

**A 26S proteaszóma p54 alegységét érintő
deléció előállítása és jellemzése *Drosophila*
melanogaster-ben**

Ph.D. értekezés

Készítette: Szlanka Tamás

Témavezető: Dr. Kiss István

MTA SzBK Genetikai Intézet

Szeged, 2003.

Irodalmi bevezetés és célkitűzések

A sejten belül egy adott fehérje koncentrációja attól az egyensúlytól függ, amelyet a szintézis és lebontás egymáshoz viszonyított sebessége határoz meg. A sejten belüli fehérjék szabályozott és szelektív lebontásában meghatározó szerepet játszik egy enzim-kaszád és egy hatalmas proteolitikus komplex, a 26S proteaszóma. Az enzim-kaszád felismeri a rövid életidejű fehérjéken lévő különböző degradációs szignálokat és egy multiubiquitin láncnak a fehérjéhez való kovalens hozzákapcsolásával módosítja azokat. Ugyanez az enzimkaszkád felelős a sérült, vagy rosszul feltekeredett fehérjék multiubiquitinálásáért is. A multiubiquitinált fehérjéket azután felismeri, megköti és végül lebontja a 26S proteaszóma.

Ez a hatalmas proteolitikus komplex kétféle alkomból áll össze: a Regulátor Komplexből (RC) és a katalitikus ún. Core Komplexből. A 20S proteaszóma, azaz a katalitikus Core, egy hordóalakú multikatalitikus proteáz. A 20S proteaszóma belsejében három ún. nanokompartment alakul ki, melyeket egy keskeny központi csatorna köt össze. A központi csatorna szűk mérete, illetve a végeit lezáró kapuszerkezet miatt, a 20S proteaszóma középső nanokompartmentjében lévő katalitikus centrumokhoz a feltekeredett fehérjék nem férhetnek hozzá.

A fehérjék kitekerése a Regulátor Komplexnek valószínűleg az egyik legfontosabb feladata, melyet feltehetően az anti-chaperon aktivitásának köszönhetően lát el. A kitekerés nagy valószínűséggel energiát igényel, melyet ATP hidrolízise biztosíthat. A Regulátor Komplexben hat ATP-áz alegységet azonosítottak, melyek közül egy vagy több feltehetően szerepet játszik ebben a folyamatban. Szintén az egyik ATP-áz alegység (Rpt2) felelős a központi csatorna nyitásáért, így valószínűsíthető, hogy a csatornanyitás is energiaigényes feladat. Bár közvetlen kísérletes bizonyítékok nem állnak rendelkezésre, logikusnak tűnik az a feltételezés, hogy a kitekert fehérjéknek a kapuszerkezeten

keresztüli bejuttatása a 20S proteaszóma központi csatornájába szintén a Regulátor Komplex egyik energiafüggő feladata.

Mivel a 20S proteaszóma önmagában egy nem specifikus proteáz, a 26S proteaszómának a multiubiquitinált fehérjék iránti szelektivitását feltehetően a Regulátor Komplex biztosítja. Ezt a feltételezést támogatta az a megfigyelés, hogy a Regulátor Komplex egyik alegysége, az S5a/Rpn10/p54 (humán/élesztő/*Drosophila*) *in vitro* kísérletben képes volt felismerni és megkötni multiubiquitin láncokat.

Az S5a/Rpn10/p54 alegységnek a szubsztrátum-felismerésben játszott szerepét ugyanakkor megkérdőjelezte az a megfigyelés, hogy az alegységet kódoló gén deléciója az élesztőben nem letális, hanem csak enyhe fenotípust okoz. További kérdéseket vetett fel az S5a/Rpn10/p54 alegységnek a szubsztrát-szelekcióban betöltött funkcióját illetően az eredmény, melyet keresztükötési kísérletekben kaptak. Reaktív multiubiquitin-láncok szelektív keresztükötődését a Regulátor Komplexnek csak egy másik, az S6'/Rpt5/p50 nevű alegységéhez sikerült kimutatni. A S5a/Rpn10/p54 deléciója egy haploid moszat, a *Physcomitrella patens*, esetében viszont fejlődési rendellenességet okozott, és az S5a/Rpn10/p54 alegység poliubiquitin-kötő doménje nélkülözhetetlen volt, amikor a hasadó élesztőben egy másik Regulátor Komplex alegység, az S14/Rpn12/p30 hőmérsékletérzékeny mutációját menekítették az S5a/Rpn10/p54 túltermelésével.

Hogy pontosabb képet alkothassunk az S5a/Rpn10/p54 alegységnek a magasabbrendű eukariótákban betöltött szerepéről, munkám céljául tűztem ki, hogy jellemezzem az alegységét kódoló gén null mutációját *Drosophila melanogaster*-ben. Ennek érdekében elő kívántam állítani a *pros54* gén (az S5a/Rpn10/p54 alegységét kódoló gént a GadFly ezen a néven annotálta) delécióját, és az általános fenotípusos leíráson túl meg kívántam vizsgálni azt is, hogy milyen citológiai és biokémiai elváltozásokat lehet megfigyelni az S5a/Rpn10/p54 mutáns *Drosophila* különböző egyedfejlődési stádiumaiban. A témában, a munkatársaimmal együtt végzett kutatásaink során kapott eredményeinket a *Journal of Cell Science*-ben tettük közzé (Szlanka és *mtsai.*, 2003., *J. Cell. Sci.*; 116, 1023-33.), és ezekre az eredményekre épül az értekezésem is.

Alkalmazott módszerek

Klasszikus genetikai módszerek:

- keresztezések vad és különböző mutáns *Drosophila melanogaster* törzsekkel,
- P-elem ugratás,
- P-elem-közvetítette csíravonal transzformáció,
- letálfázis meghatározás,
- orcein-festett kromoszóma-preparátumok fáziskontraszt-mikroszkópos vizsgálata

Molekuláris biológiai módszerek:

- fehérje gélelektroforézis natív- és SDS-gélen,
- immunoblot,
- Southern blot,
- PCR,
- klónozás,
- DNS szekvenálás

Eredmények és megvitatásuk

A *pros54* gén null alléljának előállítása során egy harmadik kromoszómás P-elem inszerciós mutánsgyűjteményben azonosítottunk egy beépülést amelyik a *pros54* gén 3' végének a közelében található. Ebből a vonalból kiindulva, a P-elem indukálta hímrrekombináció módszerét felhasználva létrehoztunk egy sorozat kromoszómális deléciókat. PCR analízis és szekvenálás módszerével átvizsgáltuk a deléciós mutánsokat és azonosítottunk egy vonalat, amelyben a deléció eltávolította a *pros54* gén több mint 90%-át. Ez a 2095 bázispár hosszúságú deléció egyúttal eliminált a *pros54* gén és a P-elem között

elhelyezkedő további két gént. Ennek a két génnek (CG7181 és Vha M9.7-2) a funkcióját a két gént hordozó menekítő konstrukciónak a segítségével pótoltuk a deléciós homozigótákban és az így létrejött genetikai kombinációt *Δp54*-nek neveztük el.

Western-blot analízissel megállapítottuk, hogy a p54 alegység nem mutatható ki a *Δp54* állatokból készült fehérjekivonatban, így ezek az állatok valóban a *pros54* gén null fenotípusát képviselik. A *Δp54* mutánsok letálfázis analízisével megállapítottuk, hogy a p54 fehérje hiánya mindhárom lárvális stádiumra és a báb állapotra kiterjedő polifázisos letalitást eredményez. A citológiai vizsgálatok során a harmadik stádiumos lárvák agyában mitotikus rendellenességeket figyeltünk meg. Mind a mitotikus index, mind a metafázis:anafázis arány a vadban tapasztalható érték kétszeresére nőtt. Ezen túlmenően, gyakori volt néhány abnormális mitotikus képlet előfordulása is: túlkondenzálódott kromoszómák, korai testvérkromatida szétválás, cirkuláris mitotikus alakzatok, aneuploidia és poliploidia. Ezek a rendellenességek a mitózis normális lefolyásának az akadályozására utaltak.

Mivel az S5a/Rpn10/p54 fehérjét a 26S proteaszóma szubsztrátum-felismerésért felelős alegységének tekintették, meglepetéssel szolgált az a megfigyelés, hogy az alegységet kódoló gén deléciója nem befolyásolta az élesztő sejtek életképességét. Ez az eredmény arra a feltételezésre vezetett, hogy a szubsztrátum-felismerés egy sokkal összetettebb folyamat, melyben feltehetőleg számos különböző, részben átfedő mechanizmus is szerepet játszik.

Bizonyos proteaszóma szubsztrátumok lebomlása azonban zavart szenvedett az S5a/Rpn10/p54 alegységre mutáns élesztőben amiből viszont arra következtethetünk, hogy bizonyos szubsztrátum fehérjék számára egyedül az S5a/Rpn10/p54 alegység szolgál multiubiquitin-receptorként. Az élesztő mutáns gyenge fenotípusa ugyanakkor azt valószínűsíti, hogy az élesztőben meglehetősen korlátozott azon multiubiquitinált fehérjéknek a száma, melyeket kizárólagosan ez az alegység ismer fel és közvetít a proteaszómához. A *Δp54* állatokban megfigyelt letalitás azonban azt jelzi, hogy a *Drosophila*-ban vagy

nagyobb ezen multiubiquitinált fehérjék száma, vagy a bábozódás elején néhány kulcsfontosságú szubsztrátum fehérje kizárólag az S5a/Rpn10/p54 alegység közvetítésével jut el a proteaszómához. Ezen fehérjék elégtelen lebomlása pedig megakasztja az állatok fejlődési programját, ami letalitást eredményez. A mutáns lárvák agyában megfigyelt súlyos mitotikus rendellenességek azt sugallták, hogy az S5a/Rpn10/p54 alegység által kizárólagosan közvetített szubsztrátum fehérjék közé tartozhat néhány, a sejtciklus szabályozásában szerepet játszó fehérje is.

A molekuláris biológiai kísérletek keretében elvégeztük a p54 alegység fehérjeexpressziós mintázatának vizsgálatát. Korábról ismeretes volt, hogy a vad típusú törzs petéiben nagy mennyiségű, anyai eredetű 26S proteaszóma halmozódik fel. Western blot analízissel megállapítottuk, hogy a proteaszóma többi alegységével együtt felhalmozódott p54 fehérje mennyisége a lárvális élet folyamán fokozatosan lecsökken és a p54 fehérjeszintnek a bábozódás elején tapasztalható újbóli, éles emelkedése már a zigotikus expresszió következménye. Ez összhangban állt azzal a megfigyelésünkkel, hogy a bábozódásig eljutott $\Delta p54$ mutáns állatok 100%-a a bábállapot elején elpusztul. A $\Delta p54$ mutáns embriókat és lárvákat menekíti az embriókban felhalmozott nagy mennyiségű proteaszóma tartalék, amely a lárvális élet folyamán csak fokozatosan merül ki. Így nem állíthatjuk azt minden kétséget kizáróan, hogy a p54 alegység minden fejlődési stádium minden egyes sejtjében esszenciális a proteaszóma megfelelő működéséhez, sem azt, hogy az élesztőhöz hasonlóan általában nélkülözhető, és csak a fejlődés bizonyos szakaszaiban esszenciális. A $\Delta p54$ állatok lárva-báb polifázisos letalitása azonban azt sejteti, hogy amint kifogy az anya által felhalmozott vad típusú 26S proteaszóma készlet, a mutáns proteaszómák még megnövekedett mennyiségben sem tudják menekíteni a p54 hiányában jelentkező letalitást.

A $\Delta p54$ és vad típusú bábokból készült fehérjekivonatok összehasonlítása a multiubiquitinált fehérjéknek a magasabb molsúlytartomány felé történt eltolódását mutatta a mutáns kivonatokban. Megállapítottuk továbbá, hogy az élesztő esetében

leírtakkal ellentétben, a 26S proteaszóma összeszerelődése a p54 alegység hiányában is zavartalan és a 26S proteaszóma szerkezetében sem tapasztalható lényeges elváltozás. Ezek az eredmények támogatják azt a feltételezést, hogy a mutáns bábokban megnyilvánuló letalitásért nem a 26S komplex szétesése, hanem a proteaszóma valamely specifikus működésének a zavara felelős az S5a/Rpn10/p54 alegység hiányában.

A Western blot kísérletek ezen túlmenően, a 26S proteaszóma többi alegységének a nagymértékű és összehangolt felhalmozódását is kimutatták a $\Delta p54$ állatokban. Ez arra utalt, hogy a magasabbrendű eukariótákban is létezik egy visszacsatolási kör, ami a proteaszóma gének koordinált expresszióját biztosítja. Az élesztőben azonosítottak egy transzkripciós faktort, az RPN4-et, amely a proteaszómális gének szabályozásában vesz részt. A megfigyelés, hogy az RPN4 egyfelől képes arra, hogy a proteaszómális gének kifejeződését összehangolt módon növelje, másfelől pedig ő maga is a proteaszóma szubsztrátuma, egy visszacsatolási szabályozó kör létezésének a feltételezéséhez vezetett.

A proteaszómális gének teljesen koordinált szabályozását magasabbrendűekben korábban még nem bizonyították. A proteaszómális fehérjéknek a $\Delta p54$ állatokban megfigyelt hatalmas mértékű felhalmozódása erősen támogatja a feltételezést, hogy egy ilyen visszacsatolási kör a *Drosophila*-ban is létezik. A $\Delta p54$ állatokban felhalmozódott proteaszómális alegységek döntő tömege teljesen összeszerelődött 26S partikulumok formájában van jelen. A szabad alegységek és/vagy részlegesen összeszerelődött komplexek hiánya közvetlenül utal a proteaszómális gének expressziójának teljesen koordinált szabályozására. Mindazonáltal az élesztő RPN4 fehérjéjével homológ transzkripciós faktort még nem azonosítottak magasabbrendű eukariótákban. A proteaszómális fehérjék mennyiségének a $\Delta p54$ állatokban megfigyelt nagy mértékű és koordinált módon bekövetkező megemelkedése azonban azt jelzi, hogy a magasabbrendű eukariótákban is kell, hogy működjön egy, vagy több olyan transzkripciós faktor, amely képes a proteaszómális gének expressziójának koordinált szabályozására.

**Az értekezés készítéséhez felhasznált tudományos
közlemény**

Szlanka, T.; Haracska, L.; Kiss, I.; Deák, P.; Kurucz, E.; Ando, I.; Virágh, E.; Udvardy, A. (2003) Deletion of proteasomal subunit S5a/Rpn10/p54 causes lethality, multiple mitotic defects and overexpression of proteasomal genes in *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Sci.*; 116, 1023-33.

**Az értekezés készítéséhez NEM használt tudományos
közlemények**

Gorjanacz, M.; Ádám, G.; Török, I.; Mechler, B.M.; **Szlanka, T.;** Kiss, I. (2002) Importin-alpha 2 is critically required for the assembly of ring canals during *Drosophila* oogenesis. *Dev. Biol.*; 251, 271-82.

Sinka, R.; Jankovics, F.; Somogyi, K.; **Szlanka, T.;** Lukacsovich, T.; Erdélyi, M. (2002) *poirot*, a new regulatory gene of *Drosophila* *oskar* acts at the level of the short *Oskar* protein isoform. *Development*; 129, 3469-78.

Szlanka, T.; Tóth, G.K.; Ocsovszki, I.; Keresztes, G. (1999) An antiserum raised against the recombinant cytoplasmic tail of the human CD43 glycoprotein identifies CD43 in many mammalian species. *Immunology*; 96, 74-82.

Szelei, J.; **Szlanka, T.;** Duda, E. (1992) Detection of the *neor* gene expression in animal cells after genetic transformation. *Anal. Biochem.*; 203, 166-68.