



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Biológia Doktori Iskola



Doktori értekezés tézisei

**Ubikvitin formák és az ubikvitináció vizsgálata**  
***Drosophila melanogasterben***

Nagy Ágota

Témavezető:

Dr. Deák Péter – egyetemi docens

Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémiai Intézet  
Szegedi Tudományegyetem, Genetika Tanszék

**Szeged**  
**2019**

## Bevezetés

A fehérjék poszttranszlációs ubikvitinációja fontos szerepet játszik a sejt folyamatok szabályozásában. Az ubikvitináció során egy háromlépéses enzimkaskád ubikvitin fehérjéket kapcsol kovalensen a célfehérjékhez. Az ubikvitináció lépéseit az ubikvitin aktiváló (E1), ubikvitin konjugáló (E2) és az ubikvitin ligáz (E3) enzimek katalizálják. A folyamat eredményeképpen a fehérjék mono-, multi- vagy poliubikvitinálódnak, ami a módosítás típusától függően befolyásolhatja a fehérjék aktivitását, stabilitását, lokalizációját, illetve kölcsönhatását más fehérjékkel. A legtöbb poszttranszlációs módosításhoz hasonlóan az ubikvitináció reverzibilis, mivel a dezubikvitiláló enzimek (DUB-ok) képesek eltávolítani az ubikvitin jelöléseket. A DUB-ok által felszabadított ubikvitin monomerek újabb reakciókban újrahasznosulnak. Az ubikvitináció és dezubikvitináció ellentétes reakcióinak köszönhetően az ubikvitin állapota a szabad és konjugált forma között váltakozik. A két forma dinamikus egyensúlya pedig létfontosságúnak bizonyult a sejt normális fiziológiájának fenntartásában. Az ubikvitin-egyensúly szabályozásában az ubikvitináció és dezubikvitináció mellett szerepe van még az ubikvitin *de novo* szintézisének és az ubikvitinlebontást végző mechanizmusoknak.

Az ubikvitin-proteaszóma rendszer (UPR) fontos szerepet tölt be az ubikvitin-egyensúly fenntartásában a proteaszóma szubsztrátok ubikvitin jelölésének újrahasznosításával. Az UPR az eukariótákban evolúciós konzerváltságot mutat, működése pedig számos gén szigorú szabályozása alatt áll. Az UPR genetikai boncolását nagyban elősegíti egy olyan módszer, amellyel az UPR-t érintő mutációkban egyszerűen követhetők és mérhetők az ubikvitinkészletben és az eltérő ubikvitin formák arányában tapasztalható változások. A célnak megfelelőnek tűnt az Oh és munkatársai által egér

szövetekre kifejlesztett módszer, amely Western blot kísérletek denzitometriás mérésén alapszik. A módszer lehetővé teszi a fehérjeextraktumok teljes, illetve szabad és konjugált ubikvitin koncentrációjának egyidejű meghatározását egyetlen ubikvitinellenes ellenanyag segítségével. A módszer lényege, hogy a szövethomogenizátumokban jelen levő endogén DUB-ok a konjugált ubikvitint teljes mértékben monomerekké konvertálják, így a minták teljes ubikvitintartalma egyetlen sávként jelenik meg az immunblottokon. A DUB-ok aktivitásának gátlása ezzel szemben megőrzi az ubikvitin formák integritását, így ezek Western blottal elválaszthatók, a szabad ubikvitinkészlet pedig külön vizsgálható. Az fehérjeminták ubikvitintartalma pedig ubikvitin standardok használatával válik kvantifikálhatóvá a Western blottok denzitometriás mérése során.

Az UPR-ben a szabad és kötött ubikvitin formák közötti körforgást számos fehérje szabályozza. A poliubikvitinált proteaszóma szubsztrátok felismerését és megkötését a proteaszómalis illetve a proteaszómaival együttműködő ubikvitin-receptorok végzik. A megkötött szubsztrátokról még a fehérjedegradációt megelőzően a proteaszóma asszociált DUB-ok eltávolítják az ubikvitin jelöléseket. Az Rpn11 DUB aktivitással rendelkező proteaszóma-alegység *en bloc* hasítja le a poliubikvitin láncokat a fehérjékről, melyek így a citoplazmába kerülnek. A szabad poliubikvitin láncok hidrolízisét az USP5 DUB katalizálja, ezáltal hozzájárulva az ubikvitin-újrahasznosításhoz. Más proteaszóma-asszociált DUB-ok, mint az Usp14, szintén a konjugált ubikvitin felszabadításában játszanak szerepet, viszont a poliubikvitin láncok disztális végéről egyesével távolítja el az ubikvitin monomereket, ezáltal akár gátolva a fehérjedegradációt.

Az ubikvitin ligázok szintén fontos elemei az ubikvitin-proteaszóma rendszernek, azáltal, hogy meghatározzák az ubikvitinációs folyamatok szubsztrátspecifitását. Eukariótákban már számos ubikvitin ligáz azonosítottak, melyek közül kitűnik méretével és összetettségével az *anafázis promoting komplex* (APC/C). Az APC/C kulcsszerepet játszik a mitózisban és a G1 fázis fenntartásában azáltal, hogy megfelelő sejtciklusszabályozó fehérjéket jelöl ki degradációra. Az APC/C felépítésében legalább 13 alegység vesz részt, melyek jelentős evolúciós konzerváltságot mutatnak. A komplex egyik legkisebb, de létfontosságú alegysége a Cdc26, amely feltehetően az APC/C strukturális stabilitásában játszik szerepet.

## **Célkitűzések**

A tézismunkám célja a szabad és konjugált ubikvitin dinamikus változásainak vizsgálata volt *Drosophila melanogasterben*, illetve a Cdc26 APC/C alegység *ecetmuslica* homológjainak jellemzése:

- Az egérszövetekre kidolgozott, Western blot alapú ubikvitin mérési módszer optimalizálása *ecetmuslicára*.
- Az egyedfejlődési stádiumok és különböző szövetek ubikvitinkoncentrációjának vizsgálata *Drosophila melanogasterben*.
- Az UPR egyes lépéseit érintő mutációk hatásának vizsgálata az ubikvitin-egyensúlyra.
- Az APC/C ubikvitin ligáz két lehetséges alegységének jellemzése *Drosophilában*.

## Anyagok és módszerek

A kísérletekhez használt *Drosophila melanogaster* törzseket standard, kukoricaliszt alapú táptalajon, 25 °C-on tartottuk. Vad típusú kontrollként izogemizált *OregonR* és *DSK001* törzseket használtuk. A kísérletekhez használt RNS interferencia és mutáns vonalak: *Usp5<sup>RNSi</sup>*, *p54/Rpn10<sup>RNSi</sup>*, *Usp14<sup>A32</sup>*, *Ubi-p63E<sup>EY07341</sup>*, *CG17343<sup>EY19920</sup>* és *CG3457<sup>15/1</sup>*. A gének kifejeződés indukálásához az UAS-GAL4 rendszert használtuk.

Az uikvutin mérésekhez a fehérjemintákat ubikvutin standardokkal együtt SDS-PAGE-el elválasztottuk, majd ezt követően Western blottal, egyetlen ubikvutinellenes ellenanyaggal vizsgáltuk. Az ubikvutin-koncentrációkat a monoubikvutin sáv denzitometriás méréséből kapott adatok alapján, az ubikvutin standardokkal felrajzolt kalibrációs görbe segítségével számítottuk ki.

A humán Cdc26-ot (HsCdc26), a HA-val (haemagglutininnel) jelölt Cdc26-like-ot, illetve a GFP-vel jelölt Cdc26-ot és Cdc26-like-ot kódoló transzgenikus DNS konstrukciókat standard klónozó és *Drosophila* expressziós rendszerrel állítottuk elő (Gateway).

A komplementációs tesztek a *HsCdc26*-t túltermeltetésével végeztük el *Drosophilában*, homozigóta *Cdc26* mutáns háttéren. A HA jelölt Cdc26-like és FLAG jelölt Mákos/Cdc27 kapcsolatát koimmunprecipitációs kísérletekkel igazoltuk.

A *Cdc26* és *Cdc26-like* mRNS expressziós mintázatát reverz transzkripció kapcsolt (RT) PCR-el vizsgáltuk. A saját promóterükkel szabályozott, *GFP* jelölést hordozó *Cdc26* és *Cdc26-like* transzgenikus konstrukciók kifejeződését Western blottal vizsgáltuk GFP-ellenes ellenanyaggal

## Eredmények

*Az ubikvitinkészlet dinamikus változása a Drosophila egyedfejlődési stádiumaiban és különböző szöveteiben*

Annak érdekében, hogy vizsgáljuk a különböző ubikvitin formák dinamikus változásait ecetmuslicában, egy egyszerű és gyors ubikvitin mérési módszert alkalmaztunk, amelyet eredetileg egér szövetekre dolgoztak ki. A módszert úgy optimalizáltuk *Drosophilára*, hogy a rovar fiziológiájának megfelelő pufferösszetételt, inkubációs hőmérsékletet és inkubációs időt állítottuk be.

Az optimalizálást követően a módszert alkalmazva meghatároztuk az ecetmuslica egyedfejlődési stádiumaiban és különböző szöveteiben az ubikvitin szintjét és az egyes formák arányát. Eredményeink alapján az ubikvitin formák koncentrációja illetve egymáshoz viszonyított aránya dinamikus változáson megy keresztül a *Drosophila* egyedfejlődés során. Hasonlóan markáns különbségeket lehetett megfigyelni az ubikvitin készletben az egyes szövetek között is. A nagy átrendeződési folyamatokat igénylő lárva-báb és báb-adult átmeneteknél a szabad monoubikvitin aránya jelentősen megemelkedett. Magas monoubikvitin arányt mértünk a mitótikusan aktív agy, illetve az ovárium és tesztisz mintákban is.

*Az ubikvitin-proteaszóma rendszer funkcióvesztése mérhető változásokhoz vezet az ubikvitin-egyensúlyban*

Az ubikvitin-proteaszóma rendszer fontos szerepet tölt be az ubikvitin újrahasonosításban, ami nagymértékben hozzájárul a szabad és konjugált ubikvitin formák közötti egyensúly kialakulásához. A rendszert szabályozó géneket érintő mutációk számszerűsíthető változásokat

eredményeztek az ubikvitin készletben. Az p54/Rpn10 proteaszómális ubikvitinreceptor funkcióvesztése következtében a teljes ubikvitinszint legalább a kétszeresére emelkedett, melyhez egyaránt hozzájárult a szabad ubikvitin monomerek illetve a konjugált ubikvitinek koncentrációjának növekedése is. Az Usp5 DUB funkcióvesztése szintén kétszeres növekedést eredményezett a teljes ubikvitin mennyiségében. Ez a növekedés azonban kizárólag a szabad poliubikvitin láncok, illetve a konjugált ubikvitinek felhalmozódásának eredménye, ugyanis a monomerek szintjében enyhe csökkenés volt megfigyelhető.

Az Usp14 proteaszóma-asszociált DUB a proteaszóma szubsztrátok láncvégi ubikvitinjeinek lehasításával járul hozzá a szabad ubikvitinkészlet fenntartásához. A *Drosophila Usp14* null a mutánsokban egyedül a testiszben volt kimutatható változás a szabad monoubikvitinek koncentrációjában, ami hímsterilitással járt együtt. Az *Usp14* funkcióvesztéses mutációja a szabad ubikvitin készlet csökkenését eredményezte, amit lényegesen súlyosbított az ubikvitin testisz-specifikus de novo szintéziséért felelős *Ubi-p63E* gén hipomorf allélja. A két gén szinergisztikus interakciója arra utal, hogy együttesen játszhatnak szerepet a testisz szabad ubikvitinszintjének fenntartásában.

#### *A Cdc26 és Cdc26-like a Drosophila APC/C alegységei*

Csoportunk ecetmuslicában két Cdc26 homológ fehérjét azonosított, amelyek a Cdc26 és Cdc26-like jelölést kapták. A fehérjéket kódoló gének közül csupán a *Cdc26* bizonyult létfontosságúnak, funkcióvesztése pedig az ismert APC/C alegységek mutánsainak jellegzetes mitotikus fenotípusát mutatta. A humán Cdc26 fehérje transzgenikus túltermelése menekítette a

*Drosophila Cdc26* mutáns letális fenotípusát, amiből arra következtethetünk, hogy a két fehérje funkciója nagyon hasonló lehet.

A *Cdc26-like* funkcióvesztése nem eredményezett látható fenotípust, viszont a fehérje túltermelése menekítette a *Cdc26* mutáns fenotípusát. Ezen kívül koimmunprecipitációs kísérletekkel igazoltuk a *Cdc26-like* és ismert APC/C alegységek fizikai kölcsönhatását.

#### *Cdc26 és Cdc26-like kifejeződése különbözik térben és időben*

Az mRNS kifejeződési mintázata eltérőnek bizonyult a *Cdc26* és *Cdc26-like* esetében. Míg *Cdc26* az egyedfejlődés minden szakaszában kifejeződött, a *Cdc26-like* csupán az ováriumban és az embrióban volt detektálható. Az eredményeket a saját promóterük által szabályozott *Cdc26-GFP* és *Cdc26-like-GFP* fehérjék Western blot vizsgálata is megerősítette. Ezek alapján elképzelhető, hogy mindkét fehérje az APC/C alegységként játszik szerepet, azonban az egyedfejlődés különböző szakaszaiban.

#### **Az eredmények összefoglalása**

- Egy egyszerű és pontos ubikvitin mérési módszert adaptáltunk ecetmuslicára.
- A egyedek összubikvitin tartalma és összetétele dinamikusan változik az egyedfejlődési stádiumokban és különböző szövetekben.
- Az p54/Rpn10 proteaszómális ubikvitinreceptor funkcióvesztése növekedést eredményezett a szabad és konjugált ubikvitinkoncentrációban.



- Az Usp5 DUB enzim hiányában ugyancsak emelkedik a sejtek teljes ubikvitinszintje, ez azonban elsősorban aszabad poliubikvitinláncok felhalmozódásának eredménye.
- Az Usp14 proteaszóma-asszociált DUB a szabad ubikvitinkészlet fenntartásában játszik szerepet az *ecetmuslica* testiszében.
- Az APC/C komplex Cdc26 alegységének két homológját mutattuk ki *Drosophilában*. Adataink szerint mindkettő része az APC/C komplexnek, de mivel expressziós mintázatuk eltérő, így feltételezhető, hogy az egyedfejlődés különböző szakaszaiban játszanak szerepet.

### **Köszönetnyilvánítás**

A doktorim során végzett munkát a következő pályázatok támogatták: OTKA K116372, és a GINOP-2.3.2-15-2016-00032.

## **A diszertáció alapjául szolgáló közlemények**

MTMT azonosító: 10053160

**Nagy Á**, Kovács L, Lipinszki Z, Pál M, Deák P. (2018). Developmental and tissue specific changes of ubiquitin forms in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*, 13(12): e0209080.

Kovács L, **Nagy Á**, Pál M, Deák P. (2019) Usp14 is required for spermatogenesis and ubiquitin stress responses in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Cell Science* (review alatt)

## **Konferenciák**

**Nagy Á**, Lipinszki Z, Kovács L, Pál M, Deák P: Ubiquitin pool dynamics revealed by quantifying ubiquitin forms in *Drosophila* UPS mutants. Hungarian Molecular Life Science, 2019.03.29-31, Eger, Hungary

**Nagy Á**, Kovács L, Nagy O, Pál M, Deák P: Unique subunit composition of the *Drosophila* APC/C. CSH Asia meeting on Ubiquitin Family, Autophagy and Diseases, 2018.04.09-13, Suzhou, China

**Nagy Á**, Lipinszki Z, Kovács L, Pál M, Deák P: Quantitative analysis of ubiquitin-pool dynamics in *Drosophila* development and tissues. 25th European *Drosophila* Research Conference, 2017.09.22-25, London, United Kingdom

**Nagy Á**, Lipinszki Z, Kovács L, Pál M, Deák P: Ubiquitin dynamics during *Drosophila* development. The FEBS Young Scientists' Forum and 42nd FEBS Congress, 2017.09.07-14, Jerusalem, Israel.

**Nagy Á**, Lipinszki Z, Kovács L, Pál M, Deák P: Developmental stage- and tissue-specific ubiquitin levels in *Drosophila melanogaster*. Hungarian Molecular Life Science, 2017.03.31-04.02, Eger, Hungary

**Nagy Á**, Horváth J, Nagy O, Pál M, Kovács L, Deák P: A unique feature of the *Drosophila* APC/C. Annual Conference of the Hungarian Biochemical Society, 2016.08.28-31, Szeged, Hungary

**Nagy Á**, Horváth J, Nagy O, Pál M, Kovács L, Deák P: Characterization of a new APC/C subunit in *Drosophila melanogaster*. EMBO Workshop on the Cell Cycle, 2015.09.04-07, Budapest, Hungary

**Nagy Á**, Horváth J, Nagy O, Pál M, Deák P: Anaphase promoting complex subunits with unusual characteristics. Hungarian Molecular Life Science, 2015.03.27-29, Eger, Hungary

## Nyilatkozat

Mint az alábbi közlemények felelős szerzője igazolom, hogy Nagy Ágota Ph.D jelölt jelentős mértékben hozzájárult az alábbi tudományos publikációk létrehozásához és tézisében közölt eredményeit más Ph.D értekezésben nem használjuk fel.

**Nagy Á**, Kovács L, Lipinszki Z, Pál M, Deák P. (2018). Developmental and tissue specific changes of ubiquitin forms in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*, 13(12): e0209080.

Kovács L, **Nagy Á**, Pál M, Deák P. (2019) Usp14 is required for spermatogenesis and ubiquitin stress responses in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Cell Science* (review alatt)

Szeged, 2019. szeptember 18.

-----  
Dr. Deák Péter  
Egyetemi docens  
Szegedi Tudományegyetem