

# Összefoglalás

Az eukarióta sejtek homeosztázisa a sejtet felépítő komponensek állandó lebontásával és újrateremtésével valósul meg. A felépítési és lebontási folyamatok szabályozhatósága alapvető fontosságú, mind a környezet által indukált, mind a genetikai program irányította változásokra adott válaszok kialakulásánál. Az adaptáció, az egyedfejlődés és a reprodukció folyamataihoz a nagy mennyiségben előforduló háztartási fehérjék szintézise és lebontása mellett, a kisebb mennyiségben előforduló, de meghatározó szerepet játszó szabályozó fehérjék mennyiségének nagy pontosságú szabályozására is szükség van. A fehérjék szintézise közben történő hibák, illetve az életük során bekövetkező bizonyos kölcsönhatások egyaránt képesek elrontani kívánatos térszerkezetüket. Bizonyos esetekben ezen átalakulások visszafordíthatatlanok. Ezt a sejtnek fel kell ismernie, majd a hibás fehérjéket a lehető leggyorsabban el kell távolítania.

Dolgozatomban a nagy pontossággal szabályozott fehérjelebontást végző ubiquitin – 26S proteaszóma út egyik fő komponensének a 26S proteaszómának a különböző szerkezeti aspektusait vizsgáltam.

Az ubiquitin – 26S proteaszóma fehérjebontási út során az ubiquitin ligáz rendszernek nevezett három vagy esetenként négytagú enzimaszkád kiválasztja, és egy ubiquitinnek nevezett polipeptid kovalens hozzákapsolásával megjelöli a lebontásra szánt fehérjét. Míg a ligáz rendszer első két tagjának az ubiquitin aktiválásában és a transzfer folyamatában van döntő szerepe, addig a többféle különböző harmadik komponens a szubsztrátok válogatását végzi. A válogatás a fehérjék aminosav szekvenciájába kódolt primer degradációs jelek, vagy a harmadlagos szerkezetük felismerése alapján történik. Az első ubiquitin beépülése után a jelölési folyamat nem áll le, hanem újabb ubiquitin egységek beépítésével a jelölt fehérjén egy multiubiquitin lánc alakul ki. A láncnövelő reakciók bizonyos típusaihoz a ligáz rendszer negyedik komponensére is szükség lehet.

A lebontásra kijelölt fehérjék aminosavakká történő darabolását egy hatalmas, sok fehérje-alegység összekapcsolódásából létrejövő multiprotein komplex, a 26S proteaszóma végzi. Ez a fehérjekomplex két alkompexre bontható. Az egyik, a központi elhelyezkedésű 20S proteaszóma. Ennek a csőszerű képletnek a közepén egy vékony csatorna húzódik, mely belső kiöblösődései adnak helyet a fehérjebontási reakcióknak. Azáltal, hogy a fehérjebontó

reakciók a partikulum belsejében játszódhatnak le, szabályozhatóvá válik, hogy milyen fehérjék kerülhetnek kapcsolatba az egyébként semmilyen specificitást nem mutató, azaz potenciálisan a jól működő fehérjékre is veszélyes enzimikus aktivitással.

A központi csatorna két végén található két felszíni nyílás. Az egyik vagy mindkét nyílás felett helyezkedik el a 19S regulátor komplex, a 26S proteaszóma másik alkomplexe. Szerepe az, hogy kiszűrje a lebontásra kijelölt ubiquitinált fehérjéket és a 20S proteaszóma központi csatornájába táplálja őket. Ehhez nemcsak a degradációs jeleket kell felismernie, hanem a fehérjéket az úgynevezett reverz chaperon aktivitásánál fogva elsődleges, fonalszerű térszerkezeti állapotba kell széttekernie. Miután az alkomplex felnyitotta a 20S proteaszóma alapállapotban zárt bemeneti nyílását, a letekert polipeptidláncot be kell juttatnia a központi csatornába.

Bár a peptidkötések hasítása nem igényel ATP bontást, mind a szubsztrátok kiválasztása, mind a 20S proteaszómába való betáplálása ATP emésztő, energia igényes folyamat. Ez az ára a nagymértékű szelektivitásnak.

A 20S proteaszóma egy viszonylag jól kristályosítható hengersizmetrikus képlet. Sokat tudunk a felépítő alegységek enzimikus működéseiről, és röntgenkristallográfiai kísérletek alapján jól ismerjük a szerkezetét is. Ez sajnos nem mondható el a 19S regulátor komplexről, amely nem mutat semmilyen jól megfogható szimmetriát. Összetétele és alegységszerkezete az egyedfejlődés és a különböző adaptációs folyamatok során dinamikusan változik, gyakran heterogén populációt alkotva a sejtben. Ezen okoknál fogva igen rosszul kristályosítható, és így a szerkezetét sem ismerjük kielégítő pontossággal. Annak eldöntése, hogy az egyes alegységeknek mi a pontos enzimikus szerepe, az eddigi nagymérvű erőfeszítések ellenére is még mindig csak gyermekcipőben jár.

Munkám során feladatult először a *Drosophila melanogaster* 19S regulátor komplex, majd a 20S proteaszóma alegység összetételének pontos meghatározását kaptam. Ezt a problémát egy újszerű gél-elektroforetikus rendszer alkalmazásával sikerült megoldanunk. Ezután hozzá kellett rendelnem a rendelkezésünkre álló minden egyes alegység-specifikus ellenanyagot az általuk felismert alegységhez. Ez előfeltétele volt annak, hogy ki tudjuk értékelni a laborunkban folyó a 26S proteaszóma összeszerelési reakcióját kísérő alegységszerkezet változásokat vizsgáló keresztkötési kísérleteket. Az ellenanyag könyvtár annotálása és a keresztkötési kísérletek elemzése közben felfigyeltünk néhány ellenanyagra, amelyek segítségével nagy valószínűséggel el tudtuk különíteni az egyik alegység poszttranszlációsán modifikált változatait. Ez a megfigyelés arra sarkallt minket, hogy

részletesen megvizsgáljuk a 26S proteaszóma alegységeinek esetleges oxigén kötött N-acetil-glukozamin módosításait.

A feladatok megoldásához először egy korábban nehezen oldható integráns membránproteinek elválasztására használt 16-BAC/SDS kétdimenziós gélelektroforézist kellett az adott problémához adaptálni. Miután sikerült minden egyes eddig ismert 26S proteaszóma alegységet elválasztani, sőt erre a fajra nézve két új alegységet is kimutatni, az elválasztott és a gélből kivágott alegységek kémiai azonosítását együttműködő partnereink segítségével tömeg-spektrometiai módszerekkel végeztük. Az ílymódon teljesebbé tett 19S regulátor komplex alegység katalógus egy olyan publikáció része lett, mely az összetétel meghatározása mellett elektron-mikroszkópiás megközelítéssel meghatározta a 19S regulátorkomplex össztömegét, illetve bemutatta egy ubiquitin eltávolítására képes alegység enzimátikus viselkedését és a 19S regulátor komplexen belüli pontos elhelyezkedését.

A rendelkezésünkre álló alegység-specifikus ellenanyag könyvtár egyes tagjainak az általuk felismert alegységekhez való rendelését úgy végeztük, hogy azonos módon elkészített 16-BAC / SDS kétdimenziós géleken választottuk el a 19S regulátor komplex alegységeit, majd összehasonlítottuk az összfehérjére festett géleket az alegység-specifikus ellenanyagokkal előhívott immunoblottokkal. Miután meghatároztuk, hogy melyik ellenanyag melyik alegységet ismeri fel, ki tudtuk értékelni a laborunkban végzett keresztkötési reakciókat.

A keresztkötési reakciók során azt vizsgáltuk, hogy az ATP elvonására reverzibilis módon 19S regulátor komplexre és 20S proteaszómára széteső, ATP hozzáadására pedig újra funkcióképes 26S proteaszómává összeálló proteaszóma preparátumokban miként változik a szétesési-összeszerelési reakció hatására az egyes alegységek egymáshoz viszonyított térbeli elrendeződése. Ehhez kihasználtuk azt, hogy az egyes állapotok térszerkezetéről egy pillanatképet lehet rögzíteni, olyan mindkét végén reaktív funkciócsoportot tartalmazó keresztkötőszer alkalmazásával, ami a megfelelően közeli alegységeket képes kovalens módon összekapcsolni. Az így fixált alegység-kölcsönhatások olyan heterodimer alegységpárokat eredményeznek, amellyel mindkét alegység-specifikus ellenanyaggal képes reagálni. Kísérleteink során be tudtuk bizonyítani, hogy a 26S proteaszóma 19S regulátor komplexből és 20S proteaszómából való összeszerelődése során az alkotó szubkomplexek alegységszerkezete gyökeresen megváltozik, sőt azt is be tudtuk mutatni, hogy a szubkomplexek bizonyos részei jobban, míg más részei csak kevésbé rendeződnek át.

A harmadik kísérletsorozatban szintén a már említett gél-elektroforetikus rendszerrel elválasztott, és ezután membránra blottolt alegységeket vizsgáltuk immuno- és lektin-blot

technikával. Ahhoz, hogy kimutassuk a 26S proteaszóma mely alegységei hordoznak N-acetil-glukózamin módosítást, három különböző detektációs reagenssel is előhívtuk az elkészült blottokat. Az egyik O- $\beta$ -N-acetil-glükózamin poszttranszlációs fehérjemódosítást felismerő ellenanyagot hővel leölt, pepsinnel kezelt, *Streptococcus A* baktérium ellen termeltették, míg a másik ellenanyagot patkány máj sejtmag pórus komplexből tisztított N-acetil-glukózaminált lamin epitóp ellen. A lektin-blot kísérletekhez tormaperoxidáz konjugált búzacsíra agglutinint használtunk, mint specifikus detektációs reagenst. Midhárom reagens magas affinitása és nagy specifitása már jól dokumentált a hozzáférhető irodalomban. Sikerült bebizonyítanunk, hogy a 19S regulátor komplex öt alegysége, és a 20S proteaszóma szinte összes alegysége poszttranszlációsán N-acetil-glukózaminált. Ennek a nagyarányú módosítottságnak a fiziológias szerepére sajnos nem tudtunk magyarázatot adni, de mivel ismert, hogy az N-acetil-glukozamináció gyakran azonos szerin és treonin oldalláncokat érint, mint a gyakori foszforilációs poszttranszlációs modifikációk, felállítottunk egy hipotézist, miszerint az antagonisztikusan viselkedő foszforiláció és N-acetil glukózamináció esetlegesen a 26S proteaszóma működésének finomhangolásában vesz részt.