél az első szám P elemre utal (az 5' vagy 3' P elem remobilizációja okozta-e a deléciót), a többi számjegy a mutánsként azonosított jelölt sorszáma.

A deléziós fragmentumok szekvenálásával pontosan meghatároztuk a deléciók hosszát és töréspontjait. Az 5' P elem remobilizációjával előállított 5-118/2 deléció 2147 bp kiterjedésű, eltörli a *start* kodont és a kódoló szekvencia jelentős részét, így a a génről nem képződhet termék. A 3' P elem remobilizációjával egy kisebb, 275 bp hosszúságú deléciót kaptam, amit 3-67/1 jelöléssel láttam el. Ez eltörli a katalitikus hisztidin boxot és az UBA2 domént kódoló szekvenciát, így a képződő trunkált mRNS-ről nem képződhet funkcionális fehérje. A delécióknak a gén expressziójára gyakorolt hatását RT-PCR-rel mutattuk ki (8.ábra).



**8. ábra** A *CG12082* gén expressziója a 3-67/1 és 5-118/2 deléciós homozigótákban. A 3-67/1 deléció nagymértékben csökkentette az mRNA mennyiségét, a képződő mRNA-ról pedig nem termelődhet funkcionális fehérje. Az 5-118/2 deléció esetében az elvárásoknak megfelelően nem képződik géntermék.

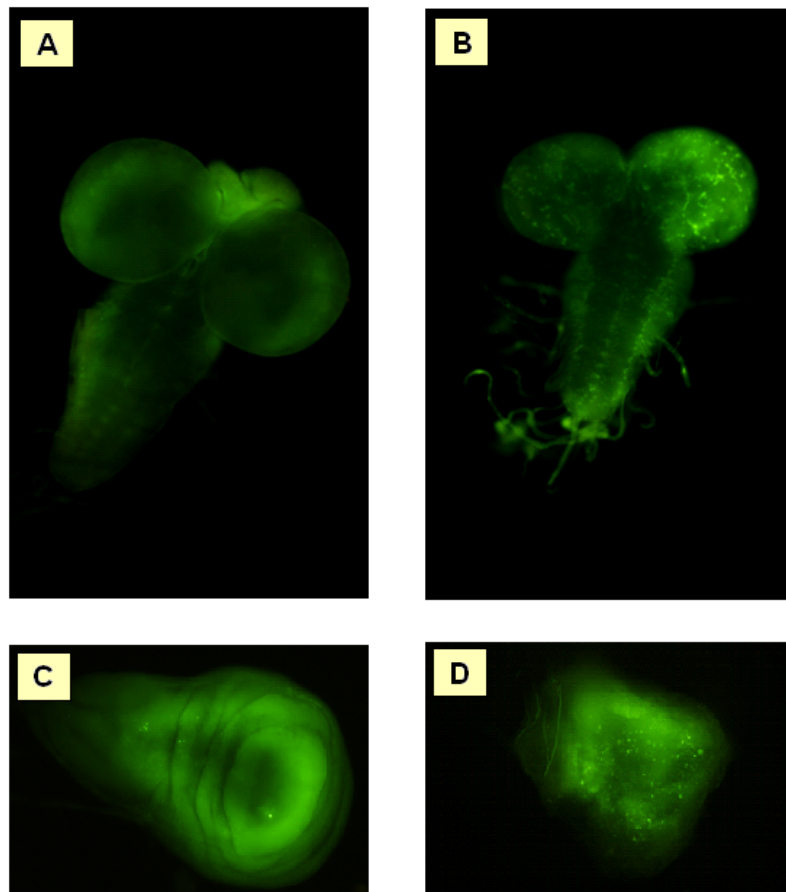
Mindkét deléciós mutánsok fejlődése leállt az L3 lárvastádiumban. Öt napig életben maradtak ebben a stádiumban stagnálva, majd elpusztultak. Az indukált RNSi allél bábstádiumbeli letalitásához viszonyítva korábbi, lárva letalitás is utal arra, hogy a deléciós allélok erősebb fenotípust produkálnak.

A *CG12082*<sup>3-67/1</sup>/*CG12082*<sup>5-118/2</sup> deléciós transzheterozigótákból, illetve a homozigótákból akridin narancssal festett preparátumokat készítettünk. Mivel mind a transzheterozigóták, mind az egyes deléciókra homozigóták 5 napig stagnáltak L3 stádiumban, különböző időpontokban készítettünk preparátumokat: 1 napos L3, 3 napos L3 és 5 napos L3 lárvákból.

Az mutáns lárvák agya méretében kisebb volt a vad típusú agyhoz képest. A 3 napig és 5 napig L3-ban stagnáló lárvák agyában nagymértékben megemelkedett az apoptotikus sejtek száma (9.ábra, B). A 3 napnál kevesebbet stagnáló lárvák agya a vad típusúhoz hasonló festődést mutatott.

A mutáns szárny diszkuszok alakja rendellenes és magas bennük az apoptotikus sejtek száma attól függetlenül, hogy hány napig stagnáltak az lárvák L3 stádiumban (9.ábra, D).



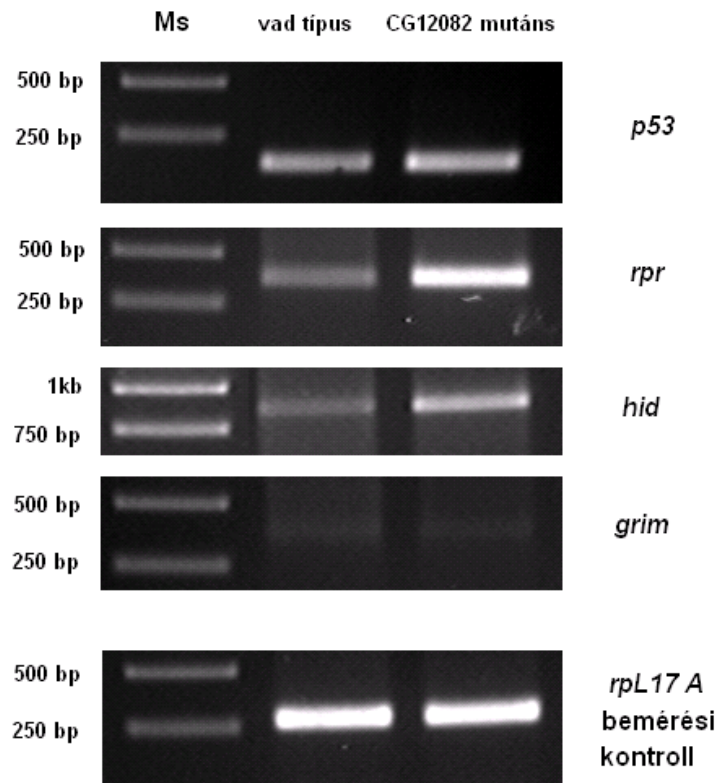


**9.ábra** A vad típusú (A és C ) és *CG12082* mutáns (B és D) lárvák agyából illetve szárny diszkuszából akridin narancs festéssel készített preparátumok. A kis zöld pontok az apoptotikus sejteket jelölik.

### **5.5. A *CG12082* MUTÁNSOKBAN MEGEMELKEDIK A PRO-APOPTÓTIKUS GÉNEK EXPRESSZIÓJA**

A *CG12082* deléciós mutánsok agyából és a hozzá tapadt imágokorongokból RNS-t izoláltam, majd RT-PCR-rel megvizsgáltam az *hid*, *reaper* (*rpr*) és *grim* pro-apoptotikus gének expresszióját. Ezek a gének a *Drosophilában* gátolják az apoptózis inhibitor fehérjéket (IAP-eket) és ezáltal hozzájárulnak a kaspázok aktivációjához. Apoptózis során mindhárom gén fokozott expresszióját leírták, de önmagában egyikük expressziója is elégséges az apoptózis kiváltásához (Yoo és mtsai, 2003).

A 10. ábrán látható, hogy a három gén közül, kettőnek, a *rpr* és *hid* géneknek expressziója jelentősen megemelkedett a mutánsok agyában. A *grim* pro-apoptotikus gén expressziója a vad típushoz hasonlóan alacsony szinten maradt.



**10. ábra** A pro-apoptótikus gének expressziója a *CG12082* mutáns agyában és imágókorongjaiban. A *rpr*, a *hid* és kis mértékben a *p53* gén expressziója is megemelkedett, ellenben a *grim* expressziója nem változott.

Megvizsgáltuk a tumorszupresszorként is ismert p53 fehérjét termelő gén expresszióját is. Ez a fehérje a DNS-t károsító sugárzások hatására aktiválódik és fokozza a *rpr* gén transzkripcióját (Brodsky és mtsai, 2000). Azt tapasztaltuk, hogy a *p53* expressziója csak kis mértékben emelkedik meg. Ez még nem elégséges bizonyíték arra, hogy a mutánsok agyában tapasztalt apoptótikus fenotípus p53 függő folyamat.

## **6. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA**

A dezubikvitináló enzimeket több eukarióta organizmusban is azonosították, de a sejt életében betöltött konkrét funkciójuk egyelőre kevésbé tisztázott (Nijman és mtsai, 2005). Munkánk során a humán dezubikvitinázok *Drosophila* ortológjait azonosítjuk és vizsgáljuk elsősorban a sejtciklus szabályozásában és az apoptózisban betöltött szerepüket. A munkafolyamat keretében én a dezubikvitináló enzimek ubikvitin specifikus proteáz (USP) alosztályába tartozó fehérjékkel foglalkoztam.

A homológia szűrés eredményeként, a szekvencia homológia alapján elmondhatjuk, hogy ezeknek az enzimeknek a képviselői megtalálhatóak az ecetmuslicában is. Jelentős részük esszenciális az organizmus számára, az Usp gének expressziójának gátlása az állatok pusztulásához vezet. Az általam vizsgált Usp géneknek nincsen olyan erős mitotikus fenotípusa, mint például a sejtosztódásban szerepet játszó ubikvitin-ligázoknak.

A munkám során azonosítottam a humán USP5 strukturális ortológját *Drosophilában*, amelyet a *CG12082* gén kódol. A két fehérje szerkezete evolúciósan nagymértékben konzerválódott, így nagy valószínűséggel a *Drosophilában* megismert funkciókhoz hasonló szerepe van az emlősök USP5 fehérjéjének is. A *CG12082* génre előállított mutánsok vizsgálatával sikerült egy funkciót rendelnünk ehhez a fehérjéhez, igazoltuk az apoptózisban játszott szerepét.

Munkámat még nem fejeztem be. A továbbiakban menekítési kísérletekkel igazolni szeretném a funkcionális homológiát is az élesztő Ubp14/humán USP5 és a *Drosophila* USP5 között. Western blott kísérletekkel közelebb szeretnék jutni ahhoz, hogy megismerjük a USP5 apoptózisban játszott szerepének biokémiai hátterét, tisztázni szeretném, hogy az apoptotikus fenotípus p53 függő-e. Kettős mutánsok létrehozásával kölcsönható partnereket azonosítását szeretném elvégezni.

Ha további vizsgálatok megerősítik a fehérje kulcsszerepét az apoptózis szabályozásában, akkor terápiás szerek célpontjává válhat. Az USP5-re specifikusan ható, gátló vagy serkentő hatású gyógyszerek szerepet játszhatnak olyan apoptózissal összefüggő betegség, mint a rák kezelésében.

## **7. IRODALMI HIVATKOZÁSOK**

Amerik, A. Y., S. Swaminathan, B. A. Krantz, K. D. Wilkinson és M. Hochstrasser (1997) In vivo disassembly of free polyubiquitin chains by yeast Ubp14 modulates rates of protein degradation by the proteasome. *EMBO J.* 16: 4826–4838.

Bader, M. és Steller, H. (2009) Regulation of cell death by the ubiquitin-proteasome system. *Curr Opin Cell Biol.* 21(6):878-84.

Bainbridge, S. P. és Bownes, M. (1981). Staging the metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol* 66, 57-80.

Brodsky, M.H., Nordstrom, W., Tsang, G., Kwan, E., Rubin, G.M., Abrams, J.M. (2000) *Drosophila* p53 Binds a Damage Response Element at the reaper Locus. *Cell* 101(1):103-13.

Fésüs L. és Fenyőfalvi Gy. (2009) Sejthalál, *Sejtbiológia* 601-617, szerk. Szabó Gábor, *Medicina* könyvkiadó, Budapest.

Hochstrasser, M. (1996). Protein degradation or regulation: Ub the judge. *Cell* 84, 813-815.

Hochstrasser, M. (1996). Ubiquitin-dependent prtotein degradation. *Annu Rev Genet* 30, 405-439.

Nijman, S.M., Luna-Vargas, M. P., Velds, A., Brummelkamp, T. R., Dirac, A. M., Sixma, T. K. és Bernards, R. (2005). A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* 123, 773–786.

Pickart, C. M. és Eddins, M. J. (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1695, 55–72.

Pickart, C.M. (1998) Polyubiquitin chains, pp. 19-63 in *Ubiquitin and the Biology of the Cell*, edited by J.-M. Peters, J.R. Harris and D. Finley. *Plenum Press, New York*.

Ribaya, J.P., Ranmuthu, M., Copeland, J., Boyarskiy , S., Blair, A.P., Hay, B., Laski, F.A. (2009) The deubiquitinase emperor's thumb is a regulator of apoptosis in *Drosophila*. *Dev Biol.* 329:25-35.

Ventii, V.H. és Wilkinson, K.D. (2008) Protein partners of deubiquitinating enzymes. *Biochem J.* 414:161-175.

Yang, Y., Fang, S., Jensen, J.P., Weissman, A.M., Ashwell, J.D. (2000) Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science* 288:874-877.

Yoo, S.J., Huh, J.R., Muro, I., Yu, H., Wang, L., Wang, S.L. (2002) Hid, Rpr and Grim negatively regulate DIAP1 levels through distinct mechanisms. *Nat Cell Biol* 4:416–24.

## **8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőimnek, Dr. Deák Péternek és Prof. Octavian Popescunak a támogatásukért és szakmai útmutatásukért!

Nagy Olgának és Dr. Pál Margitnak, Varga Katának, Horváth Juditnak és Sajgó Szilárdnak a homológia szűrésben való közreműködésért.

## 9. FÜGGELEK

I. táblázat A USP homológia szűrés eredményeit összefoglaló táblázat

Élesztő ortológ	Humán ortológ	<i>Drosophila</i> ortológ	<i>Drosophila</i> allélok	letálfázis	az mRNS szintje	mitótikus fenotípus
-	CYLD	Cyld (CG5603)	-	-	-	-
-	USP1	CG15817	v41604	erős szemiletális	csökkent	nincs
			v41605	erős szemiletális	nem csökkent	-
Ubp11	USP2	CG14619	v37929	életképes, fertilis	csökkent	nincs
	USP21		v37930	életképes, fertilis	csökkent	nincs
Ubp14	USP5	CG12082	v17567	bábletális	csökkent	anafázisszám kismértékű emelkedése és sok apoptózis
-	USP6	CG8085	-	-	-	-
Ubp15	USP7	Usp7 (CG1490)	v18231	hímletális, nősténysteril	csökkent	nincs
Ubp16	USP8	CG5798	v107623	farát adult letális	csökkent	sok apoptózis
-	USP9X	Faf (CG1945)	v30679	szemiletális	nem csökkent	-
			v30680	szemiletális	nem csökkent	-
-	USP9Y		v2955	életképes, fertilis	csökkent	nincs
			EP(3)381	korai adult letális, steril	nem csökkent	-
Ubp3	USP10	CG32479	v37859	embrió-L1 letális	-	-
			CB-6882-3	életképes, fertilis	nem csökkent	-
Ubp9	USP12	CG7023	v27799	gyenge szemiletális	nem csökkent	-
	USP46		v27802	gyenge szemiletális	nem csökkent	-
Ubp6	USP14	CG5384	v27405	életképes, fertilis	nem csökkent	-
			f00779	életképes, steril	csökkent	nincs

Ubp10	USP20	CG8494	v28910	L3 letális	csökkent	nincs
	USP33		v42609	L3 letális	csökkent	nincs
			e04168	embrió-L1 letális	nem csökkent	-
Ubp1	USP30	CG3016	v7090	életképes, fertilis	-	-
Ubp8	USP22	Non-stop (CG4166)	v45775	embrió-L1 letális	-	-
			v45776	embrió-L1 letális	-	-
			5-HA-1189	L3 letális	nincs (null mutáns)	anafázisok számának emelkedése
			CB-5509-3	bábletális	csökkent	nincs
-	USP31	CG30421	v33726	életképes, fertilis	csökkent	nincs
	USP43		v33727	életképes, fertilis	nem csökkent	-
-	USP32	CG8334	v18981	életképes, fertilis	-	-
-	USP34	CG5794	-	-	-	-
Ubp8	USP36	Usp36 (CG5505)	v11152	farát adult letális	csökkent	nincs
	USP42					
-	USP35	CG8830	v28960	életképes, fertilis	csökkent	nincs
	USP38					
SAD1	USP39	CG7288	v47663	L3 letális	csökkent	nincs
Ubp7	USP45	CG4165	v41976	farát adult letális	csökkent	nincs
			v41977	farát adult letális	csökkent	nincs
			EY19835	életképes, fertilis	nem csökkent	-
-	USP47	Ubp64E (CG5486)	v26027	életképes, fertilis	csökkent	nincs
			EP(3)478	L2 letális	csökkent	-
			EP(3)3187	erős szemiletális	csökkent	nincs
PAN2	USP52	CG8232	-	-	-	-
-	USP54	Echinus (CG2904)	-	-	-	-