

Doktori értekezés

Nagy Ágota

**Szegedi Tudományegyetem
Biológia Doktori Iskola**

**Szeged
2019**

Ubikvitin formák és az ubikvitináció vizsgálata

Drosophila melanogasterben

Ph.D. értekezés

Szerző: Nagy Ágota

Témavezető: Dr. Deák Péter

Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Biokémiai Intézet

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatika Kar

Szeged
2019

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK.....	5
1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	7
1.1. A fehérjék poszttranszlációs ubikvitinálása.....	7
1.2. Az ubikvitináció.....	9
1.3. A dezubikvitináció.....	10
1.4. Az ubikvitináció szerepe.....	12
1.5. Az ubikvitin homeosztázis.....	15
1.6. Az APC/C szerepe az ubikvitin-függő fehérjelebontásban.....	18
1.7. Az APC/C felépítése és szabályozása.....	20
1.8. Az APC/C Cdc26 alegysége.....	22
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	24
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	26
1.2. Felhasznált <i>Drosophila</i> törzsek.....	26
3.2. Ubikvitin mérés.....	26
3.2.1. Mintagyűjtés.....	26
3.2.2. Fehérje extraktumok készítése.....	27
3.2.3. Western Blot.....	28
3.2.4. Adatelemzés és statisztika.....	29
3.3. Cdc26 és Cdc26-like fehérjék filogenetikai analízise a <i>Drosophilidae</i> családban.....	29
3.4. Transzgenikus <i>Drosophila</i> törzsek létrehozása.....	29
3.5. Komplementációs kísérlet.....	32
3.6. Koimmunprecipitációs kísérletek.....	32
3.7. Reverz transzkripció kapcsolt PCR (RT-PCR).....	33
3.8. A GFP-jelölt fehérjék vizsgálata Western blottal.....	34
3.9. A Cdc26 foszforilációjának vizsgálata lambda foszfatáz kezeléssel.....	35
4. EREDMÉNYEK.....	36
4.1. Az ubikvitin formák kvantifikálása <i>Drosophila melanogaster</i> ben.....	36
4.2. Az ubikvitin formák dinamikus egyensúlya az egyedfejlődés során.....	41
4.3. Lárvális és felnőtt szövetek ubikvitin tartalma.....	42
4.4. Az <i>Rpn10/p54</i> funkcióvesztése változást eredményez az ubikvitin formák mennyiségében.....	43
4.5. Az <i>Usp5</i> funkcióvesztésének hatása az ubikvitin-egyensúlyra.....	44

4.6.	Az Usp14 null mutáns testiszében csökken a szabad ubikvitinkészlet	46
4.7.	Az APC/C ubikvitin ligáz Cdc26 alegységének homológjai <i>Drosophilában</i>	48
4.8.	A humán Cdc26 túltermeltetése komplementálja a <i>Drosophila</i> Cdc26 mutáns letális fenotípusát.....	50
4.9.	A Cdc26-like az APC/C egyik alegysége	51
4.10.	A Cdc26 és Cdc26-like mRNS expressziós mintázata eltér a különböző fejlődési stádiumokban és szövetekben	52
4.11.	A Cdc26 és Cdc26-like fehérjék kifejeződésének vizsgálata.....	54
5.	EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA.....	56
5.1.	Az ubikvitinkészlet dinamikusan változik az <i>ecetmuslica</i> egyedfejlődési stádiumaiban és különböző szöveteiben	56
5.2.	Az ubikvitin-proteaszóma rendszer különböző lépéseit érintő mutációk eltérően hatnak az ubikvitin egyensúlyra	59
5.3.	A Cdc26 és Cdc26-like az APC/C alegységei <i>Drosophila melanogasterben</i>	61
5.4.	A legfontosabb eredmények összefoglalója.....	62
6.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	63
7.	BIBLIOGRÁFIA	64
8.	ÖSSZEFOGLALÓ	74
9.	SUMMARY.....	76
10.	A DOLGOZAT ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK.....	78
11.	FÜGGELÉK	80

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

APC/C	anafázis promoting komplex (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome)
BLAST	aminosav vagy DNS szekvenciák összehasonlítására szolgáló algoritmus (Basic Local Alignment Search Tool)
CRL	Cullin-RING ligáz
da-GAL4	daughterless GAL4
DTT	ditiotreitól
DUB	Dezubikvitaláló enzim
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
ELISA	enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
GFP	zölden fluoreszkáló fehérje (Green Fluorescent Protein)
HECT	Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus
HRP	torma peroxidáz (Horseradish Peroxidase)
IAA	Iodoacetamide
JAMM	JAB1/MPN/Mov34 metalloenim
kDa	kiloDalton
MINDY	motif interacting with Ub-containing novel DUB family
MJD	Machado-Joseph Disease domént tartalmazó proteázok
NEM	N-Ethylmaleimide
NF- κ B	nukleáris faktor kappa-B
OTU	ovárium tumor domént tartalmazó proteáz
PAGE	Poliakrilamid gélelektroforézis (Polyacrylamide gel electrophoresis)
PCNA	Ploriferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction)
PIK	proteináz inhibitor koktél
PSAQ	Protein Standard Absolute Quantification
PTM	poszttranszlációs módosítás
PVDF	polivinilidén-fluorid
RIA	radioimmun vizsgálat (Radioimmunoassay)
RING	Really Interesting New Gene
SAC	orsó ellenőrzési pont (Spindle Assembly Checkpoint)
SCF	Skp, Cullin, F-box domént tartalmazó komplex

SDS	Nátrium-dodecil-szulfát (Sodium dodecyl sulfate)
TPR	tetratrikopeptid ismétlődés (Tetratricopeptide repeat)
UAS	Upstream Activating Sequence
UbcH10	E2 ubikvitin konjugáló enzim C
UBE2S	E2 ubikvitin konjugáló enzim S (Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 S)
UCH	ubikvitin C-terminális hidroláz
USP	ubikvitin specifikus proteáz
ZUP1	cink-ujj domént tartalmazó ubikvitin peptidáz 1 (zinc finger containing ubiquitin peptidase 1)

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. A fehérjék poszttranszlációs ubikvitinálása

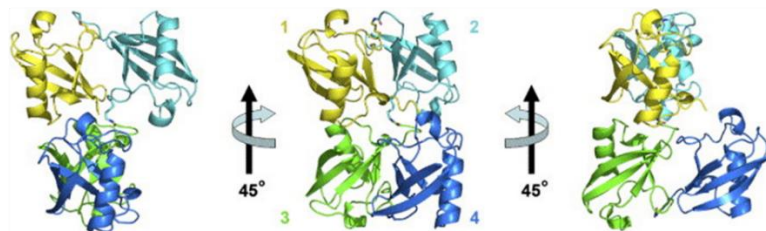
Az élő szervezetek sejtjei bonyolult mikroszkopikus gépezetként működnek. A sejtek felépítésében és működésében résztvevő molekulahálózat összehangolását szabályozó mechanizmusok sokasága végzi. A különböző sejt folyamatokban résztvevő fehérjék szerepeinek szabályozásában fontos szerepet töltenek be a poszttranszlációs módosítások (PTM-ek). A PTM-ek a transzlációt követő változások, amelyek magukba foglalják a fehérjék enzimátikus hasítását illetve funkciós csoportok és molekulák kovalens kötéssel való kapcsolását. Ezek befolyásolhatják a fehérjék aktivitását, lokalizációját, stabilitását és más fehérjékkel való kapcsolatát is, így kulcsszerepet játszanak számos sejt folyamat szabályozásában. Az egyik leggyakoribb poszttranszlációs módosítási forma az ubikvitináció, mely során a célfehérjéhez egy vagy több ubikvitin molekula kapcsolódik kovalensen. Az ubikvitin egy kis, 76 aminosav hosszú, globuláris fehérje, mely szerkezetéből kifolyólag stabil. Az ubikvitin minden eukarióta szervezetben és szövetben megtalálható, erre utal a neve is, ami az angol „ubiquitous” (mindenütt jelenlevő) szóból ered, amelynek gyökere a latin „ubique” (mindenütt). Emellett az ubikvitin evolúciósan erősen konzervált, amire jó példa az élesztő és emlős ubikvitin közötti alig három aminosavnyi különbség (Zuin és *mtsai*. 2014).

Az ubikvitináció következtében a célfehérje sorsát a hozzá kapcsolódó ubikvitin pozíciója illetve ubikvitin lánc hossza és topológiája határozza meg, amit ubikvitin kódnak nevezünk (Komander és Rape 2012). Az ubikvitin módosításnak számos formája létezik, mint a monoubikvitináció, multi-ubikvitináció, ahol több ubikvitin molekula kapcsolódik a fehérje különböző lizinjeihez (K), illetve poliubikvitináció, melynek eredményeképpen egy ubikvitin polimer lánc jön létre. A poliubikvitin lánc hossza nagyon változó lehet, a kapcsolódó ubikvitin molekulák száma kettőtől több mint tízig terjedhet. A lánc hossza mellett érdemes beszélni a lánc topológiájáról is, amely meghatározhatja, hogy milyen ubikvitin receptorok és ubikvitinkötő domének ismerik fel a jelölt fehérjét (Wang és *mtsai*. 2005). Az ubikvitin láncok típusát az ubikvitin azon lizinjének a pozíciója határozza meg, melyhez a sorban következő ubikvitin molekula kötődik. Az ubikvitin aminosav-szekvenciája hét lizint tartalmaz, melyek bármelyike szolgálhat kötőhelyül a következő ubikvitin C-terminális glicinjének. Annak alapján, hogy a lizinek hányadikként foglalnak helyet az ubikvitin aminosav-szekvenciájában K6, K11, K26, K29, K33, K48 és K63 típusú kötésekről beszélünk, illetve M1 típusú kötésről, ha a molekula N terminális metioninja ubikvitinálódik. Abban az

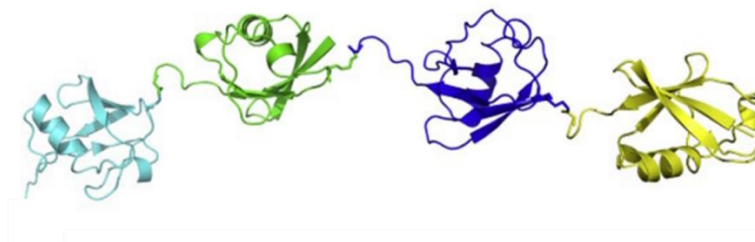
esetben, ha a poliubikvitin láncot alkotó molekulák mindig azonos pozícióban levő lizinhez kötődnek, akkor uniform vagy homotipikus láncról beszélünk, míg a különböző pozícióban levő lizineken keresztüli kapcsolódással létrejövő láncokat heterotipikusnak nevezzük (Swatek és Komander 2016; Yau és Rape 2016). Ezeken kívül létrejöhetnek még elágazó láncok, amikor ugyanazon ubikvitin két különböző lizinjéről kiindulva is történik lánchosszabbítás (Kim és mtsai. 2007; Peng és mtsai. 2003). Az eddigi kutatások leginkább a homotipikus láncok funkcióját tárták fel. Közülük is a K48, ami a sejtben levő ubikvitin láncok több mint 50%-át adja (Hershko és Ciechanover 1998a), és a K63 típusú módosítások számítanak a leggyakoribbnak.

Az ubikvitinkötő domének és ubikvitin receptorok specifikusak az egyes poliubikvitin lánc típusokra, melynek az a magyarázata, hogy a különböző kötésekkkel létrejött polimerek különböző konformációt vesznek fel (1. ábra).

A. K48-as típusú poliubikvitin lánc



B. K63-as típusú poliubikvitin lánc



1. ábra. A poliubikvitin láncok kompakt és nyitott szerkezete a K48-as és K63-as típusú ubikvitin oligomerek kristályszerkezetek alapján. A K48 kapcsolt tetraubikvitin semleges pH-n kompakt konformációt vesz fel (A, Eddins és mtsai. 2007), míg a K63 kapcsolt tetraubikvitin nyitott konformációval rendelkezik (B, Datta és mtsai. 2009).

Két típust különböztetünk meg, kompakt polimereket (1A. ábra), ide tartoznak a K48, K11 és K6 típusú poliubikvitin láncok, ahol az ubikvitin molekulák felszíne között kapcsolat van, illetve nyitott polimereket (1B. ábra), mint a K63 és M1 típusú láncok, ahol a kapcsolódási pontokon kívül nincs érintkező felület (Datta és mtsai. 2009; Eddins és mtsai. 2007; Ye és mtsai. 2012). Ennek eredményeképpen a polimerek funkciója is eltérő. A kompakt ubikvitint tartalmazó lánc típusoknak elsődleges szerepe a fehérjék szelektív lebontásának szabályozása,

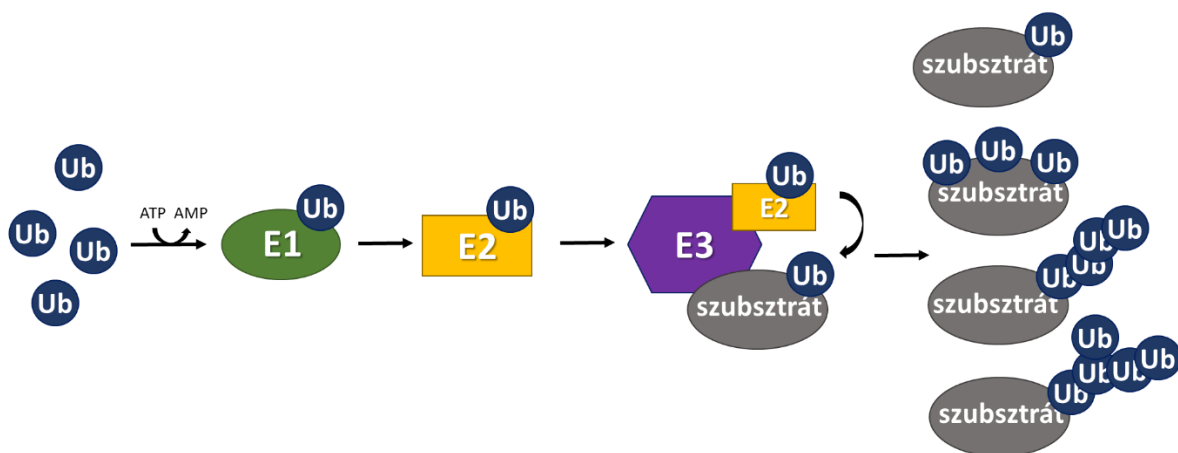
mivel az intracelluláris fehérjék degradációját végző proteaszóma felismeri és megköti őket. A nyitott konformációjú láncokat ezzel szemben nem ismeri fel a proteaszóma, viszont számos kötőpartnerrel rendelkezhetnek, melyek a lánc konformációjából adódó flexibilitást kihasználva egyfajta vázként használhatják azt.

1.2. Az ubikvitináció

Az ubikvitináció felfedezése az 1970-es évek közepére datálható, és a fehérjék degradációjában játszott szerepével áll összefüggésben. Avram Hershko, Aron Ciechanover és Irwin Rose arra keresték a választ, hogy mi lehet az intracelluláris fehérjék szelektív lebontásának a háttérmechanizmusa, illetve hogyan lehet ez egy energiaigényes folyamat annak ellenére, hogy a peptidkötések hidrolízise exergonikus reakció. Kísérleteik során megfigyelték, hogy a fehérjék lebontásának az a feltétele, hogy egy kis, hőstabil molekula (mint később kiderült az ubikvitin) egy ATP igényes folyamat következtében kovalensen kötődik a célfehérjéhez, ahol degradációs szignálként funkcionál (Hershko és *mtsai*. 1983). Az ubikvitin konjugációt egy háromlépéses enzimkaszád végzi (2. ábra), melynek az első lépése energiaigényes, ugyanis az ubikvitin aktiváló (E1) enzim egy ATP molekula felhasználásával aktiválja az ubikvitin C-terminális glicinjét, miközben tioészter kötést alakít ki a molekulával. Az ubikvitint ezután átveszi az ubikvitin konjugáló (E2) enzim, melynek az a feladata, hogy eljuttassa azt az ubikvitin-protein ligázhoz (E3 enzim), amelynek közreműködésével megtörténik a célfehérje ubikvitinációja. Az E3 enzimek nagy része RING (Really Interesting New Gene) finger domént hordoznak. Ezek az enzimek közvetetten vesznek részt az ubikvitinációban, azáltal, hogy platformot biztosítanak a folyamat számára. Az ubikvitint hordozó E2 enzim és a célfehérje megkötésével térben kialakítják a megfelelő pozíciót az ubikvitin transzferhez (Lorick és *mtsai*. 1999; Ozkan és *mtsai*. 2005). Az E3 enzimeknek csupán egy kisebb csoportja, a HECT (Homologous to E6-associated protein C-terminus) domént tartalmazó ubikvitin ligázok vesznek részt közvetlenül a fehérjék ubikvitinációjában (Huibregtse és *mtsai*. 1995). A HECT domén aktív centrumában levő cisztein és az ubikvitin között tioészter kötés alakul ki, így az ubikvitin transzfer az E3 enzimen keresztül valósul meg.

Az ubikvitináció során az ubikvitin molekula C-terminális glicinje és a szubsztrát egy lizinje, vagy első metioninja között izopeptid kötés alakul ki. Ha a folyamat ezen a ponton ér véget, akkor monoubikvitinációról beszélünk. Azonban az ubikvitin hét lizinjének valamelyikéhez, vagy az első metioninjához újabb ubikvitin molekulák kapcsolódhatnak, így

poliubikvitin láncok alakulhatnak ki. A folyamat szubsztrátspecifitásáért az E3 enzimek a felelősek, éppen ezért a három enzim közül ez alkotja a legnépesebb csoportot. Míg egy eukarióta genomban csak egy (emberben két) E1 enzim, illetve néhány tucat E2 enzim kódolt, addig több száz E3 enzimet ismerünk, melyek több ezer fehérje ubikvitinációjáért felelősek. A megjelölt fehérjéket felismeri és megköti egy nagyméretű és igen összetett proteáz funkcióval rendelkező komplex, a proteaszóma, amely elvégzi a fehérjék lebontását (Ciechanover, 2015; Hershko és Ciechanover, 1998).



2. ábra. A fehérje ubikvitináció mechanizmusának lépései. Az E1, E2 és E3 enzimekből álló enzimkaszád egy ubikvitin molekulát kapcsol kovalensen a célfehérjéhez. A folyamat a fehérjék mono-, multi- illetve poliubikvitinációját eredményezheti.

Az ubikvitin nem csupán degradációs szignálként funkcionálhat, bár a felfedezését követően ez a nézet még sokáig tartotta magát. Az ubikvitináció, a jelölés típusától függően, befolyásolhatja a fehérjék aktivitását, lokalizációját illetve más fehérjékkel való kölcsönhatását, ezáltal fontos szabályozó szerepet tölt be számos, ha nem az összes sejtfolyamatban.

1.3. A dezubikvitináció

A fehérjék funkciójának finomhangolásában lényeges szerepe van a PTM-ek eltávolításának, így a módosítások hatása megszűnik. A legtöbb PTM-hez hasonlóan az ubikvitináció is reverzibilis, mivel a dezubikvitiláló enzimek (DUB-ok) képesek eltávolítani az ubikvitin jelöléseket. A DUB-ok a fehérje és az ubikvitin, illetve az ubikvitinmolekulák közötti peptid és izopeptid kötéseket hidrolizálják. Ennek következtében a DUB-oknak

kulcsfontosságú szerepük van az ubikvitináció szabályozásában és számos sejtfolyamatban elengedhetetlen a jelenlétük. Az ubikvitinszignálok rendkívüli sokfélesége maga után vonta számos dezubikvitiláz aktivitással rendelkező enzim kialakulását. A DUB-okat hét családba soroljuk: USP, UCH, OTU, MJD, MINDY, ZUP1 és JAMM családok, melyek közül az első hat cisztein proteázokat tartalmaz, míg az utolsó metalloproteázokat. A MINDY és a ZUP1 családokat nemrégiben írták le emberben (Abdul Rehman és mtsai. 2016; Virdee és mtsai. 2018), *Drosophilában* azonban még nem sikerült azonosítani őket. Humán sejtekből már közel száz DUB-ot azonosítottak, ecetmuslicában pedig a számuk 45-re tehető (Kovács 2015). A DUB-ok között 11 pszeudoenzim is található, melyek katalitikusan inaktívak (Walden és mtsai. 2018). Ennek ellenére számos folyamat szabályozásában vehetnek részt a génextpressziótól a jelátvitelig. Szerepüket általában katalitikusan aktív enzimek alloszterikus szabályozásával töltik be, vagy vázként szolgálnak fehérje komplexek összeszereléséhez. Például az Rpn11 DUB aktivitással rendelkező proteaszóma alegység az Rpn8 pszeudoenzimmal együttműködve képes hatékonyan lehasítani a poliubikvitin láncot a szubsztrát degradációját megelőzően (Worden és mtsai. 2014). Az még nem biztos, hogy Rpn8 az Rpn11 alloszterikus aktiválásában vagy a komplexen belüli stabilizálásában játszik szerepet.

Az ubikvitin polimerek komplexitása és az ubikvitinált szubsztrátok változatossága következtében a DUB-ok aktivitása is sokféle lehet. Egyes DUB-ok, mint például a proteaszóma asszociált Uch37 és Usp14 (Lee és mtsai., 2011), a poliubikvitin lánc végén levő molekulákat hasítják le, ezáltal felszabadítva a monomereket. Más DUB-ok, mint az Rpn11 (Verma és mtsai. 2002), a proximális végétől hasítják le a teljes poliubikvitin láncot, amelyeknek feldolgozása az Usp5 feladata (Amerik és mtsai., 1997; Dayal és mtsai., 2009). A különböző DUB-ok affinitása eltérő lehet az egyes lánc típusokra vagy szubsztrátokra (Clague és mtsai. 2019). A DUB-ok legalább egy ubikvitinkötő hellyel rendelkeznek, így képesek az ubikvitin molekulát felismerni és megkülönböztetni más ubikvitinszerű jelölésektől, mint például a SUMO és NEDD8. Az elsődleges kötőhely az S1, mely az ubikvitin C terminális végét a hasítandó kötéssel a DUB aktív centrumához irányítja, ahol megtörténik a hidrolízis. Két ubikvitin közötti kötés hasítása közben az S1 helyet a disztális molekula foglalja el, míg a proximális molekula az S1' hellyel lép kölcsönhatásba. Egyes DUB-ok ezen felül S2, S2' illetve S3, S3' hellyekkel rendelkezhetnek, melyek az ubikvitin polimerek több molekulájával lépnek kölcsönhatásba és feltehetően szerepet játszanak a különböző lánc típusok megkülönböztetésében (Mevisson és Komander 2017). A DUB-ok affinitása a különböző lánc típusokra eltérő a családok között. A népes Usp család tagjai nem specifikusak szigorúan egyetlen lánc típusra (Faesen és mtsai. 2011), kivéve a CYLD-t, amely kizárólag a K63-as

típusú láncot hasítja (Komander és mtsai. 2008). A JAMM metalloproteázok leginkább a K63-as poliubikvitin láncot hasítják (Cooper és mtsai. 2009), a MINDY család tagjai pedig leginkább K48 specifikusak (Abdul Rehman és mtsai. 2016). A lánc hossza is meghatározó lehet, ugyanis az UCH és Josphin családok tagjai gyenge affinitást mutatnak a diubikvitinek irányában (Ritorto és mtsai. 2014). Ezen kívül a különböző DUB-ok az izopeptidkötéseket és peptidkötéseket is különböző hatékonysággal hasítják, ugyanis a kötések kémiai tulajdonságai jelentősen eltérnek. Az USP család tagjai, bár alacsony hatékonysággal, de hasítják a lineáris ubikvitin láncok peptidkötéseit, míg az OTU, JAMM és UCH család tagjai izopeptidáz kötés specifikusak (Komander és mtsai. 2009).

1.4. Az ubikvitináció szerepe

A fehérjék posztranszlációs módosítása ubikvitinációval, közvetlenül vagy közvetetten, az összes sejtfolyamatot érinti. Számos esetben a folyamatban résztvevő fehérjék szintjének szabályozásában játszik szerepet, méghozzá azok ubikvitin-függő degradációja által. Az ubikvitinált fehérjéket szelektíven felismeri és degradálja a 26S proteaszóma (Hershko és Ciechanover 1998b). A proteaszómális degradáció kanonikus szignálja a K48-as típusú poliubikvitin lánc, de az utóbbi időben világossá vált, hogy ennél sokkal plasztikusabb mechanizmusról van szó.

A proteaszóma összetett szerepét a fehérjedegradációban a szerkezete is tükrözi. Számos (~33) különböző alegységből áll, melyek két alkombexbe rendeződnek. A fehérjék oligopeptidekre való bontását a cylinder alakú 20S mag partikulum végzi, amelyhez egy vagy két 19S regulátor komplex kapcsolódhat (Ciechanover 1998). A proteaszóma felelős az intracelluláris fehérjék 80 %-nak lebontásáért. A mag partikulum három különböző típusú proteolitikus helyet tartalmaz: a tripszin-, kimotripszin- és kaspázszerű aktivitással rendelkező alegységek biztosítják az igen változatos aminosav szekvenciák hatékony emésztését. A regulátor partikulumot alkotó alegységeknek a lebontásra kijelölt fehérje felismerésében, megkötésében, kicsomagolásában és a proteolitikus kamrába való transzlokációjában van szerepe. Az ubikvitinált fehérjék felismerése és megkötése az ubikvitin receptorok feladata. A proteaszóma több ubikvitin receptorral is rendelkezik, melyek közül az Rpn10/p54 (Elsasser és mtsai. 2004; Haracska és Udvardy 1997) és a Rpn13 rendelkeznek a legnagyobb poliubikvitin affinitással. A polipeptidek széttekerését és transzlokációját a proteolitikus kamrába a 19S regulátor partikulum a hat ATPáz alegysége katalizálja (Grice és Nathan 2016;

Inobe és Matouschek 2014). Az ubikvitin sok esetben nem bomlik le a fehérjével együtt, ugyanis a DUB aktivitással rendelkező Rpn11 alegység még a fehérjelebontást megelőzően, egy ATP függő lépésben lehasítja a poliubikvitin láncokat (Verma és *mtsai*. 2002; Worden és *mtsai*. 2014). Az ubikvitinált fehérjék kötődése a proteaszómához egy ideig reverzibilis, ami lehetőséget ad a fehérjedegradáció fimomhangolására (Collins és Goldberg 2017). Egyes proteaszóma szubsztrátok poliubikvitin láncát a DUB aktivitással rendelkező Usp14 és UchL5 proteaszóma alegységek annyira megrövidítik, hogy a fehérje leválik a proteaszómáról, így elkerüli a degradációt (Lee és *mtsai*. 2011).

Az poliubikvitinált szubsztrátok szelektív degradációjának módja az elmúlt években számos tanulmány tárgyát képezte. Sokáig tartotta magát az a nézet, hogy ubikvitinreceptorok minimum négy molekulából álló ubikvitin szignált ismernek fel. Ezen elmélet szerint a receptor és a poliubikvitin lánc közötti kötés affinitása a lánc hosszával erősödik (Thrower és *mtsai*. 2000). A rövidebb láncok hossza ugyanis az Usp14 és Uch37 aktivitásának következtében gyorsan 4 molekula alá csökkenhet, ami a szubsztrát disszociációját eredményezi. Hosszabb láncok esetén az ubikvitin monomerek eltávolításával sem csökken a polimer hossza négy molekula alá, így megtörténhet a fehérjelebontás. Ez a mechanizmus biztosítja, hogy a gyengén ubikvitinált fehérjéket a proteaszóma ne degradálja (Lee és *mtsai*. 2011). Az elmúlt évek kutatásai alapján azonban világossá vált, hogy ez az elmélet nem minden esetben állja meg a helyét. A ciklin B multiubikvitinációja például alternatív degradációs szignálként működhet (Dimova és *mtsai*. 2012; Lu és *mtsai*. 2015), illetve a 150 aminosavnál kisebb polipeptidek esetén egyetlen ubikvitin kötődése is elegendő lehet a fehérje lebontásához (Shabek és *mtsai*. 2012). Ehhez az is hozzájárulhat, hogy lényegesen növeli a proteaszómális degradáció hatékonyságát, ha szubsztrát tartalmaz egy nem strukturált régiót, amely iniciációs helyként szolgálhat a lebontáshoz (Prakash és *mtsai*. 2004).

Az ubikvitin nem csupán degradációs szignálként működik. Az ubikvitinnel való módosítás befolyásolhatja a fehérje aktivitását, intracelluláris lokalizációját vagy elősegítheti a fehérjék közötti szignáltranszdukciót. Jó példa erre a sejtben fellelhető második leggyakoribb ubikvitin módosítás, K63-as típusú poliubikvitináció, illetve a monoubikvitináció. A K63-as polimer, a K48-as típusú poliubikvitin láncsal ellentétben nem eredményez proteaszómális degradációt. Ezzel szemben különböző fehérje komplexek létrejöttében játszik szerepet, mintegy kapocsként vesz részt ezek összeszerelésében. Legismertebb szerepe az immunválaszban kulcsszerepet betöltő Nukleáris Faktor-kappa B (NF- κ B) transzkripció faktor szabályozása. Ezáltal fontos szerepet tölt be több jelátvételi úton, melyek az NF- κ B-ben futnak össze (Deng és *mtsai*. 2000; Skaug és *mtsai*. 2009; Wertz és Dixit 2010). Az

immunválasz során a K63-as poliubikvitin lánc molekuláris vázként szolgál a jelátvitelben résztvevő kináz kaszkád elemei számára, melyek a poliubikvitin lánchoz kötődve fizikai közelségbe kerülnek és továbbadják az aktivációs szignált. Hasonló szerepet tölt be a jelátvitelben az M1 típusú ubikvitin lánc, amelynek a konformációja is igen hasonló a K63-hoz (Rahighi és *mtsai*. 2009). Az NF- κ B jelátviteli útban azonban nem csupán a már jól ismert, homotipikus poliubikvitináció játszik szerepet, hanem előfordulnak heterotipikus és elágazó polimerek is. A K63 és M1 típusú ubikvitin láncok egyetlen hosszú polimerként tölthetők be a vázképző szerepüket, a K48-K63 elágazó láncok pedig ellenállóbbnak bizonyultak a DUB-okkal szemben, így jelenlétük erősíti a jelátvitelt (Ohtake és *mtsai*. 2016).

Az ubikvitináció a DNS hibajavításban is fontos szerepet tölt be. A DNS károsodások a replikációs villa megakadásához vezetnek a DNS szintézis közben, ami hosszabb fennállás esetén a villa megbomlását és a genom instabilitását eredményezheti. Ezt elkerülendő, a replikációban keletkezett zavar esetén beindulnak a PCNA ubikvitinációjával szabályozott DNS károsodást toleráló útvonalak. PCNA egy gyűrű alakú homotrimer fehérje, amely a DNS-t körülölelve elősegíti annak replikációját, ugyanis platformként szolgál a DNS polimeráz és más faktorok DNS-hez való kötődéséhez (Krishna és *mtsai*. 1994; Majka és Burgers 2004). Ha a replikáció során a rendszer hibát észlel a DNS-ben, a RAD6/RAD18 (E2 és E3 enzim) komplex egy ubikvitin molekulát kapcsol a PCNA 164-es lizinjéhez (Hoegge és *mtsai*. 2002). Ha a PCNA monoubikvitinációját követően a DNS replikáció transzléziós szintézissel folytatódik. A szintézisben résztvevő DNS polimerázok (Pol δ or Pol ϵ) a PCNA monoubikvitinációjának hatására leválnak a DNS-ről, és helyüket specializált transzléziós polimerázok veszik át. A transzléziós polimerázok képesek a lézióval szemben is nukleotidot beépíteni, viszont pontatlanságuk miatt báziscserés mutációt eredményezhetnek (Lee és Myung 2008). Ezzel ellentétben a templátcsere mechanizmusa kikerüli a léziókat és az új szál hibamentesen szintetizálódik. A templátcsere abban az esetben jön létre, ha a monoubikvitinált PCNA-hoz további ubikvitin molekulák kapcsolódnak és K63-kapcsolt poliubikvitin láncot hoznak létre. A reakciót a heterodimer Ubc13/Mms2 komplex, illetve a RAD5 E3 enzim katalizálja (Parker és Ulrich 2009). A K63 típusú poliubikvitin láncsal jelölt PCNA beindítja azt a mechanizmust, melynek során az új szál szintézise a hibás szál helyett egy homológ szakaszcson, általában a testvérkromatidáról történik. Ezt a replikációs villa átrendeződése teszi lehetővé, így a hibás régió egy háromszálas DNS struktúrát hoz létre a homológ duplexszel, majd a hibás szál helyett a duplex újonnan szintetizált szála szolgál templátként a DNS szintézishez, elkerülve a hibás szakaszt (Branzei és Szakal 2016; Vujanovic és *mtsai*. 2017).

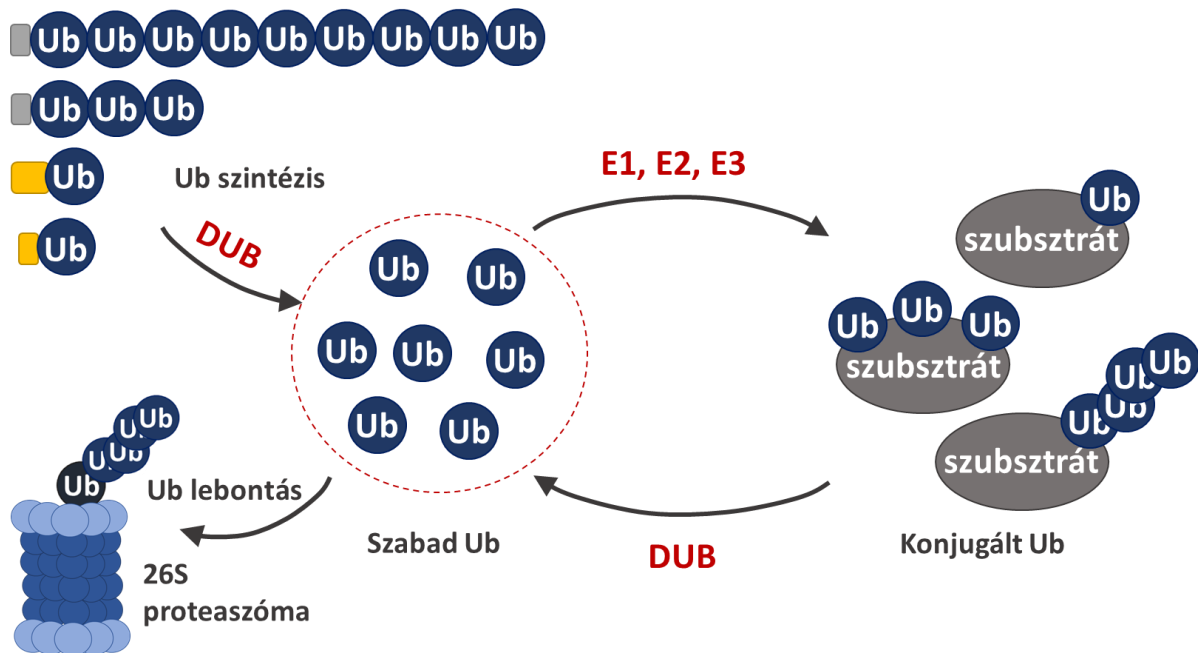
A sejtben kisebb koncentrációban jelenlevő és kevésbé ismert funkciójú ubikvitin polimereket atipikus láncoknak nevezzük. A K6, K27, K29 és K33 típusú láncok előfordulása a sejtben együttesen is kevesebb a K48 előfordulásánál, fiziológiai relevanciájuk pedig csupán az utóbbi pár évben kezdett körvonalazódni. Többek között szerepük van a mitofágiában, a DNS hibajavításban és az mRNS stabilitás szabályozásában (Meza-Gutierrez és *mtsai*. 2018).

1.5. Az ubikvitin homeosztázis

Az ubikvitináció és dezubikvitináció ellentétes reakcióinak köszönhetően az ubikvitinmolekula állapota a szabad és kötött formák között váltakozik. A sejtben található szabad monoubikvitinkészletből a molekulák az E1, E2 és E3 enzimaszkád közreműködésével a megfelelő fehérjéhez kapcsolódnak. A fehérjékhez konjugált ubikvitinek a DUB-ok közreműködésével újrahasznosíthatóak, mivel az izopeptid kötések hidrolízisével az ubikvitin molekulák felszabadulnak és visszakerülnek a szabad ubikvitin készletbe.

A sejt ubikvitin tartalmának 40-80%-a szabad monomerként van jelen, amelyet szabad ubikvitin pool-nak nevezünk. A szabad ubikvitinek mennyisége sejttípusonként eltérő lehet, viszont sejten belül dinamikus egyensúlyi állapotban van. A dinamikus egyensúly fenntartásában az ubikvitin-újrahasznosítása mellett fontos szerep jut az ubikvitin *de novo* szintézisének és lebontásának is (3. ábra). Az eukarióta a genomban az ubikvitint általában négy gén kódolja, melyekről riboszómális proteinekhez kapcsolódva, vagy lineáris láncként íródik át (Ozkaynak és *mtsai*. 1987; Wiborg és *mtsai*. 1985). A *Drosophilában* genomjában két olyan gén található, az *RpL40* és *RpS27A*, amelyről riboszómális fehérjével kapcsolt monoubikvitin íródik át (Cabrera és *mtsai*. 1992; Lee és *mtsai*. 1988). Az *Ubi-p5E* és *Ubi-p63E* pedig poliubikvitin gének, amelyek az ubikvitineket lineáris láncként kódolják (Izquierdo 1994). *Drosophila melanogasterben* egy ötödik ubikvitin gént is azonosítottak, a *CG11700*-at, amely a faj evolúciója során, az *Ubi-p5E* gén duplikációja következtében alakulhatott ki (Zhan és *mtsai*. 2012). Az *Ubi-p5E* génnel ellentétben a *CG11700* kevésbé konzervált és hímspecifikus expressziót mutat. A 4-5 ubikvitin génről újonnan szintetizált ubikvitin prekursorokat a DUB-ok monomerekre hasítják, így azok a szabad ubikvitinkészletbe kerülnek. A fenti mechanizmusok mellett a molekulák degradációja is hozzájárul a megfelelő ubikvitinszint fenntartásához (Weissman és *mtsai*. 2011). A molekula stabil szerkezettel rendelkezik, amely ellenáll a stresszhatásoknak, viszont a katabolikus folyamatok rá is hatással vannak. Az ubikvitin féléletideje 10 óra körüli, lebontása pedig több úton is történhet:

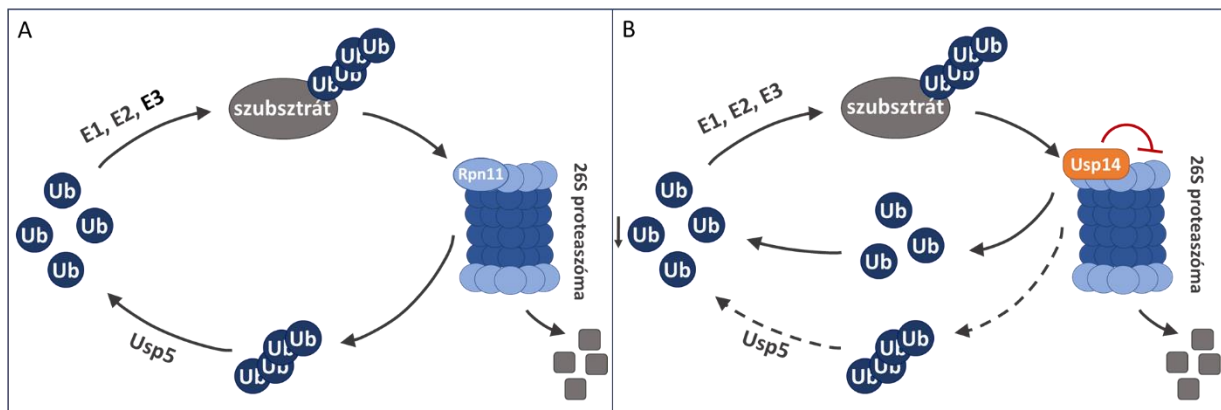
szubsztrátjával együtt lebonthatja a proteaszóma, illetve maga az ubikvitin molekula is ubikvitinálódhat (Shabek és mtsai. 2007) vagy ubikvitinfüggetlen módon is degradálódhat.



3. ábra. Az ubikvitin formák sejten belüli egyensúlyát biztosító mechanizmusok. A szabad ubikvitinkészletből a molekulák az E1, E2 és E3 enzimek közreműködésével kapcsolódnak a szubsztrátfehérjékhez. A kötött ubikvitin-újrahasznosítása a DUB-ok által történik, melyek felszabadítják az ubikvitin monomereket. Az ubikvitin-egyensúly fenntartásában az ubikvitin-újrahasznosítás mellett szerepet játszik az ubikvitinszintézis és degradáció is. Az újonnan szintetizált ubikvitin vagy egy poliubikvitin láncoként íródik át, amely néhány aminosavnyi meghosszabbítást hordoz (szürke), vagy egy riboszómális fehérjével (sárga) fuzionált monomerként.

A szabad és konjugált ubikvitin formák közötti körforgásban és ezáltal az ubikvitin újrahasznosításban nagy szerepe van ubikvitin-proteaszóma rendszernek (4. ábra). Az ubikvitin újrahasznosításában, így a szabad ubikvitinkészlet fenntartásában, az Rpn11, Uch-L5 és Usp14 proteaszóma-asszociált DUB-ok vesznek részt, illetve a szabad poliubikvitin láncokat hidrolizáló Usp5. A felsoroltak közül mindegyik DUB evolúciósan konzervált, egyedül az Uch-L5 ortológját nem sikerült azonosítani sarjadzóélesztőben. A proteaszóma-asszociált DUB-ok ellentétes szerepet töltenek be a szubsztrátok lebontásában. Míg az Rpn11 elősegíti a lebontást, addig az Uch-L5 és Usp14 gyengíti a proteaszóma és a szubsztrát kölcsönhatását. Fontos eltérés van ezen kívül a hasítás helyében, ugyanis az Rpn11 a szubsztrát és a poliubikvitin lánc közötti kötést hasítja el, a másik két DUB pedig a láncvégi ubikvitin molekulák lehasítását katalizálja (Lee és mtsai. 2011; Verma és mtsai. 2002). Az Rpn11 a

proteaszóma szabályozó alkomplexének egy alegysége, amelynek DUB funkciója lehetővé teszi a proteaszóma által megkötött szubsztrátok ubikvitin jelölésének eltávolítását a fehérjedegradációt megelőzően (Verma és mtsai. 2002). Az Rpn11 a proximális végétől, a szubsztrátfehérje és az első ubikvitin közötti kötést hidrolizálva, *en bloc* hasítja le a poliubikvitin láncot, mely így szabad láncként kerül a citoplazmába. A citoplazmában az Usp5 hidrolizálja a szabad poliubikvitin lánc izopeptid kötéseit, felszabadítva az ubikvitin monomereket (Dayal és mtsai. 2009; Kovács és mtsai. 2015). Az Usp5 funkcióvesztése esetén a szabad poliubikvitin láncok akumulálódnak a citoplazmában, ami a proteaszóma kompetitív gátlásához vezet. Ez ubikvitin stresszt eredményez, ami az Usp14 DUB expressziójának emelkedését eredményezi (Kovács és mtsai. 2015). A proteaszóma-asszociált Usp14 felszabadítja a kötött ubikvitint, egyúttal pedig menekíti a szubsztrátot a proteaszómális degradációtól. Az Uch-L5 is hasonló szerepet tölt be, viszont a rendelkezésünkre álló adatok szerint az Usp14 jelentősen gyorsabb a poliubikvitin láncok rövidítésében, de az is elképzelhető, hogy a két DUB különböző típusú poliubikvitin láncot preferál (Lee és mtsai. 2011).



4. ábra. Az ubikvitin körforgása az ubikvitin proteaszóma rendszerben. Az E1, E2 és E3 enzimek által ubikvitinált fehérjéről az Rpn11 proteaszóma alegység lehasítja a poliubikvitin láncot, ami a citoplazmába kerül, ahol az Usp5 ubikvitin monomerekre hasítja (A). A szabad ubikvitinkészlet csökkenése esetén az Usp14 a proteaszóma szubsztrátokat megjelölő poliubikvitin láncok disztális végéről egyenként lehasítja és ezáltal újrahasznosítja az ubikvitin monomereket. Az Usp14 aktivitás következtében megrövidülnek a degradációs jelként szolgáló poliubikvitin láncok, mely a szubsztrátfehérje disszociációját eredményezheti a proteaszómáról, ezáltal a fehérjelebonthatás gátlását (B).

A sejt ubikvitin-egyensúlya jó indikátora a sejt fiziológiai állapotának. Az még nem teljesen tisztázott, hogy az ubikvitinkészletben történt változások okai-e a homeosztázis felborulásával járó abnormális fenotípusoknak, vagy inkább következményei annak. A sejtek

ubikvitinszintjében bekövetkező változások mérésére az elmúlt harminc évben számos módszert dolgoztak ki, az ELISA-tól a legmodernebb tömegspektrometrián alapuló módszerekig (Park és Ryu 2014). A RIA (Radioimmunassay) és ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) módszerekkel elkülöníthetőek a szabad és a konjugált ubikvitinek. Ezekkel a módszerekkel az ubikvitin formák mennyisége aránylag egyszerűen számszerűsíthető, viszont az eredmények kevésbé pontosak (Takada és *mtsai.* 1995, 1996). A tömegspektrometrián alapuló módszerekkel, mint például az Protein Standard Absolute Quantification (Ub-PSAQ), sokkal részletesebb képet kapunk a sejt ubikvitin tartalmának dinamikájáról és a formák eloszlásáról, viszont költséges és rutinszerűleg nem alkalmazható (Kaiser és *mtsai.* 2011). Erre megoldást jelenthet az Oh és munkatársai által 2013-ban kifejlesztett Western blot alapú módszer, melynek segítségével egyszerűen és költséghatékonyan mérhető a szövetek mono- és teljes ubikvitin koncentrációját. A különböző módszerek mind hozzájárultak ahhoz, hogy jobban megértsük, hogyan befolyásolja az ubikvitin-egyensúly a sejt működést, viszont még mindig számos a megválaszolatlanul maradt kérdés.

1.6. Az APC/C szerepe az ubikvitin-függő fehérjelebontásban

Az ubikvitináció szubsztrátspecifitását az ubikvitin ligáz (E3) enzimek határozzák meg. A legnagyobb és legösszetettebb E3 enzim az APC/C, amely többnyire sejtciklus szabályozó fehérjéket jelöl ki lebontásra. A mitózis során a metafázis-anafázis átmenetben, majd a mitózis végén és a G1 fázis fenntartásában játszik szerepet. Ezen kívül kevésbé ismert funkciót tölt be a meiózis, a differenciálódás és a sejt migráció szabályozásában is (Eguren és *mtsai.* 2011).

Az APC/C a cullin-RING ligáz (CRL) családba tartozik, ugyanis a katalitikus centruma egyaránt tartalmaz Cullin és RING alegységeket (Tang és *mtsai.* 2001). A CRL család közös jellemzője, hogy a szubsztrátreceptorként működő alegységek felismerik és megkötik a célfehérje degron szekvenciáját, ami egy destruktív jel, majd a Cullin-RING katalitikus mag egy átmeneti tioészter kötést hoz létre a szubsztrát és egy E2 enzim között, ami lehetővé teszi az ubikvitin áthelyezését a célfehérjére (Watson és *mtsai.* 2019). Az APC/C két E2 enzimmel működik együtt, az UbcH10-el, melynek a poliubikvitin lánc iniciálásában és az UBE2S-el, melynek a poliubikvitin lánc elongációjában van szerepe (Wu és *mtsai.* 2010). Az UBE2S a K11 atipikus poliubikvitin lánc kialakításában játszik szerepet. Eddigi eredmények alapján úgy tűnik, hogy a K11-es ubikvitináció nagyrészt az APC/C és az UBE2S együtműködésének

köszönhető, így ez a lánctípus leginkább az osztódó sejtekre jellemző (Matsumoto és *mtsai*. 2010). Az UbcH10 rövid, K11, K48, K63 kevert hoz létre, az UBE2S-el való együttműködése pedig elágazó (K11-K48) ubikvitin polimert eredményez, amelyet felismer a 26S proteaszóma (Grice és *mtsai*. 2015).

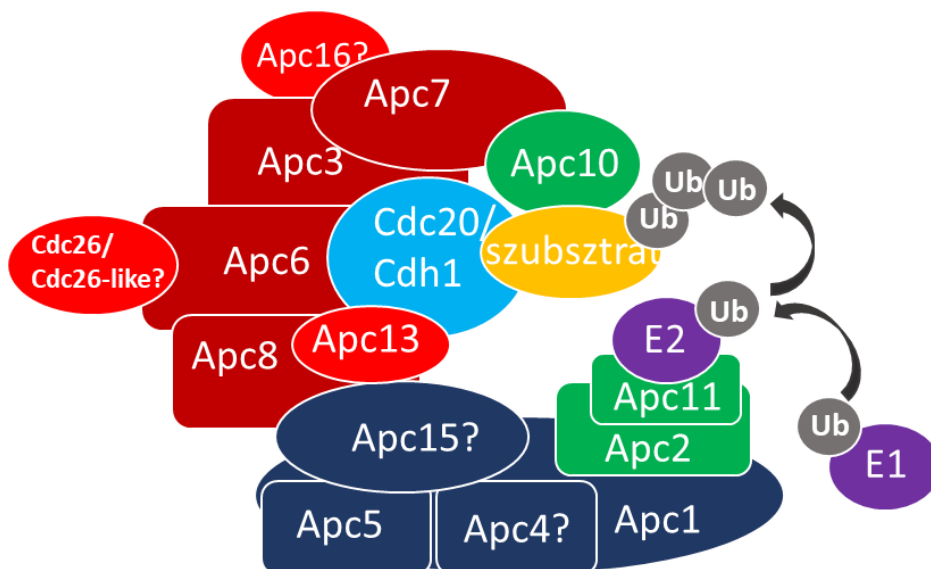
Az APC/C aktivitása igen szigorúan szabályozott, amelyben nagy szerepe lehet annak, hogy az E3 enzimek közül a legtöbb alegységgel rendelkezik. Az APC/C alegységek közül közül 9 egy példányban, míg 5 dimerként van jelen a komplexben (Watson és *mtsai*. 2019). Az APC/C aktiválása az alegységek foszforilálásával és koaktivátorok kapcsolódásával történik. A komplex két koaktivátorral rendelkezik, a Cdc20-al (*Drosophila* homológja Fizzy) és Cdh1-el (*Drosophila* homológja Fizzy-related), amelyek a sejtciklus különböző fázisait szabályozzák és meghatározzák a megfelelő szubsztrátok időzített degradációját (Visintin és *mtsai*. 1997). Az APC/C-Cdc20 a mitózis korai szakaszaiban és az anafázisba való átmenetben vesz részt. Az APC/C-t a profázisban, a Cdc20 kapcsolódása aktiválja, ehhez több feltételnek is teljesülnie kell. Több APC/C alegységet foszforilálnia kell a mitotikus ciklin-CDK komplexnek (Zhang és *mtsai*. 2016), illetve a CDC20-nak fel kell szabadulnia az orsó ellenőrzési pont gátlása alól. Az APC/C-Cdc20 egyik legfontosabb feladata, hogy kijelöli a degradációra a szeparáz aktivitását gátló szekurint (Thornton és Toczyski 2003). A gátlás alól felszabaduló szeparáz proteolitikusan hasítja a testvérkromatidákat összetartó kohezin komplexet, ezzel elősegítve a kromoszóma-szegregációt. Az APC/C-Cdc20-nak ezen kívül szerepe van a mitotikus ciklinek (A és B) degradációjában (Deak és *mtsai*. 2003), ami ciklin-dependens kináz 1 (Cdk1) fokozatos inaktiválását vonja maga után. A Cdc20 az anafázis végére Cdh1-re cserélődik, mivel Cdk1 aktivitás csökkenésével a Cdh1 felszabadul a gátló foszforiláció alól, mely addig gátolta a kapcsolódását az APC/C-vel. Az APC/C-Cdh1 szubsztrátjai közé tartozik maga a Cdc20, az Aurora A és B kinázok, a Polo-szerű mitotikus kinázok, amelyek lebontása lehetővé teszi a mitózis befejezését. Ezen kívül az APC-Cdh1 szerepkörébe tartozik a ciklinek alacsony szinten tartása, így a gyenge Cdk1 aktivitáson keresztül biztosítja a G1 fázis fenntartását (Alfieri és *mtsai*. 2017a).

Az APC/C-Cdh1 részt vesz egy alternatív sejtciklus szabályozásában is, az endoreduplikációban vagy endociklusban, ahol a DNS replikációt nem követi sejtosztódás. *Drosophilában* az endociklusnak a sejt- és szövetnövekedésben van szerepe, leginkább az embriogenezis és lárvális fejlődés során, de kisebb mértékben a felnőtt állatokban is megfigyelhető. A mitotikus ciklusból az endociklusra való áttérés a Cdk1 inaktiválásának köszönhető, az endociklus fenntartását pedig a Cdk2-ciklin E oszcilláció biztosítja (Narbonne-Reveau és *mtsai*. 2008). Az APC/C-Cdh1 a metabolizmusban is szerepet játszik, szubsztrátjai

között számos, az anyagcserét befolyásoló enzim található, mint például a Pfkfb3 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3), mely a glikolízist segíti elő (Calvo és mtsai. 2006). A APC/C közreműködésével a Pfkfb3 degradálódik, ami hozzájárul ahhoz, hogy a sejt a glikolízissel szemben a pentóz-foszfát útvonalat részesítse előnyben. Ehhez hasonlóan emberi limfocitákban a glutamináz is az APC-Cdh1 szubsztrátjai közé tartozik, degradációja pedig a glutaminolízist gátolja, ami végső soron a proliferáció elmaradását eredményezi (Eguren és mtsai. 2011).

1.7. Az APC/C felépítése és szabályozása

Az APC/C 13-15 alegységgel rendelkezik (Watson és mtsai. 2019), amelyek három alkombexbe rendeződnek: a platform alkombex, a tetra-trikopeptid (TPR) ismétlődéseket hordozó alkombex és a katalitikus mag (5. ábra ; Alfieri és mtsai. 2017).



5. ábra. Az APC/C alegységeinek és szerkezetének sematikus ábrázolása. Az APC/C alegységei három strukturális és funkcionális alkombexet alkotnak: a platform alkombex (sötétkék), TPR ismétlődéseket hordozó alkombex (sötétpiros), illetve ennek kiegészítő alegységei (világospiros) és a katalitikus alkombex (zöld). Az APC/C-hez felváltva két aktivátor alegység kapcsolódhat (világoskék). Kérdőjellel vannak jelölve a *Drosophilában* még nem azonosított alegységek.

A platform alkombex alapként szolgál a további alegységek kapcsolódásához, melyek így kialakítják a másik két alkombexet. A TPR alegységek egy szerkezeti vázként működő, strukturálisan összefüggő egységet alkotnak, amely fontos szerepet töltve be az APC/C

összeszerelésében és a szabályozó fehérjékkel való kölcsönhatásban. A TPR alegységeket magába foglaló alkomplex szerkezetét kisméretű kiegészítő alegységek stabilizálják. A harmadik, katalitikus aktivitással rendelkező alkomplex, az E2 enzimekkel együttműködve vesz részt a megfelelő szubsztrátok ubikvitinálásában (Sivakumar és Gorbsky 2015). Az APC/C aktivitása szigorúan és több szinten szabályozott a koaktivátorok és gátló fehérjék kötődése, és az alegységek foszforilációja által. Az alegységek foszforilációja befolyásolja Cdc20 és Cdh1 koaktivátorok kötődését, az orsó-összeszerelési ellenőrzési pont (SAC-Spindle Assembly Checkpoint) és az Emi1 (Early Mitotic Inhibitor) fehérjék pedig gátolják az APC/C működését (Chang és mtsai. 2015).

Az SAC a Cdc20 koaktivátoron keresztül szabályozza az APC/C aktivitását, ezáltal biztosítva a kromoszómák megfelelő szegregációját. A SAC a kinetokorok és a mitotikus orsó közötti kapcsolódás hiányában a mitotikus ellenőrző komplex (MCC-mitotic checkpoint complex) összeszerelésével reagál, amely gátolja Cdc20 kötődését az APC/C-hez és ezáltal a szubsztrátok degronjának felismerését (Alfieri és mtsai. 2016). Ez a mechanizmus biztosítja a metafázis-anafázis átmenet megfelelő időzítését és az utódsejtekbe jutó kromoszómák egyenlő eloszlását. A Cdc20-at az anafázisban Cdh1 váltja fel, azután, hogy a Cdk1 inaktivációjának következtében a Cdh1 defoszforilálódik. Az APC/C-Cdh1 szabályozásában ezen kívül részt vesz az Emi1 fehérje, amely interfázis során gátolja az E2 enzimek kölcsönhatását az APC/C-vel (Chang és mtsai. 2015).

Az APC/C aktiválásához elengedhetetlen az alegységek foszforilációja a mitózis kezdeti fázisaiban. A foszforilációt a Cdk1 illetve a Plk (polo-like kináz) mitotikus kinázok katalizálják. Az utóbbi időben a 14 különböző APC/C alegységen legalább száz foszforilációs helyet azonosítottak (Qiao és mtsai. 2016). Egyes alegységek, mint például az Apc1 és Apc3 hiperfoszforilációja előfeltétele a Cdc20 kötődésének. Élesztőben a TPR motívumot alkotó alegységek (Apc6, Apc8 és Apc3) foszforilációs helyeinek elrontása késlelteti az APC/C-Cdc20 aktivációját (Qiao és mtsai. 2016). A mitózis korai szakaszában pedig a Cdh1 foszforilációja gátolja annak kapcsolódását az APC-hez (Zhang és mtsai. 2016).

Az APC/C alegységeinek összetétele evolúciósan konzervált, kisebb eltéréseken kívül az élesztőtől az emberig hasonló szerkezettel és funkcióval rendelkezik. Csoportunk az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) APC/C számos alegységét kódoló gén azonosításában és jellemzésében vett részt. A *mákos/Cdc27* gén például az Apc3 alegység *Drosophila* homológját kódolja. Az *mákos/Cdc27* mutánsban a sejtek megrekedtek egy metafázis szerű állapotban, a kromoszómák túlkondenzáltak (a kromoszómák mikroszkópos képére utal a gén neve) és a mitotikus ciklinek nem degradálódtak (Deák és mtsai. 2003). Az élesztő és humán

APC/C TPR alegységeinek szekvenciái alapján csoportunk az *Apc6*, *Apc7* és *Apc8* homológjait is azonosította ecetmuslicában. Az alegységeket kódoló gének RNS interferenciával való csendesítése az *Apc6* és *Apc8* esetén bábletalitást eredményezett, mitótikus fenotípusuk pedig hasonló volt az *mákos/Cdc27* esetén megfigyelttel. Az *Apc7* ezzel szemben nem bizonyult esszenciálisnak és a mutáns mitótikus fenotípusa sem tért el a vad típustól (Pál és *mtsai*. 2007a). Ezen kívül csoportunk azonosította a dicisztronos *lemming* gén 5' vége felőli fehérjekódoló szakaszát, a *lemmingA*-t, mint az *Apc11* katalitikus alegységet kódoló gént. Az *Apc11*-et kódoló gén mutációja a tipikus mitótikus fenotípus mellett poliploid és apoptotikus sejtek mennyiségének növekedését eredményezte harmadik stádiumú (L3) lárva agypreparátumokban, ami a citokinézis elmaradásának lehet a következménye (Nagy és *mtsai*. 2012).

A *Drosophila* APC/C-vel kapcsolatban a mai napig is vannak megválaszolatlan kérdések. Bizonyos alegységeket, mint például az *Apc13* és *Cdc26*, még nem azonosítottak, másokat meg nem jellemeztek. Az APC/C alegységeinek további vizsgálata segíthet abban, hogy jobban megértsük az ecetmuslicában és ez által a többsejtű organizmusokban az APC/C szerkezetét és működését.

1.8. Az APC/C *Cdc26* alegysége

A *Cdc26* az APC/C egyik legkisebb alegysége, amely feltehetően kiegészíti, és ezáltal stabilizálja a TPR alegységek struktúráját. A *Cdc26*-ot először sarjadzó élesztőben azonosították, mint az APC/C egyik alegységét kódoló gént. Normál körülmények között a *Cdc26* fehérje nem létfontosságú, viszont magas hőmérsékleten (37 °C) elengedhetetlen volt az APC/C működéséhez, ugyanis stressz körülmények között stabilizálta komplex szerkezetét (Zachariae és *mtsai*. 1996). Ezen kívül még igen keveset tudunk erről az alegységről és szerepéről az APC/C felépítésében. Fonalféregben *Cdc26*-ot kódoló gén létfontosságúnak bizonyult, RNS interferenciával való enyhe csendesítése polaritási hibákhoz vezetett az embriókban, erős csendesítése pedig az embrionális fejlődés megrekedéséhez vezetett a meiózis I metafázisában (Dong és *mtsai*. 2007). Az emberi *Cdc26* és az APC/C kapcsolatát koimmunprecipitációs kísérletekkel vizsgálták, ami igazolta, hogy a *Cdc26* a komplex állandó alegysége, és annak szerkezeti felépítésében játszik szerepet (Gmachl és *mtsai*. 2002).

A *Cdc26* kisméretű és nagyrészt nem strukturált fehérje, amely a hasonló paraméterekkel rendelkező *Apc9* és *Apc13*-mal egyetemben a TPR alegységek

kiegészítőjeként működik. Az emberi APC/C alegységek szerkezeti vizsgálata rávilágított, hogy a Cdc26 az Apc6-al heterotetramert alkot és ezáltal stabilizálja a TPR szuperhélixet. A TPR motívum egy hélix-turn-hélix struktúrát alkot, több motívum pedig egy szuperhelikális doménbe rendeződik (Barford 2011; Wang és *mtsai.* 2009). Az Apc6 nyolc TPR motívumot tartalmaz, amelyek egy szolenoid-szerű struktúrába szerveződnek és körülölelik a Cdc26 N-terminális végét. Ez az N-terminális 29 aminosavnyi szekvencia (Cdc26^N) elég a Cdc26 funkciójának ellátásához az Apc6 stabilizálásában. Az első 12 aminosav egy nyújtott konformációt vesz fel, míg a következő 13 egy hélixet alkot. A hélix kölcsönhat az Apc6 nem-TPR hélixével és együttesen utánozzák a TPR motívumok szerkezetét. Az így létrejött komplex növeli az Apc6 hőstabilitását és csökkenti az aggregációra való hajlandóságát. Több adat is arra utal, hogy Apc6-Cdc26^N kapcsolódásából kialakult struktúra az eukarióta evolúció során konzerválódott. Például a humán Cdc26^N-t sikerült együtt tisztítani a karmosbéka Apc6-al, illetve a teljes hosszúságú humán Cdc26 és a Cdc26^N túltermeltetése egyaránt menekíti a sarjadzóélesztő Cdc26 Δ mutáns hőszenzitív fenotípusát (Wang és *mtsai.* 2009). A Cdc26^N-Apc6 struktúra feltehetően evolúción átívelő fennmaradásában nagy szerepet játszott a két alegység kapcsolódásában résztvevő aminosavak konzerváltsága. A két fehérje között ezeknek az aminosavaknak köszönhetően hidrofób és elektrosztatikus kölcsönhatások alakultak ki, amelyek a szerkezetet stabilizálják. Például a Leu2-t teljesen körülveszi az APC6 Tyr242, Cys307, Ile338, Ala339, His342 és Leu369, ezáltal egy gyűrűt alakítva ki a Cdc26 körül. Ennek következtében Cdc26 első négy aminosava beágyazódik az Apc6 első négy TPR motívumába. A Cdc26 szekvenciában 5-12-es pozíciókban helyet foglaló aminosavak az 5-8 TPR motívumokkal lépnek kölcsönhatásba, melyben a Thr7 és a Leu9 játszik kulcsszerepet (Barford 2011; Wang és *mtsai.* 2009). A Thr7 foszforilációja lényegesen befolyásolja Cdc26 és Apc6 közötti kötődés affinitását, így hatással van az APC/C szerkezeti stabilitására. A foszforilációt a LATS1 és 2 (Large Tumor Supressor Kinase) kinázok végzik, ezáltal szerepet játszva az APC/C aktivitásának szabályozásában (Masuda és *mtsai.* 2015).

2. CÉLKITŰZÉSEK

Az ubikvitin formák, azaz a monoubikvitin és konjugált ubikvitin között fennálló dinamikus egyensúlyi állapot lényeges szerepet játszik a sejt normális fiziológiai állapotának fenntartásában. Az ubikvitin-egyensúly megőrzésében az ubikvitinációnak és dezubikvitinációnak, illetve az ubikvitinszintézisnek és lebomlásnak van szerepe. Számos gén vesz részt az ubikvitin-egyensúly fenntartásában, szerepük felderítéséhez pedig funkcióvesztéses mutánsaikban szeretnénk volna vizsgálni az sejt ubikvitinkészletében bekövetkezett változásokat. Ehhez olyan módszerre volt szükségünk, amellyel egyszerűen és megbízhatóan monitorozhatjuk az ubikvitin formák mennyiségi változásait. Az 1980-as évek óta több olyan technikát is kidolgoztak, mely lehetővé tette a szabad és konjugált ubikvitin mérését. A RIA és ELISA módszerek egyszerű megoldást jelentettek, viszont a használt ellenanyagok nem elég specifikusak az egyes ubikvitin formákra. Ennél sokkal pontosabb és részletesebb elemzést lehet végezni tömegspektrometrián alapuló módszerekkel, mint az Ub-PSAQ, azonban ezek speciális felszerelést és előkészítést igényelnek, így rutinszerűleg nem alkalmazhatóak.

Munkám kezdetekor Oh és munkatársai kidolgoztak egy Western-blot alapú módszert, melynek segítségével megmérték különböző egér szövetek mono- és teljes ubikvitin koncentrációját. Az ubikvitin dinamikus egyensúlyának monitorozását és az ubikvitin rendszert érintő változások detektálását a módszer *Drosophilára* való adaptálásával szeretnénk volna megvalósítani. Csoportunk már régóta dolgozott az ubikvitin-proteaszóma rendszer genetikai boncolásán *Drosophilában*, az ubikvitin formák mérésével pedig ennek szerepét az ubikvitin-egyensúly fenntartásában is vizsgálhattuk volna. Az ubikvitin-proteaszóma rendszer fontos szerepet tölt be az ubikvitin körforgásában, ugyanis a lebontásra kerülő fehérjékről a 26S proteaszóma DUB aktivitással rendelkező Rpn11 alegysége lehasítja a poliubikvitin láncot, melyet az Usp5 monomerekké hasít, így ezek újra visszakerülnek a monoubikvitinkészletbe. Bizonyos körülmények között a szabad ubikvitinkészlet fenntartásában az Usp14 DUB is lényeges szerepet játszik, amely a láncvégi ubikvitineket hasítja le a proteaszóma szubsztrátokról (Lee és mtsai. 2011b; Wang és mtsai. 2014b). Az új mérési módszer alkalmazásával szeretnénk volna számszerűsíteni, hogy az ubikvitin-proteaszóma rendszert szabályozó gének funkcióvesztése hogyan hat az ubikvitin-egyensúlyra.

Az ubikvitin-proteaszóma rendszerben kulcsszerepet játszanak az E3 enzimek, melyek a fehérjék ubikvitinációjának elősegítése mellett annak szubsztrátspecifitását is meghatározzák. Az egyik legnagyobb és legösszetettebb E3 enzim az APC/C, mely számos

sejtciklus szabályozó fehérjét jelöl ki degradációra. *Drosophilában* az APC/C alegységei közül csoportunk többet is azonosított és jellemzett, ezáltal közelebb került annak a kérdésnek a megválaszolásához, hogy miért van szüksége a sejtnek egy ennyire összetett és bonyolult szabályozású E3 enzimre. Ennek a feladatnak még nem értünk a végére, ugyanis hátra volt még az egyik legkisebb, de esszenciális alegység, a Cdc26 jellemzése. Csoportunk szekvencia homológia alapján két lehetséges Cdc26 fehérjét azonosított *Drosophilában*. Az volt a célunk, hogy felderítsük a *Drosophila melanogasteren* kívül más fajok is rendelkeznek-e két Cdc26 homológgal, illetve, hogy mi a két fehérje szerepe.

Dolgozatom célja az ubikvitin-proteaszóma rendszer szabályozásának több aspektusból történő vizsgálata volt, amely magába foglalja az egyes gének ubikvitin-egyensúlyra való hatását illetve az egyik legösszetettebb E3 enzim, az APC/C alegységének jellemzését. Ezen célokat a következő lépéseken keresztül szeretnénk volna megvalósítani:

1. Az ubikvitin mérési módszer optimalizálása és alkalmazása az ubikvitin formák dinamikus változásainak vizsgálatára az *ecetmuslica* egyedfejlődési stádiumaiban és egyes szöveteiben.
2. Az ubikvitin-proteaszóma rendszer egyes lépéseit elrontó *p54/Rpn10*, *Usp5* és *Usp14* génmutációk hatásának vizsgálata az ubikvitin-egyensúlyra, a teljes, illetve a szabad és kötött ubikvitinkoncentrációban bekövetkezett változások monitorozásával.
3. A Cdc26 és Cdc26-like paralógok filogenetikai analízise, illetve a két fehérje kapcsolatának vizsgálata APC/C-vel *Drosophilában*.
4. A Cdc26 és Cdc26-like kifejeződési mintázatának vizsgálata RT-PCR-rel és Western blottal az *ecetmuslica* egyedfejlődési stádiumaiban és releváns szövetekben.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1.2. Felhasznált *Drosophila* törzsek

A *Drosophila* az egyik legkedveltebb modellszervezet, amit az olcsó fenntartásának, könnyű kezelhetőségének illetve a több mint száz éves hagyományának köszönhet. Előnyei közé tartozik továbbá, hogy generációs ideje 25 °C-on csupán tíz nap, kevés számú (4 pár), ismert szekvenciájú kromoszómával rendelkezik illetve hatalmas genetikai eszköztár áll a kutatók rendelkezésére az ecetmuslicával kapcsolatos munkákhoz. A kísérletekhez használt *Drosophila* törzseket standard, kukoricaliszt alapú táptalajon, 25 °C-on tartottuk és a keresztezéseket is ilyen körülmények között végeztük. A keresztezésekben használt genetikai markerek leírása megtalálható a FlyBase (<https://flybase.org/>) adatbázisban. A kísérletekhez izogenzált *OregonR* illetve DSK001 vad típusú törzseket használtunk. A kísérletekhez használt RNS interferenciás (RNAi) vonalak: *Usp5^{RNSi}* (Bloomington *Drosophila* Törzsközpont, azonosító: 31886), *p54/Rpn10^{RNSi}* (Szabó és mtsai. 2018) és *CG17343^{KK111250}* (VDRC-Vienna *Drosophila* Resource Center). A dsRNS-ek átíródását a konstrukcióról az UAS-GAL4 rendszerrel (Duffy 2002) indukáltuk. A transzgenikus RNSi konstrukció expresszióját az átírandó DNS szakasz elé beépített UAS (Upstream Activating Sequence) régió teszi lehetővé, ami a GAL4 transzkripciós aktivátornak szolgál kötőhelyül. A GAL4-et kódoló gén pedig számos szövet vagy fejlődésiállapot specifikus génszabályozó régiójával kombinálva határozza meg a génkifejeződés helyét és idejét. Az *Usp14⁴³²* null mutánst Dr. Kovács Levente állította elő CRISPR/Cas9 technikával. Az *Ubi-p63E^{EY07341}* és *CG17343^{EY19920}* P-elem inszerciós mutánsok Bloomington *Drosophila* Törzsközpontból származnak. A *CG3457^{15/1}* deléciós mutánst P-elem remobilizációval hoztuk létre a *CG3457^{d00103}* allélból.

3.2. Ubikvitin mérés

3.2.1. Mintagyűjtés

Az ubikvitin formák mennyiségi meghatározásához fehérjeextraktumokat készítettünk az egyes egyedfejlődési stádiumokra szinkronizált mintákból. A szinkronizált (azonos fejlődési stádiumban levő) minták gyűjtését elősegíti, hogy standard hőmérsékleten, az ecetmuslicák egyedfejlődésének üteme nagyjából egységes, az elcsúszásokat pedig az egyes stádiumok morfológiai ismertetőjegyei alapján korrigálni lehet. Méréseinkhez az összes egyedfejlődési stádiumból és több lárva és felnőtt szövetből gyűjtöttünk mintákat. A fejlődési stádiumok szinkronizálásához fiatal (1-5) napos muslicákat raktunk petéztető csövekbe, majd egy napi élesztős táplálást követően három óránként cseréltük a petéztető cső alatt a táptalajt tartalmazó

Petri csészét. A minták szinkronizálását L2 lárva állapotig a petéztetéstől eltelt idő alapján állítottuk be. Az embrió stádiumból három különböző időpontban vettünk mintát, 1-3 órás, 3-6 órás és 6-9 órás embriókat gyűjtöttünk. Az L1 lárvákat a petéztetéstől számolva egy nap után, míg az L2 lárvákat két nap után gyűjtöttük le. L3 lárva állapottól a mintagyűjtés időzítésén kívül az állatok morfológiai jegyeit is figyelembe vettük a gyűjtésnél. A korai L3 stádiumot az L2-től a spirákulumok differenciálódása alapján különböztettük meg. A késői, vagy vándorló L3 stádiumban a lárváknak egyszerű a gyűjtése, ugyanis a táplálkozást abbahagyva elhagyják a táptalajt és száraz helyet keresnek a fiola falán, ahol később bebábozódnak. A bábállapotokat a színük és a báb belsejében történt morfológiai változások alapján különítettük el (Paul és Bownes 1981). Az előbáb (P1) állapotot a fehér színe alapján különböztettük meg a barna báboktól. A báb fázis négy napot ölel fel 15 bábállapoton keresztül (P1-P15), amelyek közül egy viszonylag korai (P4-es) és egy vedlés előtti, ún. farát adult (P15-ös) állapotból gyűjtöttünk mintát. Az kifejlett állatok közül két időpontban gyűjtöttünk mintát, a kikelést követő 12 órán belül illetve három nap múlva, külön hímeket és nőstényeket. A mintákat a felhasználásig -80 °C-on tároltuk. A fent leírt módon szinkronizált állatokból szöveteket is boncoltunk: L3-as stádiumú lárvából agyat, nyálmirigyet és zsírszövetet, míg a kifejlett állatokból tesztiszt és ováriumot boncoltunk, illetve elválasztottuk a fejet és a testet. A boncolásokat PBS-ben (Phosphate-Buffered Saline, 10 mM foszfát puffer, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl) végeztük, majd a mintákat azonnal folyékony nitrogénbe raktuk és a felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

3.2.2. Fehérje extraktumok készítése

Minden fejlődési stádiumból és szövetből gyűjtött mintát kétféle homogenizáló pufferben tártuk fel. A minták felét 100 µl BI pufferben [100 mM Tris, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 10 mM N-Ethylmaleimide (NEM, Sigma-Aldrich), 20 µM MG132 (Calbiochem) és 1×EDTA-mentes Complete Proteináz Inhibítor Koktél (PIK, Roche)] tártuk fel, melyben az NEM cisztein proteáz inhibitor gátolja a DUB-ok nagy részének működését, míg az EDTA a metalloproteáz funkciójú DUB-okat gátolja. A minták másik felét BII pufferben (BI kiegészítve 2 mM DTT-vel, NEM nélkül) homogenizáltuk, melyben a DUB-ok megőrzik az aktivitásukat. A homogenizált mintákat 4 °C-on centrifugáltuk (21000 g), a felülúszót pedig új csőbe pipettáztuk, majd a BI pufferben feltárt mintákat koncentrációmérést követően 4x Laemmli minta pufferrel (40% glicerin, 240 mM Tris-HCl pH=6,8, 8% SDS, 0.04% brómfenolkék, 5 % 2-merkaptóetanol) egészítettük ki és felforraltuk. A BII pufferben homogenizált mintákat három órán keresztül 25 °C-on inkubáltuk, majd megmértük a minták

teljes fehérje tartalmát és szintén 4xLaemmli pufferrel kiegészítve felforraltuk. A minták fehérje koncentrációját Qubit Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével határoztuk meg a gyártó protokollja alapján. Kivételt jelentenek az Usp14^{Δ32} mutánsokból származó tisztított minták, ezek esetén Bradford festést (Bradford 1976) követő spektrofotometriát alkalmaztunk.

3.2.3. Western Blot

A BI és BII pufferben feltárt teljes fehérje extraktumot ubikvitin standardokkal (3, 2, 1 és 0,5 pikomol, Sigma) együtt 14%-os poliakrilamid gélen, Tris-Glicin SDS-PAGE-el (Poliakrilamid gélelektroforézis), méret szerint elválasztottuk. A teljes fehérje extraktumot előzetes Western blot kísérletek alapján minden egyes minta esetén 1xLaemmli pufferrel hígítottuk ki úgy, hogy a monoubikvitin sáv intenzitása az ubikvitin standardok intenzitása által meghatározott intervallumon belül maradjon. Az így beállított koncentrációk így 1-10 µg fehérje/10 µl között mozogtak.

A fehérjék méret szerinti elválasztását BioRad készüléken végeztük Tris-Glicin futtató pufferben (25 mM Tris, 192 mM Glicin), majd standard Western blot transzferrel a fehérjéket PVDF membránra (Merck Immobilon-P) blottoltuk át. A transzferhez 300 mA áramerősséget alkalmaztunk 3 órán keresztül standard Western Blot transzfer pufferben (20 mM Tris pH 8,0, 150 mM Glicin és 20 % Metanol).

A membránokat 5%-os tejporos oldatban blokkoltuk, majd elsődleges ellenanyagként ubikvitin elleni ellenanyagot használtunk (DAKO, Sigma, 1:3000). Az elsődleges ellenanyagot 1%-os TBST+B-ben oldottuk (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20, 1% BSA), amely oldatban a membránt 1 órát inkubáltuk. A membránt ezután 3x10 percet mostuk 1xTBST-vel. A DAKO által gyártott α-ubikvitin ellenanyagot nyúlban termeltették, ezért ebben az esetben α-nyúl (DAKO) tormaperoxidázzal (horseradish peroxidase-HRP) fuzionált ellenanyagot használtunk másodlagos ellenanyagként, míg a Sigma gyártmányú elsődleges ellenanyaggal való immunoblottot követően egér elleni másodlagos ellenanyagra volt szükség. A membránokhoz ezután Immobilon Western kemilumineszcens HRP szubsztrátot (Merck) adtunk, majd a HRP-vel katalizált kemilumineszcens reakció során kibocsájtott fényt sötétkamrában röntgenfilmen (Fujifilm) detektáltuk. A jel megjelenítéséhez a filmen Tentax X-ray hívó és fixáló oldatokat használtunk. Az előhívott röntgenfilmeket BioDoc-It képalkotó rendszerrel digitalizáltuk, úgy, hogy a képalkotó rendszer UV lámpái által kibocsájtott fényt egy adapterrel fehér fényre konvertáltuk.

3.2.4. Adatelemzés és statisztika

Az adatok elemzésének első lépéseként a digitalizált képeken ImageJ szoftverrel (NIH, Bethesda, Maryland) megmértük a monoubikvitinnek megfelelő sávok és az ubikvitin standardok denzitását. Az ubikvitin standardok alapján minden egyes immunoblott esetén felrajzoltunk egy kalibrációs görbét MS Excel XLSTAT programban. A kalibrációs görbék létrehozásához négyparaméteres logisztikai regressziót használtunk, ami megfelel a biológiai minták szigmoidális eloszlásának modellezéséhez. A modellt leíró egyenletet alkalmazva, a mért denzitások alapján, kiszámítottuk a minták ubikvitin koncentrációját 1 μ g teljes fehérjére normalizálva.

A különböző fejlődési állapotok és szövetek ubikvitin mennyiségének összehasonlítását egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA) követő Student-Newman-Keuls (SNK) többszörös összehasonlító teszttel végeztük el, illetve kétmintás t-próbát használtunk. A minták összehasonlításához használt tesztek R statisztikai szoftverben írtuk meg.

3.3. Cdc26 és Cdc26-like fehérjék filogenetikai analízise a *Drosophilidae* családban

A filogenetikai analízishez az aminosav szekvenciákat az NCBI (National Center for Biotechnology Information) adatbázisból kerestük ki a Cdc26 és Cdc26-like konzervált N-terminális szekvenciája alapján BLAST kereséssel. A szekvenciák összerendezését MUSCLE (*Multiple Sequence Comparasion by Log-Expectation*) és Clustal Omega módszerrel végeztük el, a filogenetikai fát pedig MEGA7 programmal generáltuk, Neighbor-Joining módszerrel, 1000 Bootstrap ismétléssel.

3.4. Transzgenikus *Drosophila* törzsek létrehozása

A Cdc26 és Cdc26-like funkcionális vizsgálatához olyan DNS konstrukciókat hoztunk létre, amelyek a humán Cdc26 (HsCdc26) fehérje és a haemagglutinin (HA) epitóppal jelölt *Drosophila* Cdc26-like fehérje túltermelésére voltak alkalmasak. Ezen kívül olyan DNS konstrukciókat is létrehoztunk, amelyek a saját promóterük szabályozása alatt álló, GFP-vel fuzionált Cdc26-ot és Cdc26-like-ot kódoltak. A *HsCdc26* gént PCR-el amplifikáltuk humán eredetű cDNS templátról DreamTaq DNS polimerázzal (Thermo Fisher Scientific), standard körülmények között (2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,2 mM primer). A PCR-hez a *HsCdc26*-

ra specifikus 5'-GCGAATTCAGTA TGCTGAGACGGAA-3' és a 5'-CGCTCGAGCATGCAAGATAATC CATC-3' primerpárt használtuk (az EcoRI és XhoI restriktációs helyek kiemelve). A PCR fragmentet pTZ57R/T klónozó vektorba (Thermo Fisher Scientific) ligáltuk, majd EcoRI és XhoI restriktációs endonukleázokkal végzett hasítást követően az izolált *HsCdc26* gént pENTR1A vektorba ligáltuk az EcoRI/XhoI restriktációs helyekre. A pENTR vektorok a *Drosophila* Gateway rendszer (<http://www.ciwemb.edu/labs/murphy/Gateway%20vectors.html>) részei, melynek előnye, hogy a kiindulási klónból (Entry-clone) a vizsgálni kívánt gén in vitro rekombináció segítségével számos expressziós vektorba beépíthető. A *HsCdc26* szekvenciát in vitro rekombinációval az attB helyet tartalmazó pTW vektorba építettük be, majd szekvenálással ellenőriztük.

A *Cdc26-like* gén régióját 5'-GTTTTCCCCCATCATTACC-3' forward és az XhoI restriktációs hasító helyet hordozó 5'-ATCTCGAGACTCCTCCCCTA-3' reverz primerrel amplifikáltuk PCR-el, DreamTaq DNS polimerázzal (Thermo Fisher Scientific). A PCR terméket EcoRI/XhoI restriktációs enzimekkel hasítottuk (az EcoRI hasítóhely néhány bázispárral a START előtt található a gén régiójában), majd a szintén EcoRI/XhoI enzimekkel hasított pENTR3C vektorba ligáltuk. Ezt követően a gént pTWH vektorba rekombináltuk, ami a kódolt fehérje C-terminális végének HA epitóppal való fúzióját eredményezte. A konstrukciót szekvenálással ellenőriztük.

A tisztított plazmidokat ezután olyan *Drosophila* embriókba injektáltuk, melyek ismert lokalizációjú attP (phage attachment site) helyet tartalmaztak, ahova ΦC31 integráz irányításával, rekombinációval beépül az attB helyet hordozó plazmid (Bateman és mtsai. 2006). A pTW és pTWH konstrukciók egy UAS régiót is tartalmaznak, amely a GAL4 transzkripciós faktor kötőhelyéül szolgál. Az UAS-GAL4 rendszert alkalmazva irányíthatjuk a transzgén kifejeződését, ami így lehet konstitutív, vagy akár szövet illetve fejlődési stádium specifikus (Duffy 2002).

A saját promóter által szabályozott *Cdc26* és *Cdc26-like* fehérjéket kódoló konstrukciók létrehozásához először genomi DNS-t izoláltunk *Drosophilából* LiCl/K-acetátos kicsapásos módszerrel (E. J. Rhem, BDGP- Berkley *Drosophila* Genom Project protokoll). A genomi DNS-ről Phusion high fidelity polimerázt használva (Phu, Thermo Scientific), PCR-el felszaporítottuk a *Cdc26* gént és az azt megelőző 1500 bázispárnyi régiót. A *Cdc26-like* esetén hasonló módon jártunk el, itt a génnel együtt az azt megelőző 1000 bázispár hosszú szekvenciát is amplifikáltuk. A primereket úgy terveztük, hogy az amplifikált fragment ne hordozza a STOP kodont, mivel a kódolt fehérjék C-terminális végét terveztük GFP-vel

fúzionálni. Ezen kívül a primerek 5' végét HindIII (pirossal jelölt szekvencia) hasítóhellyel meghosszabbítottuk, hogy elősegítsük a PCR fragment további klónozását.

Felhasznált primerek:

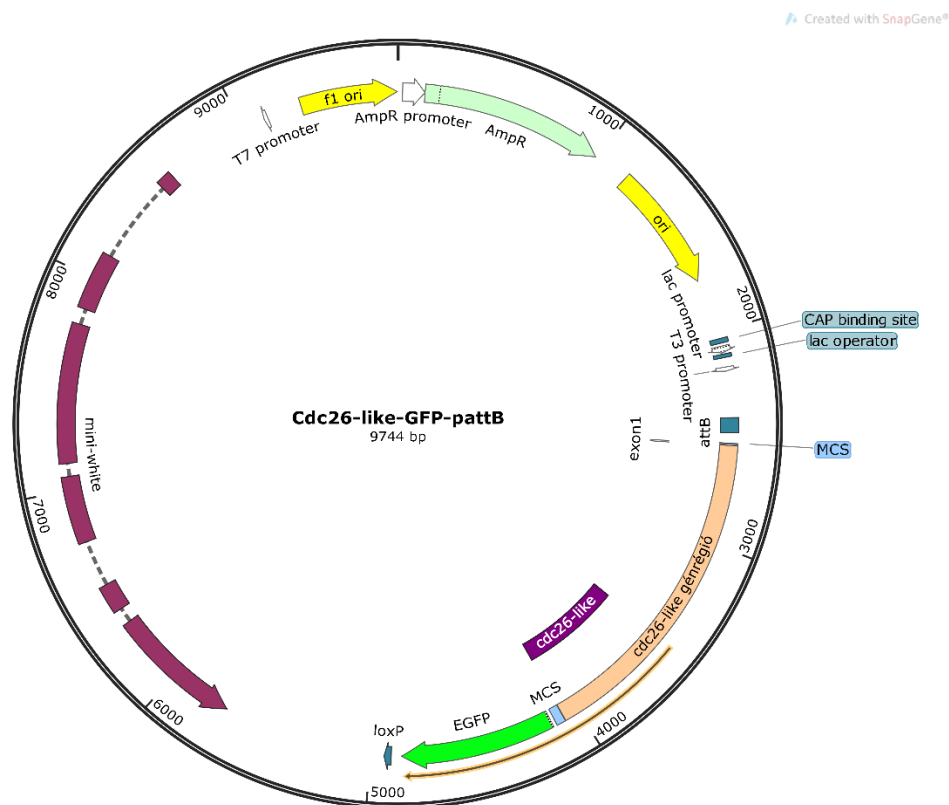
Cdc26-regio fw: 5'-CGTAAGCTTCAGCGCTCCAAGTAAATCCT-3'

Cdc26-regio rev: 5'-TATAAAGCTTAAGGTGGAGGATGTGCTGGGCT-3'

Cdc26-like-regio fw: 5'-CATGAAAGCTTTTTGGTAAGCAGCAACACCAG-3'

Cdc26-like-regio rev: 5'-GGTAAGCTTGACACTCCTCCCCTAGCCCCA-3'

Mivel nem rendelkezünk olyan megfelelő vektorral, mely *GFP* szekvenciát tartalmazott volna, pEGFP-N2 vektorból XhoI/NotI endonukleázokkal való restrikciós emésztéssel izoláltuk a GFP-t kódoló szekvenciát, majd ugyanezekkel az enzimekkel hasított pattB vektorba ligáltuk. A létrehozott plazmidba, HindIII helyre inszertáltuk a *Cdc26* és *Cdc26-like* szekvenciákat úgy, hogy a *GFP*-vel megegyező leolvasási keretbe kerültek (6. ábra). A konstrukciókat szekvenálással ellenőriztük és *Drosophila* embriókba injektáltuk, ahol helyspecifikusan integrálódtak a genomba.



6. ábra. A *Cdc26-like* promóter régióját, a *Cdc26-like* gént és *GFP*-t hordozó DNS plazmid térképe. A *Cdc26-GFP*-t kódoló DNS konstrukció is hasonló térképpel rendelkezik.

3.5. Komplementációs kísérlet

Kísérleteinkhez a *Cdc26* P-elem inszerciós mutáns allélját használtuk. A *CG17343^{EY19920}* allél homozigótaként az ecetmuslicák pusztulását eredményezi legkésőbb farát adult állapotban. A második kromoszómán elhelyezkedő mutáns allélt *CyO,GFP* kromoszómával balanszíroztuk és a *HsCdc26-pTW-t* hordozó törzssel, illetve *daughterless-GAL4* (da-GAL4) driver törzssel kereszteztük. Az utódok közül kiválasztottuk és a komplementációs kísérlethez kereszteztük a *w;CG17343^{EY19920}/CyO,GFP;pTW-HsCdc26* és a *w;CG17343^{EY19920}/CyO,GFP;da-Gal4* genotípusú ecetmuslicákat. A *daGAL4* driver a *HsCdc26* gén kifejeződését a *Drosophila* egyedfejlődése során minden szövetben indukálta.

3.6. Koimmunprecipitációs kísérletek

A *Cdc26*-like fehérje APC/C-vel való kapcsolatát koimmunprecipitációval vizsgáltuk. A kísérletekhez keresztezéssel olyan ecetmuslicákat hoztunk létre, amelyek genotípusa *mákos/Cdc27-pTFW/+;Cdc26-like-pTWH/da-GAL4*, így egyaránt túltermeli a FLAG epitóppal jelölt *mákos/Cdc27* fehérjét és a HA-jelölt *Cdc26*-like fehérjét. Pozitív kontrollként *mákos/Cdc27-pTFW/+;Apc10-pTHW/da-GAL4* genotípusú ecetmuslicákat használtuk, negatív kontrollként pedig vad típusú (*DSK001*) ecetmuslicákat. A fehérje izoláláshoz 500 µl térfogatnyi legyet gyűjtöttünk, melyet 600 µl feltáró pufferben (20mM TrisHCl pH 7,6, 100 mM NaCl, 5mM MgCl₂, 1mM DTT, 1xPIK, 5% glicerin) homogenizáltunk. A homogenizátumból szöveti törmelékét centrifugálással (4 °C, 20 perc) ülepítettük, majd a szolubilis fehérjéket tartalmazó felülúszót steril üvegyapoton átszűrtük és α-FLAG M2 mágneses gyöngyökkel (40 µl, Sigma-Aldrich) 1 óra 20 percet inkubáltuk. Az inkubáció után a felülúszót eltávolítottuk, majd a gyöngyöket a feltáró pufferrel háromszor átmostuk. Ezután a fehérjéket 1xLaemmlli mintapufferben és 5 perc forralással eluáltuk a gyöngyökről, majd a gyöngyöket mágnes segítségével választottuk el a fehérjéket tartalmazó puffertől. Az immunprecipitált fehérjéket, illetve a gyöngyökről rögtön az inkubáció után eltávolított felülúszót 8%-os SDS-PAGE-en méret szerint elválasztottuk. Az SDS-PAGE-hez Tris-Glicin futtató puffert (25 mM Tris, 192 mM Glicin) használtunk, majd standard Western blot transzferrel a fehérjéket PVDF membránra (Merck Immobilon-P) blottoltuk át. A transzferhez 260 mA áramerősséget alkalmaztunk 3 órán keresztül standard Western Blot transzfer pufferben (20 mM Tris pH 8.0, 150 mM Glicin és 20 % Metanol). Annak érdekében,

hogy a Mákos/Cdc27-FLAG interakciós partnerei közül kimutassuk a Cdc26-like-HA és Apc10-HA fehérjék jelenlétét, nyúl α -HA monoklonáris ellenanyagot használtunk (Abcam) 1:10.000 hígításban. Másodlagos ellenanyagként kecskében termeltetett, nyúl elleni ellenanyagot (DAKO) használtunk.

A kísérlet megerősítése érdekében, a fentebb leírtakhoz hasonlóan újabb koimmunprecipitációs kísérletet végeztünk, ezúttal viszont a homogenizátumot α -HA agaróz gyöngygel (Pierce) inkubáltuk. Az interakciós partnert pedig α -FLAG M2 ellenanyaggal mutattuk ki, 1:10000 hígításban. Másodlagos ellenanyagként mindkét esetben kecskében termeltetett, peroxidáz-konjugált egér elleni ellenanyagot (DAKO) használtunk.

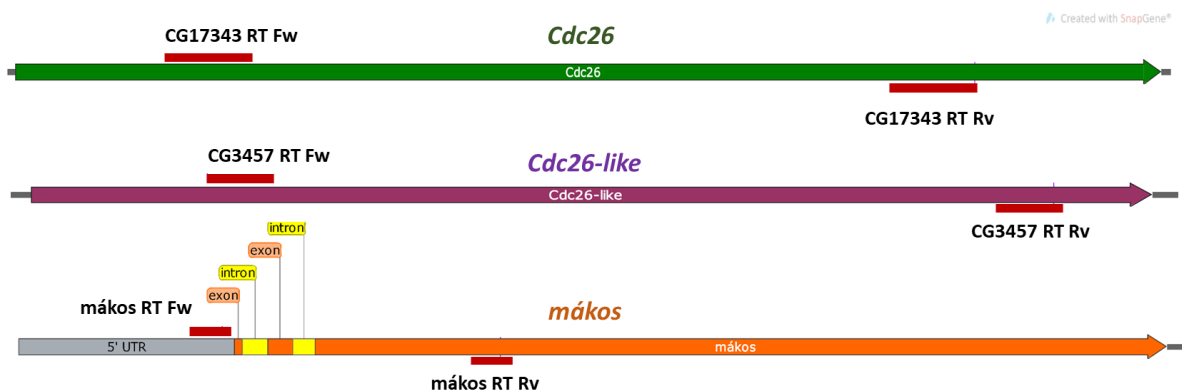
3.7. Reverz transzkripció kapcsolt PCR (RT-PCR)

Az egyedfejlődés során és a különböző szövetekben a *Cdc26* és *Cdc26-like* gének kifejeződésének mértékét mRNS-ről átírt cDNS-en végzett PCR-el, DreamTaq polimerázzal (Thermo Fisher Scientific) vizsgáltuk. A PCR-t telítési ciklusszám alatt (25 ciklus) végeztük, így a PCR termék mennyisége arányosan leképezi a génről átíródó mRNS relatív mennyiségét. A génexpresszió vizsgálatához 0-5 és 15-20 órás embriókból, L1, L2, korai és késői L3 lárvastádiumból, P5 és P15 báb stádiumból, illetve hím és nőstény adultakból gyűjtöttünk mintát. Ezenkívül L3 lárvából agyat, illetve felnőtt állatokból ováriumot és tesztiszt is boncoltunk. A mintákból RNS-t izoláltunk Tri Reagens extrakcióval (Invitrogen), majd a mintákat RNázmentes DNáz I-el (Fermentas) kezeltük. A minták minőségét agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztük, ugyanis ha az RNS nem degradálódott, 0.8%-os gélen elválasztva 2 kb-nál egy éles sáv látszik, ami a 18S riboszómális RNS-nek felel meg. Az RNS-ből meghatározott mennyiséget használtunk templátként (1-5 μ g), melyről RevertAid reverz transzkriptázzal (Thermo Scientific) írtuk át a cDNS-t random hexamer primerek közreműködésével. A cDNS-t templátként használva, Dream Taq polimerázzal (Thermo Scientific) standard körülmények között (2 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dNTP, 0,2 mM primer) elvégeztük a polimeráz láncreakciót 25 ciklussal. A PCR reakcióba bemért templát mennyiségét rpL17 primerrel kapott termék mennyisége alapján állítottuk be. A *Drosophila* *L17* gén egy riboszómális fehérjét kódol, melynek expressziója egységes a különböző szövetekben és fejlődési állapotokban, ezért jól használható bemérési kontrollként. A templát mennyiségének beállítását követően *Cdc26*, *Cdc26-like* és *mákos/Cdc27* génekre specifikus primereket adtunk a PCR reakciókhoz. Az eredményeket agaróz gélelektroforézissel

detektáltuk. A *mákos*-ra specifikus primerekkel végzett RT-PCR igazolta, hogy a DNáz kezelést követően a mintában nem maradt genomi DNS. A *mákos* forward és reverz primerek ugyanis két intront vesznek közre, így az RT-PCR-el méretük szerint elkülöníthetőek a cDNS-ről és a genomikus DNS-ről amplifikálódott termékek (7. ábra).

Az RT-PCR-hez használt primerek szekvenciája:

rpL17 forward:	5'-GTGATGAACTGTGCCGACAA-3'
rpL17 reverz:	5'-CCTTCATTTGCCCCT TGTTG-3'
CG17343 RT forward:	5'-GCCGCGAACTGCAGACCATC-3'
CG17343 RT reverz:	5'-GTCGGCGTCATCGTCCAGGTT-3'
CG3457 RT forward:	5'-CCCCGCGACCTAGGCTTTCTCA-3'
CG3457 RT reverz:	5'-CTGCTCCTCCGGCTG GGTATCAAC-3'
DP1 (mákos) RT forward:	5'-AGAGCGCCCCTAGAAAGTCG-3'
DP2 (mákos) RT reverz:	5'-ACGGGCGTGGTCAGAATGTAGTT-3'



7. ábra. Az RT-PCR-hez használt primerek (vörös sáv) elhelyezkedése. A *mákos*-ra specifikus primerek két intront vesznek közre, így az RT-PCR-el elkülöníthető a cDNS-ről és a genomikus régióról amplifikált szekvencia.

3.8. A GFP-jelölt fehérjék vizsgálata Western blottal

A GFP-vel jelölt Cdc26 és Cdc26-like fehérjék vizsgálatához *Cdc26^{EY19920}*; *Cdc26-GFP* és *Cdc26-like^{15/1}*; *Cdc26-like-GFP* transzgenikus törzsekből gyűjtöttünk mintákat, melyekben a GFP-vel jelölt Cdc26 és Cdc26-like fehérjék kifejeződését a saját promóterük szabályozza. A teljes fehérjeextraktumok izolálásához ecetmuslica embriót, vándorló L3-as stádiumú lárvából boncolt agyat és kifejlett állatokból boncolt petefészket használtunk. A mintákat feltáró pufferben (20mM TrisHCl pH 7,6, 100 mM NaCl, 5mM MgCl₂, 1mM DTT, 1xPIK, 5% glicerin) homogenizáltuk, 10%-os SDS-PAGE-en szeparáltuk, majd a mintákat átblottoltuk PVDF membránra. A GFP-vel jelölt fehérjék kimutatására GFP-elleni monoklonális

ellenanyagot használtunk (FineTest) 1:15000 hígításban, másodlagos ellenanyagként pedig kecskében termeltetett peroxidáz-konjugált egér elleni ellenanyagot (Jackson Immuno Research) alkalmaztunk.

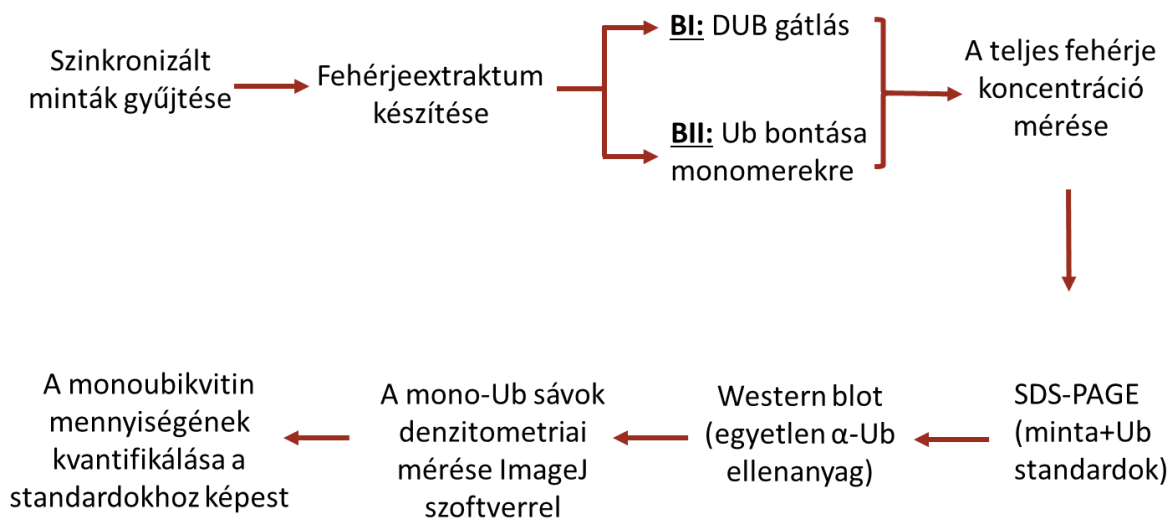
3.9. A Cdc26 foszforilációjának vizsgálata lambda foszfátáz kezeléssel

A *Cdc26^{EY19920};Cdc26-GFP* genotípusú vándorló L3 lárvákból agyat boncoltunk, majd 100 µl feltáró pufferben fehérjét izoláltunk. A fehérjeextraktumból 3x15 µl-t új centrifugacsövekbe pipettáztuk, majd az egyikhez rögtön ¼ végtérfogatnyi 4x Laemmli minta puffert adtunk és 5 percet felforraltuk. Ez szolgált az első kontrolként. A másik két részhez lambda foszfátáz puffert (NEBuffer for Protein MetalloPhosphatases, NEB) és MnCl₂-ot adtunk, majd az egyik mintához hozzámértük a lambda protein foszfátázt (NEB). A foszfátázzal kezelt mintát 30 percig 30 °C-on inkubáltuk, ugyanis ennyi időre van szüksége az enzimnek a fehérjék defoszforilációjához, míg a kezeletlen mintát jégen tartottuk (második kontrol). A mintákhoz ezután 4x Laemmli minta puffert adtunk és 5 percet forraltuk. A defoszforiláció eredményét Western blottal vizsgáltuk α-GFP ellenanyaggal (1:15000).

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az ubikvitin formák kvantifikálása *Drosophila melanogaster*ben

Az ubikvitin-egyensúly fenntartásában szerepet játszó gének vizsgálatához olyan módszert szeretnénk volna alkalmazni, amely lehetővé teszi a szabad és konjugált ubikvitin formák dinamikájának kvantifikálását. A RIA és ELISA módszerek segítségével az ubikvitin formák mennyisége aránylag egyszerűen számszerűsíthető, viszont az eredmények kevésbé pontosak. Ennek oka, hogy a különböző formákat felismerő α -ubikvitin ellenanyagok nem eléggé specifikusak, ezért kevésbé alkalmasak a szabad és konjugált ubikvitinkészlet mennyiségi meghatározására (Takada és *mtsai*. 1995, 1996). Ennél sokkal pontosabb és részletesebb elemzést lehet végezni tömegspektrometrián alapuló módszerekkel. Ilyen például az Ub-PSAQ, amelyben két affinitás reagenssel elválasztják a szabad és konjugált ubikvitint, majd a mintákat tömegspektrometriával elemzik (Kaiser és *mtsai*. 2011). A módszer előnye, hogy pontos és igen részletes. Azon kívül, hogy alkalmas a szabad és konjugát ubikvitin elkülönítésére, a különböző poliubikvitin lánc típusok mennyiségi jellemzésére is alkalmas. A módszer hátránya, hogy speciális felszerelést és előkészítést igényel, így rutinszerűleg nem alkalmazható. Kísérleteinkhez végül egy olyan módszert választottunk, amelyet eredetileg egér szövetekre dolgoztak a különböző ubikvitin formák egyszerű és megbízható mérésére (Oh és *mtsai*. 2013, 8. ábra).



8. ábra. A teljes és szabad ubikvitintartalom mennyiségi meghatározásának menete.

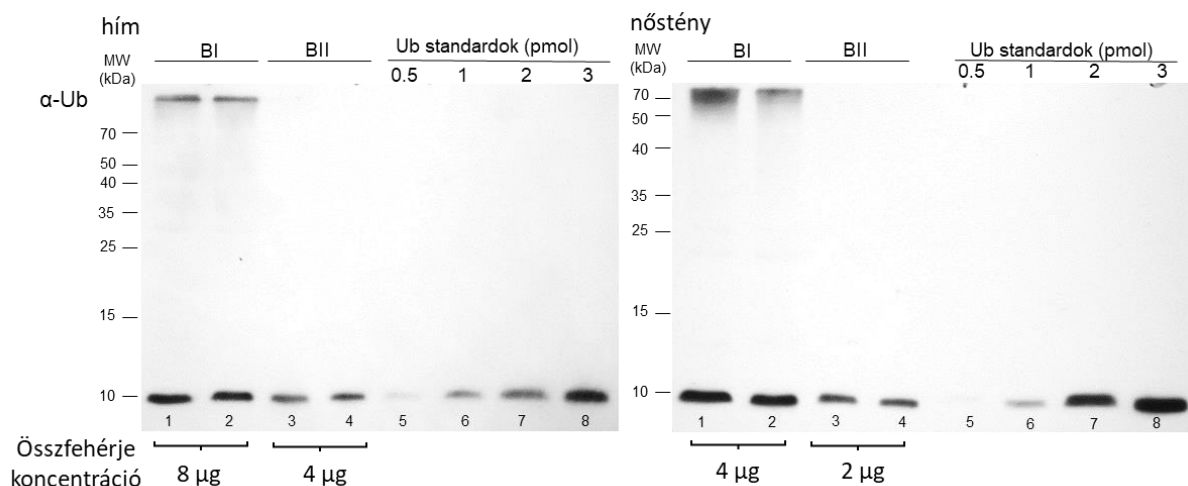
A módszer lényege, hogy a szövetek szabad és teljes ubikvitinkoncentrációja szimultán meghatározható a teljes fehérje extraktumból Western blot kísérletek denzitometriás mérésével. A mintákat két különböző homogenizáló pufferben, a DUB inhibitort tartalmazó BI-ben és az inhibitort nem tartalmazó BII-ben tártuk fel (1. táblázat). A fehérje extraktumokat SDS-PAGE-el elválasztottuk, majd az ubikvitin tartalmat Western-blottal, α -ubikvitin ellenanyaggal mutattuk ki. A BI pufferben a DUB inhibitorok gátolták a DUB-ok aktivitását, így a konjugált ubikvitin érintetlen maradt és SDS-PAGE-el elválasztható volt a szabad ubikvitintől. A BII pufferben a DUB-ok aktívak maradtak, így inkubáció során a homogenizált minták teljes ubikvitintartalmát az endogén DUB-ok monoubikvitinné konvertálták. Ennek következtében a minta teljes ubikvitintartalma monomerekként volt vizsgálható. A módszer lehetővé tette, hogy ubikvitin standardokat alkalmazva kvantitatív méréseket végezzünk, mellyel megállapítható az egyedek és a szövetek szabad és teljes ubikvitin tartalma. Ugyan a konjugált ubikvitin közvetlenül nem mérhető, viszont kiszámítható volt a monoubikvitin és a teljes ubikvitin koncentráció különbségeként. A protokollban a módszer *Drosophilára* való optimalizálás érdekében számos változtatást végeztünk, a (1. táblázat).

1. táblázat. A fehérjék optimális feltárási körülményei *Drosophila* és egér mintákra. EDTA = etilén-diamin-tetraecetsav, IAA = Iodoacetamide, NEM = N-Ethylmaleimide, PIK = Proteináz Inhibitor Kóktél, DTT = ditiotreitól, MG133 = carbobenzoxo-Leu-Leu-leucinal, proteaszóma inhibitor

Puffer	Egér		<i>Drosophila</i>	
	BI	BII	BI	BII
Tris	100 mM		100 mM	
NaCl	20 mM		150 mM	
EDTA	---		1 mM	
IAA	10 mM	---	---	
NEM	---		10 mM	---
MG132	20 μ M		20 μ M	
DTT	---	2 mM	---	2 mM
PIK	1x		1x	
pH	7.8		7.6	
Inkubációs idő	2 h		3 h	
Inkubációs hőmérséklet	37 °C		25 °C	

Az *Drosophila* fiziológiai sajátosságai miatt csökkentettük a feltáró puffer pH-ját majd jelentősen növeltük a sókoncentrációt. A BII lizátum inkubációs hőmérsékletét 37 °C-ról pedig a *Drosophila* enzimek, így a DUB-ok működéséhez optimálisabb 25 °C-ra csökkentettük. Annak érdekében, hogy megállapítsuk a megfelelő inkubációs időt, amely alatt a DUB-ok a minták teljes ubikvitintartalmát monomerekké bontják, különböző ideig inkubáltuk a BII lizátumokat, majd Western blottal vizsgáltuk a konjugált ubikvitin jelenlétét (F1. ábra). Kísérleteink alapján három óra volt a megfelelő inkubációs idő. A BI pufferben fényérzékeny IAA (Iodoacetamide) DUB inhibitorát a kevésbé kényes NEM-re (N-Ethylmaleimide) cseréltük (1. táblázat, F1. ábra). A BI pufferhez adott NEM inaktiválta a DUB-ok aktív centrumában helyet foglaló ciszteint, míg az EDTA a metalloproteázokat gátolta (Emmerich és Cohen 2015), ezáltal a konjugált ubikvitin megőrizte azt az állapotot, melyben a feltárás pillanatában volt.

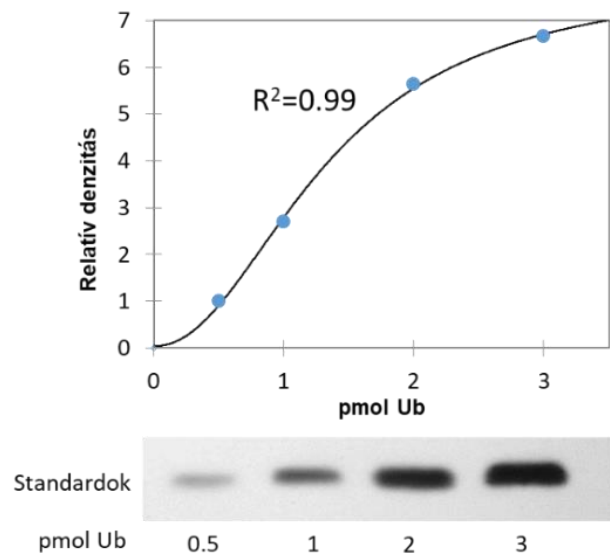
A BI pufferben feltárt mintákban az SDS-PAGE-et követő Western blottal jól elkülöníthető volt a 8,6 kDa méretű szabad monoubikvitin a nagyobb mérettartományú konjugált ubikvitintól. A BII pufferben feltárt mintákat vizsgálva pedig képet kaphatunk az egyed vagy a szövet teljes ubikvitinkoncentrációjáról, ugyanis a mintákban fellelhető endogén DUB-ok a konjugált ubikvitint teljes egészében monomerekké bontják. A teljes ubikvitin tartalom így egyetlen monoubikvitinsávban jelenik meg 8,5 kDa magasságban, így egyetlen ellenanyaggal lemérhető a mennyisége (9. ábra).



9. ábra. A BI és BII pufferben feltárt *Drosophila* minták vizsgálata Western blottal, α -ubikvitin ellenanyaggal. Az 1-2 sávban a BI-ben, a 2-3 sávban a BII-ben homogenizált minták technikai ismétlései láthatóak. Az 5-8 sávok az ubikvitin standardokat tartalmazzák. A példaként bemutatott felnőtt hím és nőstény *Drosophila* mintákat előzetes kísérleti eredmények alapján hígítottuk olyan mértékben, hogy az ubikvitin mennyisége a standardok által meghatározott skálán helyezkedjen el.

A kísérleti rendszer beállítása során szembesültünk azzal, hogy a teljes fehérje koncentrációhoz viszonyítva a különböző egyedfejlődési stádiumokból, illetve szövetekből származó minták ubikvitin mennyisége jelentősen eltér, így egyes mintáknál az ubikvitin mennyisége meghaladja a legtöményebb ubikvitin standard koncentrációját. Ezt a minták hígításával korigáltuk előkísérletek alapján, így a gélen elválasztott fehérjeextraktum ubikvitin tartalma nem haladta meg 3 pmol-os mennyiséget.

A Western blot kísérletek detektálására használt röntgenfilmeket digitalizáltuk, majd kvantifikáltuk a minták ubikvitin tartalmát, oly módon, hogy a 0,5, 1, 2 és 3 pmol mennyiségű ubikvitin standardokon ImageJ szoftverrel denzitometriás mérést végeztünk, majd az adatok alapján felrajzoltuk a kalibrációs görbét (11. ábra).

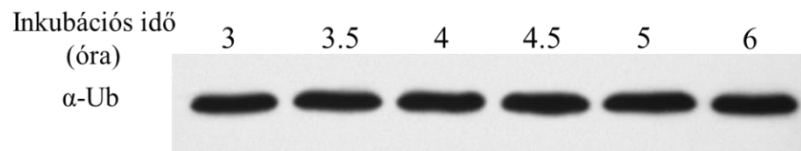


11. ábra Az ubikvitin standardokkal létrehozott kalibrációs görbe. A Western blottal detektált ubikvitin standardok denzitometriás mérésből kapott adatok alapján felrajzoltuk a kalibrációs görbét négyparaméteres logisztikai regressziót alkalmazva.

A görbe létrehozásához négyparaméteres logisztikai regressziót használtunk, mely modellt a következő képlettel lehet leírni: $y = d + (a - d) / [1 + (x/c)^b]$, ahol a a minimum érték, d a maximum érték, c a görbületi pont, míg b a Hill együttható (Vølund 1978). A képlet felhasználásával a denzitometriával mért adatokból (y) kiszámítottuk az ismeretlen (x) értékét, ami ebben az esetben a minták ubikvitin mennyiségét jelölte. Az eredményeket elosztottuk az adott minta fehérje koncentrációjával, így megkaptuk, hogy 1 μ g fehérjéből hány pmol ubikvitin van a mintában.

A teljes ubikvitinkoncentráció mérésének pontossága azon alapszik, hogy az ubikvitin monomerek az inkubációs idő során nem degradálódnak. Azt, hogy az ubikvitin mennyisége

nem csökken szignifikánsan úgy igazoltunk, hogy 3-6 óra inkubációt követően megmértük a teljes ubikvitintartalom relatív koncentrációját. Ehhez vándorló L3-as lárvákat tártunk fel BII pufferben, majd 3-tól 6 óráig 25 °C-on inkubáltuk, miközben félóránként mintát vettünk. Az inkubációt követően megmértük a minták fehérje koncentrációját, majd a minták mindegyikéből 2,5 µg-ot SDS-PAGE-en elválasztottunk, majd Western blottal, α-ubikvitin ellenanyaggal vizualizáltuk a monomereket (10. ábra).



10. ábra. Az ubikvitin mennyisége nem változik a 3-tól 6 óráig tartó inkubáció során. A vándorló L3-as stádiumú lárvából származó fehérjemintákat BII pufferben tártuk fel. A BII-ben feltárt fehérjeextraktumból 3 óra inkubációt követően fél óránként mintát vettünk. Az ubikvitin mennyiségi változását Western blottal vizsgáltuk.

Mint ahogy az a 6. ábrán látható, még 6 óra inkubáció után sem tapasztalható szignifikáns ubikvitin degradáció. A monoubikvitin sávok denzitását ImageJ szoftverrel lemértük, majd a különböző időpontban kapott értékekből kiszámítottuk az ubikvitin relatív koncentrációját úgy, hogy az összes denzitometriás értéket elosztottuk az első időpontban mért értékkel. A teszt eredményét a 2. táblázat összegezi. Adataink igazolták, hogy az ubikvitin mennyisége nem csökken a mintában található teljes fehérje mennyiségéhez képest a kísérleteinkben alkalmazott 3-6 óra inkubációs idő alatt.

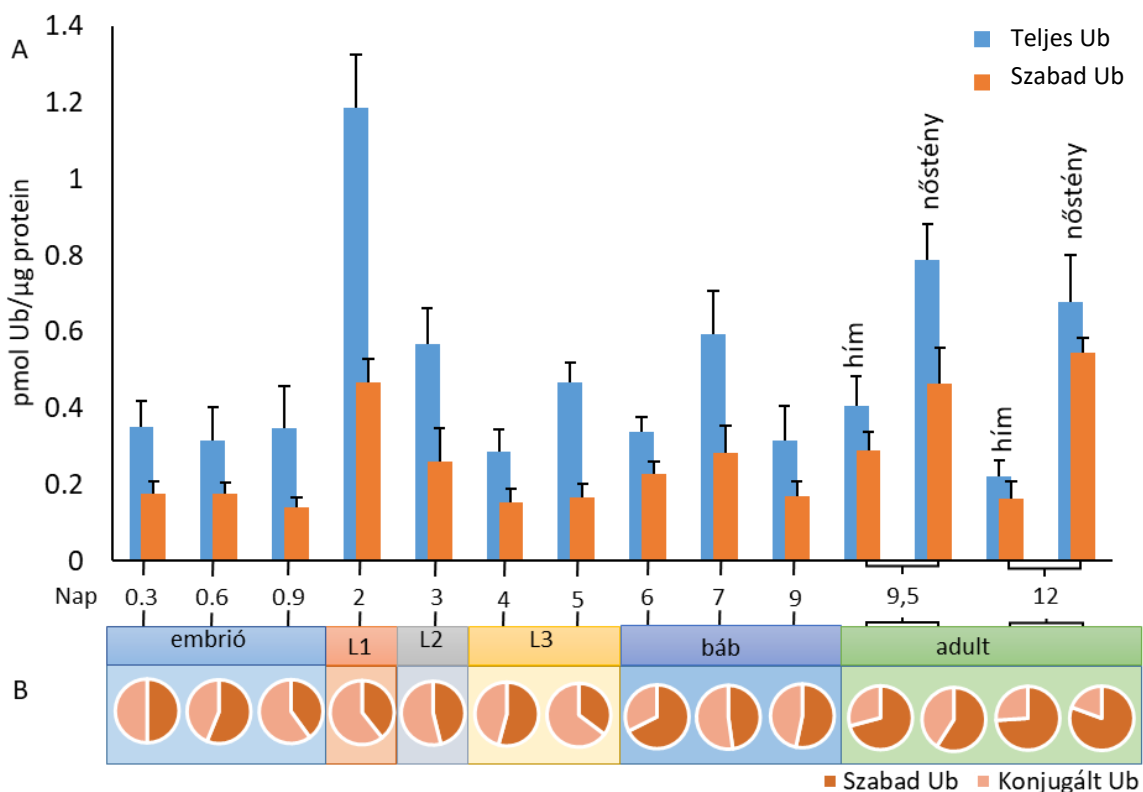
2. táblázat Az ubikvitin mennyiségének változása BII-pufferben való inkubációt követően. Az ubikvitin relatív koncentrációját az ImageJ-vel mért denzitometriás adatokból számoltuk ki az első időponthoz viszonyítva. A számításokhoz négy kísérletsorozatot végeztük, majd az eredményeket átlagoltuk.

Az ubikvitin relatív mennyisége a 3 órás inkubáció után					
Minta	3h	3.5h	4h	4.5h	5h
1	1	1.01	1.09	0.99	-
2	1	1.03	1.04	1.05	1.14
3	1	1.12	1.18	1.05	1.11
4	1	1.15	1.04	0.98	1.00
Átlag	1	1.08±0.07	1.09±0.07	1.02±0.04	1.08±0.07

A kísérleti körülmények optimalizálása *Drosophilára* lehetővé tette, hogy az ubikvitin formák dinamikáját bármely egyedfejlődési állapotban és szövetben egyszerűen és költséghatékonyan vizsgáljuk. A módszer arra is alkalmas volt, hogy az ubikvitin rendszert érintő gének mutációinak hatására az ubikvitin-egyensúlyban bekövetkezett változásokat kvantifikáljuk. Ez közelebb vitt minket ahhoz, hogy jobban megértsük, milyen szerepet játszanak ezek a gének az ubikvitin homeosztázisban.

4.2. Az ubikvitin formák dinamikus egyensúlya az egyedfejlődés során

Az *ecetmuslica* minden egyedfejlődési stádiumából mintát gyűjtöttünk (embrió, lárva, báb és felnőtt stádiumokból), hogy vizsgáljuk az ubikvitin formák dinamikáját. Eredményeink alapján ábrázoltuk a teljes és a szabad ubikvitinkoncentrációt változásait az egyedfejlődés folyamán (12A. ábra). A konjugált ubikvitin mennyiségét ugyan közvetlenül nem tudtuk lemérni, viszont megadható volt a teljes és szabad ubikvitin különbségeként (12B. ábra).



12. ábra. Az ubikvitin formák dinamikus változása az egyedfejlődés során. Az oszlopok a teljes (kék oszlop) és szabad (narancssárga oszlop) ubikvitin koncentráció mérések (n=3) átlagát és szórását ábrázolják (A). A konjugált (rózsaszín) és szabad ubikvitin arányának változását a kördiagrammok szemléltetik (B). A statisztikai egyszempontos ANOVA ($p < 0.05$) analízist követő SNK (Student–Newman–Keuls, $p < 0.05$) post hoc teszttel végeztük (F1. táblázat).

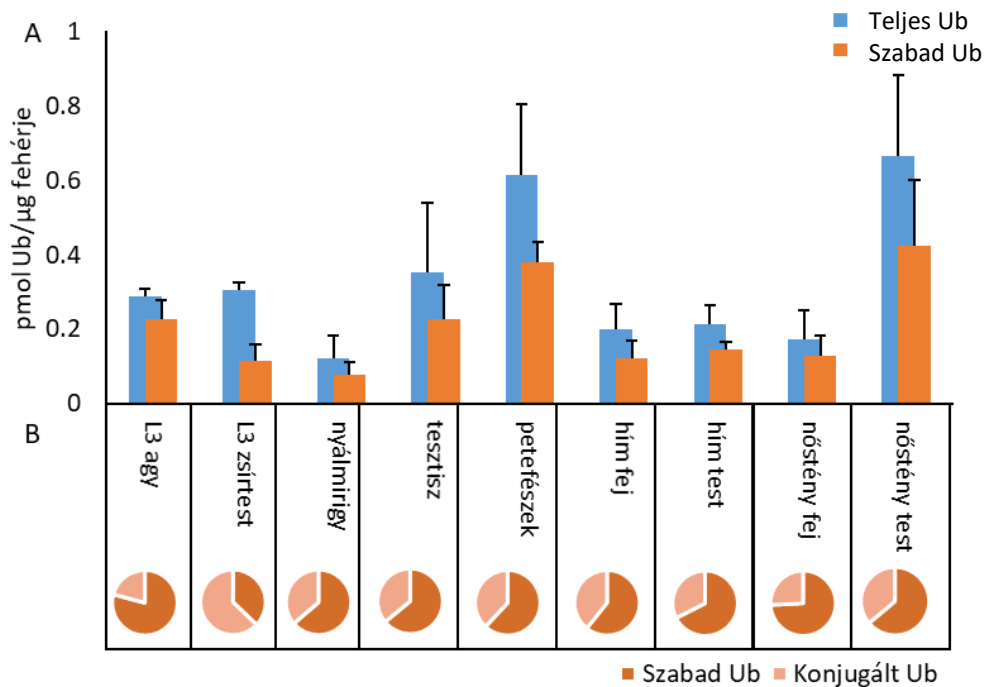
Az embrionális fejlődés során, amely egy nap alatt játszódik le, nem történt szignifikáns változás az ubikvín mennyiségében, majd L1 fázisban egy hatalmas ugrás következett be, anélkül, hogy a szabad és konjugált ubikvín aránya megváltozott volna. Az egyedfejlődés alatt az L1-ben mértük a legmagasabb teljes ubikvín koncentrációt, a szabad ubikvín koncentrációja pedig a három napos nőstényekben volt a legmagasabb. Az L1 fázist követően az ubikvín mennyisége folyamatosan csökkent a korai L3 stádiumig, majd a vándorló L3-ban enyhén megugrott az teljes ubikvín koncentráció, ezzel egyidőben pedig megfordult a szabad és konjugált ubikvín aránya a kötött ubikvín javára. A lárva-báb átmenetnél a szabad ubikvín aránya lényegesen megemelkedett, a bábállapot során pedig mind az ubikvín mennyisége, mind a pedig szabad és kötött ubikvín aránya dinamikusan változott. Kifejlett nőstényekben magas volt mind a teljes, mind a szabad ubikvín koncentrációja, míg hímekben a teljes ubikvín szintje ennél jóval alacsonyabb volt, viszont magas a szabad ubikvín aránnyal (12. ábra).

A méréseink alapján képet kaptunk a *Drosophila* egyedfejlődés ubikvínprofiljának dinamikájáról. Mind az ubikvín szint, mind az ubikvín formák aránya stádiumról-stádiumra változik, ami összhangban lehet az egyedfejlődés során végbemenő fiziológiai folyamatokkal.

4.3. Lárvális és felnőtt szövetek ubikvín tartalma

Az ubikvín formák mennyisége nem csupán a *Drosophila* fejlődése közben változhat, hanem az egyedfejlődés során differenciálódott szövetekben is különbözhet. Az ubikvín koncentráció méréséhez vándorló L3-as stádiumú lárvából boncoltunk agyat, zsírtestet és nyálmirigyet, illetve adultból testiszt, petefészket, fejet és fej nélküli testet. A méréseink igazolták, hogy az egyedben belül, a különböző szövetek ubikvín tartalma és a formák aránya eltérő lehet (13. ábra). A legszembetűnőbb az ováriumban mért magas ubikvín koncentráció volt. A nőstény fejében (agy) ez az érték jóval alacsonyabb, amiből feltételezhető, hogy a nőstény emelkedett ubikvín szintje a petefészkeknek volt köszönhető. A testiszben is relatíve magas ubikvín szintet mértünk, ami arra utalhat, hogy az ubikvínfüggő folyamatok fontos szerepet játszhatnak az *ecetmuslica* ivarsejtképzési folyamataiban. Ezen kívül a szabad és konjugált ubikvín aránya is érdekes információkkal szolgált, ugyanis a fejlődési és mitotikus szempontból aktív szövetek, mint az agy, testisz vagy ovárium, magas szabad ubikvín tartalommal rendelkeznek, míg például a zsírtestben ennek mennyisége igen alacsony.

A lárvális és felnőtt szövetekben mért különbségek az ubikvitin mennyiségében, illetve a szabad és kötött ubikvitinek arányában megerősítik, hogy akár egy egyedben belül, a szövetek funkcionális különbségei eltérő ubikvitin dinamikát eredményezhetnek.



13. ábra. Lárva és adult szövetek ubikvitin profilja. Az oszlopok a teljes (kék oszlop) és szabad (narancssárga oszlop) ubikvitin koncentráció mérések (n=3) átlagát és szórását ábrázolják (A). A konjugált (rózsaszín) és szabad ubikvitin arányának változását a kördiagrammok szemléltetik (B). A statisztikai egyszempontos ANOVA ($p < 0.05$) analízist követő SNK (Student–Newman–Keuls, $p < 0.05$) post hoc teszttel végeztük (F1. táblázat).

4.4. Az *Rpn10/p54* funkcióvesztése változást eredményez az ubikvitin formák mennyiségében

Az ubikvitin-proteasóma rendszer fontos szerepet játszik az ubikvitin körforgásban, így a rendszer meghibásodása az egyensúly felborulásához vezethet. Az *Rpn10/p54* a proteasóma szabályozó alkompleszének alegysége, amely ubikvitin receptorként működik. Ez a receptor felelős egyes poliubikvitinált proteasóma szubsztrátok szelektív felismeréséért és megkötéséért, így járulva hozzá ezek proteasómális degradációjához (Lipinszki és *mtsai*. 2011; Szlanka és *mtsai*. 2003). Kimutatták, hogy az *Rpn10/p54* funkcióvesztése esetén akumulálódnak a poliubikvitinált fehérjék, mi pedig arra voltunk kíváncsiak, hogy ez milyen változásokat eredményez az ubikvitin-egyensúlyban. Az *Rpn10/p54* génkifejeződését RNS interferenciával csendesítettük, melyet *da-GAL4* driverrel indukáltuk, ennek hatását pedig az ubikvitin-egyensúlyra vándorló L3 lárvában vizsgáltuk (14A. és 14C. ábra).

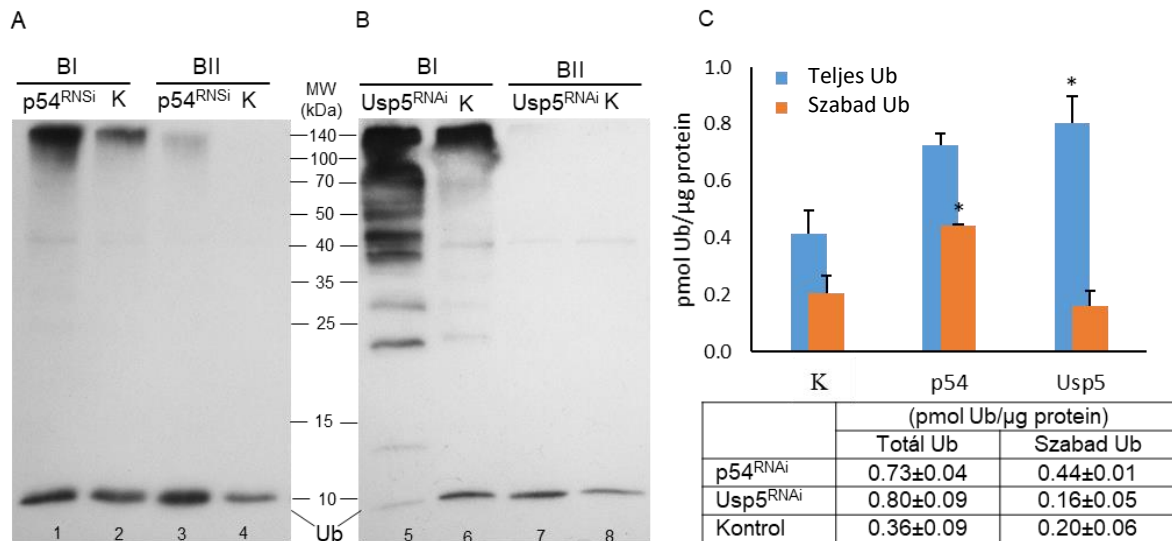
Az *Rpn10/p54* csendesítése a konjugált ubikvitin és a szabad ubikvitin monomerek akkumulációját egyaránt eredményezte (14A. és 14C. ábra). A BII pufferben feltárt *Rpn10/p54^{RNSi}/da-GAL4* mintákban az endogén DUB-ok több órás inkubációt követően sem voltak képesek a konjugált ubikvitint teljes mértékben monomerekké bontani. Mivel így a Western blot kísérletek során a monoubikvitin sáv nem tartalmazta a minta teljes ubikvitin tartalmát, a denzitometriás mérés során csak hozzávetőleges eredményt kaptunk a teljes ubikvitin tartalomról. A 14 C ábrán látható, hogy a minta teljes ubikvitin koncentrációjának mérése során így is több mint kétszeres emelkedést sikerült kimutatnunk a kontrollhoz képest (p-érték=6.523e-07 a Welch t-próba alapján), melyhez nagymértékben hozzájárult a szabad ubikvitinek koncentrációjának szintén kétszeres növekedése (p-érték=1.387e-08). A konjugált ubikvitin koncentrációjának változását a teljes és szabad ubikvitinmérési adatok különbségeként lehetett megadni. A vad típusú kontrollban a konjugált ubikvitin koncentrációja (a teljes és szabad ubikvitin koncentrációk átlagainak különbsége) 16 pmol volt egy μ g fehérjére nézve, míg a *p54* csendesítése következtében ez az érték 29 pmol-ra emelkedik. A valós érték ennél kissé magasabb lehet, amiatt, hogy nem sikerült a teljes ubikvitinkészletet konvertálni monomerekké. Erre a jelenségre részben magyarázatul szolgálhat, hogy az *Rpn10/p54* hiányában gyengül a proteaszóma kapcsolata a vele asszociált DUB-okkal, így csökkenhet ezeknek a DUB-oknak az aktivitása (Hu és mtsai. 2005; Leggett és mtsai. 2002). Emellett elképzelhető, hogy az akkumulálódott fehérjék lebonthatatlan, elágazó poliubikvitin láncokkal rendelkeztek (Kim és mtsai. 2009).

Méréseink eredménye rávilágított, hogy a *Rpn10/p54* gén funkcióvesztése komoly hatással van az ubikvitin-egyensúlyra, mind a teljes ubikvitin tartalom, mind az ubikvitin formák összetételének szintjén.

4.5. Az *Usp5* funkcióvesztésének hatása az ubikvitin-egyensúlyra

A proteaszóma szubsztrátokhoz konjugált ubikvitin újrahasznosításának folyamatában lényeges szerep jut az *Usp5* DUB-nak. Az *Usp5* a proteaszóma szubsztrátjairól lehasított szabad poliubikvitin láncok hidrolízisét végzi, ezáltal felszabadítva az ubikvitin molekulákat. (Wang és mtsai. 2014; Kovács és mtsai. 2015). Az *Usp5* gén funkciójának kiesése a szabad poliubikvitin láncok akkumulációját eredményezi, ami a proteaszóma kompetitív gátlásához vezethet (Dayal és mtsai. 2009). Kíváncsiak voltunk, hogy ez mekkora növekedést eredményez az *ecetmuslica* vándorló L3 lárvákból izolált fehérjeminták ubikvitinszintjében és milyen

hatással van az ubikvitin formák eloszlására. Annak érdekében, hogy ezt vizsgáljuk, a fehérjét kódoló gén kifejeződését RNS interferenciával csendesítettük vándorló L3 lárvákban, majd kimutattuk az ubikvitin-egyensúlyban bekövetkezett változásokat (14B. és 14C. ábra).



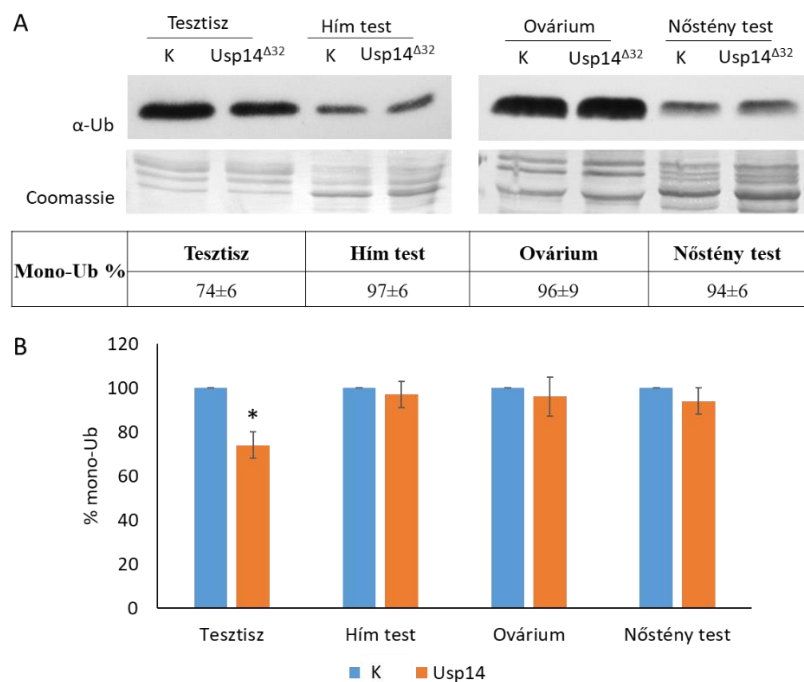
14. ábra Az ubikvitin formák mennyiségi változása az *Rpn10/p54* (A és C) és az *Usp5* (B és C) funkcióvesztése következtében. A BI (1.,2.,5. és 6. sáv) és BII (3.,4.,7. és 8. sáv) pufferben feltárt vad típusú (K) és mutáns L3-as stádiumú lárvák vizsgálata Western blottal, α -ubikvitin ellenanyaggal (A és B). A szabad ubikvitin (8,5 kDa) denzitometriás mérésével, ubikvitin standardok segítségével állapítottuk meg az ubikvitin koncentrációkat. * $p < 0.05$ (C). A felvitt összfehérje koncentrációk: p54^{RNAi} BI - 3 μ g, p54^{RNAi} BII - 2,5 μ g, Usp5^{RNAi} BI - 3 μ g, Usp5^{RNAi} BII - 1,5 μ g Ctrl BI - 5 μ g, Ctrl BII - 2,5 μ g.

A géncsökkentés következtében di-, tri-, tetra- és az ennél hosszabb poliubikvitin láncok jól látható létraként jelentek meg a Western blottokon (14B. ábra). Ez a minták teljes ubikvitinszintjének kétszeres koncentrációnövekedésében nyilvánult meg a kontrollhoz képest (14C. ábra, p -érték=0.009568), míg a monoubikvitin esetében a koncentráció enyhe, nem szignifikáns csökkenését figyeltük meg (14C. ábra, p -érték=0.2581). Ez azt jelentette, hogy a szabad poliubikvitin láncok és a konjugált ubikvitin együttes koncentrációja négyszerese a kontrollénak, ami annak következménye, hogy az Usp5 felelős a szabad poliubikvitin láncok monomerekké bontásáért.

Eredményeink alapján elmondható, hogy az *Usp5* és a *p54/Rpn10* gének csendesítése egyaránt jelentős, a kontrollhoz képest több mint kétszeres növekedést eredményezett a sejtek teljes ubikvitinszintjében. A gének azonban eltérő szerepet töltenek be az ubikvitin-egyensúly fenntartásában, amiket tükröztek az az ubikvitin formák arányában és összetételében tapasztalt lényeges eltérések.

4.6. Az Usp14 null mutáns testiszében csökken a szabad ubikvitinkészlet

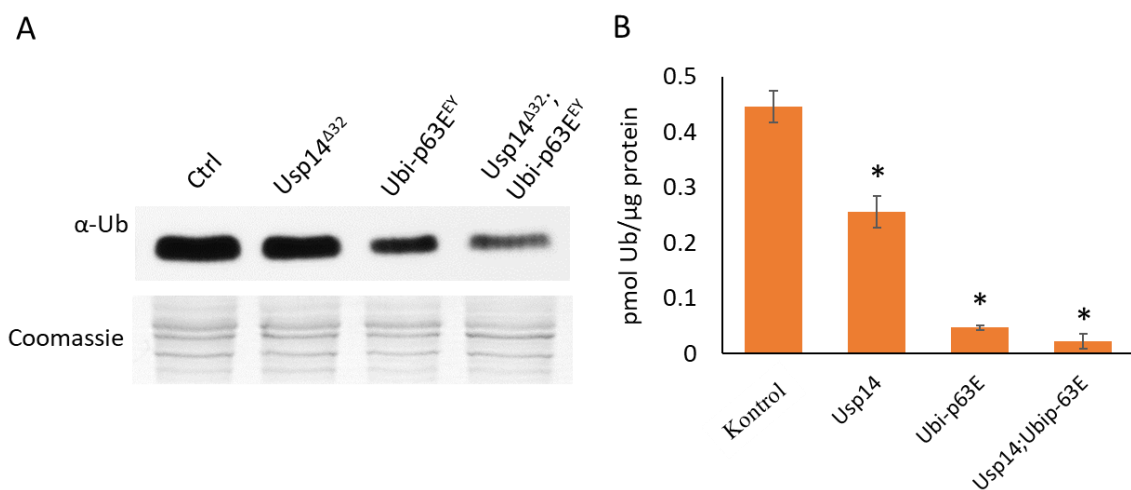
Az ubikvitin-proteaszóma rendszer ubikvitin-újrahasznosításában az Usp5-ön kívül más DUB-ok is szerepet játszanak. Az Usp14 egy proteaszóma asszociált DUB, amely a proteaszóma szubsztrátok láncvégi ubikvitinjeinek eltávolításával egyenként felszabadítja az ubikvitin monomereket, ezáltal részt vesz az ubikvitin formák körforgásában (Lee és mtsai. 2011). A csoportunkban végzett kísérletek rávilágítottak, hogy *Drosophilában* az Usp5 funkcióvesztése által előidézett monoubikvitin hiány következtében megemelkedett az Usp14-et kódoló gén expressziója, ami feltételezhetően szerepet játszik az ubikvitin stresszválaszban (Kovács és mtsai. 2015). A Usp14 funkcióvesztéses mutációja az ecetmuslica életképességét nem befolyásolta, viszont hímsteril fenotípust eredményezett, amelyet a spermiumok szintjén individualizációs hibák jellemeztek (Kovács és mtsai. 2019, publikáció alatt). A hímsteril fenotípus alapján feltételeztük, hogy az Usp14 a testisz ubikvitin-egyensúlyában játszik szerepet. Élesztő és egér modellben végzett kísérletekben az Usp14 hiánya a monoubikvitinkészlet csökkenését eredményezte (Anderson és mtsai. 2005; Leggett és mtsai. 2002), így kísérleteink során az ecetmuslica szövetekben a szabad ubikvitin koncentrációban bekövetkezett változásokat határoztuk meg (15. ábra).



15. ábra. A szabad ubikvitin relatív mennyiségének változása a vad típusú kontrollhoz képest az Usp14^{Δ32} mutánsokban. Az Usp14^{Δ32} mutáns testiszben a monoubikvitinszintje közel 30%-kal csökkent, míg a hím testisz nélküli testében nem különbözött a vad típus és a mutáns szabad ubikvitin mennyisége. Ugyancsak nem figyelhető meg szignifikáns változás az Usp14^{Δ32} mutáns ováriumban illetve az ovárium nélküli nőstény testében. *p < 0.05.

A monoubikvitinszint változásainak méréséhez az *Usp14*⁴³², CRISPR/Cas9 technikával létrehozott nullmutánst használtuk. Vizsgálatainkhoz háromnapos felnőtt hímek testiszét boncoltuk ki, majd a testiszből és a testisz nélküli testből fehérje-extraktumot készítettünk. Kontrollként az ugyancsak háromnapos nőstények ováriumából és testéből készítettünk homogenizátumokat. Ahogy az a 15. ábrán is látható, az *Usp14* funkcióvesztése közel 30%-os csökkenést eredményezett a testisz szabad monoubikvitin koncentrációjában a vad típusú kontrollhoz képest, míg a mutáns ováriumban a reproduktív szervek nélküli testekben az monoubikvitin mennyisége nem változott.

A szabad monoubikvitin koncentrációjának csökkenése *Drosophila* testiszben nem csupán az *Usp14* mutánsra volt jellemző. Az *Ubi-p63E*^{EY07341} poliubikvitin gén hipomorf mutációja egy még drasztikusabb csökkenést eredményezett a szabad ubikvitin készletben. Ennek oka, hogy a testiszben elsősorban ez a gén felelős az ubikvitin szintéziséért (Lu és mtsai. 2013), a szabad ubikvitinkészlet fenntartásában pedig feltehetően lényegesen nagyobb szerepet játszik az ubikvitin *de novo* szintézise, mint az *Usp14* közreműködésével történő ubikvitin-újrahasznosítás. Az *Usp14*⁴³²;*Ubi-p63E*^{EY07341} kettős mutáns ubikvitinprofilját vizsgálva a szabad monoubikvitinkészlet mennyiségének további szignifikáns csökkenését figyeltük meg (16. ábra). Ez a szinergisztikus hatás funkcionális kapcsolatot feltételez a két gén között és igazolja, hogy az ubikvitin homeosztázist szabályozó szerepük ugyanazon a rendszeren belül valósul meg.



16. ábra. A szabad monoubikvitin mennyisége jelentősen csökken az *Usp14*⁴³², *Ubi-p63E*^{EY07341} mutáns és az *Usp14*⁴³²; *Ubi-p63E*^{EY07341} kettős mutáns testiszben. Az α -ubikvitin ellenanyaggal készült immunoblottok (A) denzitometriás mérését követően az ubikvitin standardok alapján számoltuk ki a szabad ubikvitin koncentrációját, mely a mutánsokban szignifikáns csökkenést mutatott, * $p < 0.05$ (B)

Az ubikvitin-proteaszóma rendszer szabályozásában szerepet játszó gének vizsgálata rávilágított arra, hogy a rendszer különböző lépéseiben ható gének különbözőképpen befolyásolják az ubikvitin-egyensúlyt. A *p54/Rpn10* és az *Usp5* funkcióvesztése egyaránt az ubikvitin akkumulációját eredményezte, viszont az ubikvitin formák eltérő eloszlásával, míg az *Usp14* mutációja a szabad monoubikvitin-szintben eredményezett szignifikáns csökkenést.

4.7. Az APC/C ubikvitin ligáz Cdc26 alegységének homológjai *Drosophilában*

A Cdc26-ot, mint az APC/C legkisebb alegységét a mérete miatt sokáig nem azonosították *Drosophila melanogasterben*. Csoportunk az élesztő és ember Cdc26 konzervált aminosav szekvenciája alapján ecetmuslicában két lehetséges homológot is azonosított, egy 84 aminosavból álló fehérjét, melyet a *CG17343* gén kódol, illetve egy 188 aminosav hosszú fehérjét, melyet a *CG3457* gén kódol (17. ábra).

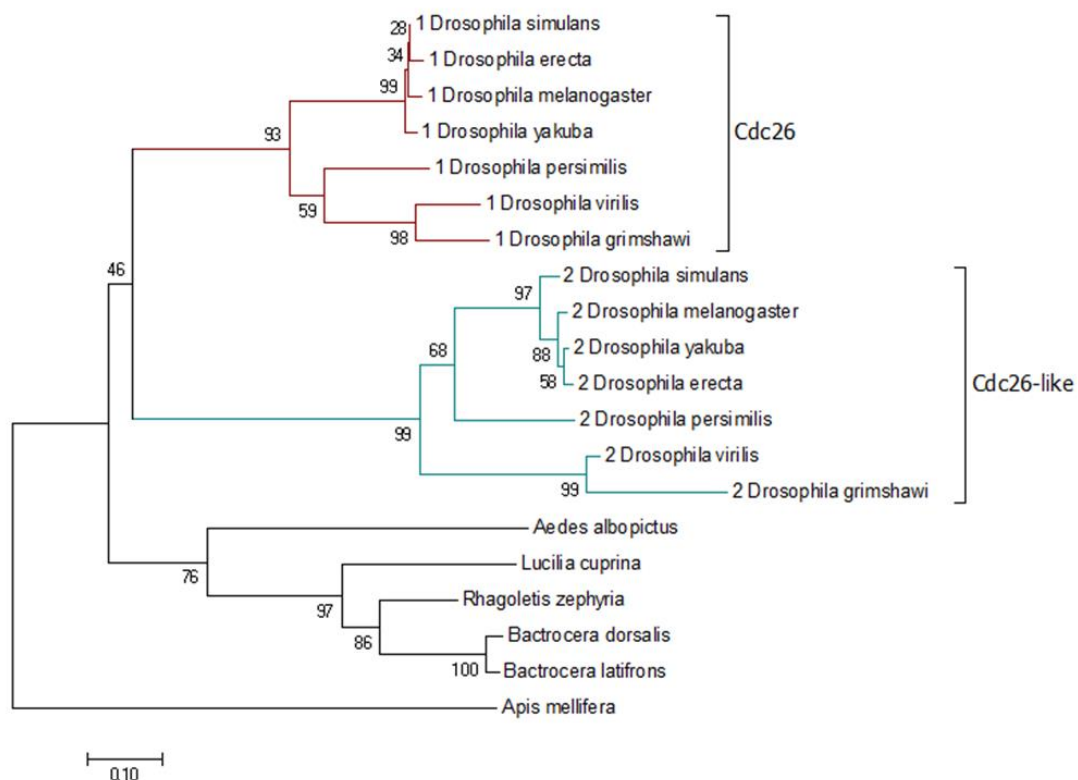
MIRRAPTTLQLSHDDVTSLLIDDLNEQKLKQ (124)	<i>S. cerevisiae</i>
MIRRSPTRIDLRLLDDLQEQYE-AMRK-ALEAK (72)	<i>A. mellifera</i>
MLRRKPTRLELKLDDTEEFE-SVKK-ELESR (88)	<i>D. rerio</i>
MLRRKPTRLELKLDDIEEFE-GVRK-DLESR (84)	<i>G. gallus</i>
MLRRKPTRLELKLDDIEEFE-SIRK-DLEAR (85)	<i>M. musculus</i>
MLRRKPTRLELKLDDIEEFE-NIRK-DLETR (85)	<i>H. sapiens</i>
MRRRELQTIQLKLSDLKEYEQAKME-RLRNR (84)	<i>D. melanogaster (CG17343)</i>
MLKRDLOKITLKLSDLDKDYEVARQKNKLGGA (192)	<i>D. melanogaster (CG3457)</i>

17. ábra A Cdc26 fehérje konzervált N-terminális szekvenciájának összehasonlítása különböző fajokban. Pirossal az azonos, sárgával a hasonló aminosavakat jelöltük.

A két gén funkcióvesztéses mutánsait vizsgálva kiderült, hogy a *CG17343* által kódolt fehérje létfontosságú, míg a *CG3457* géntermék hiányában nem tapasztaltunk fenotípus változást, az ecetmuslicák életképesek és fertilisek voltak. A *CG17343* mutáns emellett a többi ismert APC/C alegység mutánsaihoz hasonló mitotikus fenotípust mutatott. L3 stádiumú lárvából izolált agyakat vizsgálva metafázis szerű állapotban rekedt sejteket, túlkondenzált kromoszómákat, rendezetlen anafázist és poliploid sejteket lehetett megfigyelni. A *CG3457* mutációja esetén a mitotikus fenotípus nem tért el a kontrolltól, viszont a fehérje túltermelése képes volt menekíteni a *CG17343* mutáns fenotípusát (Horváth Judit szakdolgozat 2009, nem

publikált adatok). Az eddigi eredmények alapján, a továbbiakban a *CG17343* gén által kódolt fehérjére Cdc26-ként, míg a *CG3457* által kódolt fehérjére Cdc26-like-ként utalok.

A Cdc26 és Cdc26-like N-terminális, 20 aminosav hosszú szekvenciája 70%-os azonosságot mutatott a Clustal Omega algoritmussal való összehasonlítás során (F2. ábra). A szekvenciákkal végzett NCBI BLAST keresések rámutattak, hogy míg a *Drosophilidae* családba tartozó fajokban mindkét Cdc26 homológ jelen van, addig a többi vizsgált rovar fajban csupán egy homológot találtunk. A fehérjék kialakulását a Cdc26 homológ aminosav szekvenciák filogenetikai analízisével vizsgáltuk, amelyek 7 *Drosophilidae* családba tartozó fajból és hat másik rovarfajból származtak (18. ábra, F2. ábra).



18. ábra A Cdc26 és Cdc26-like homológ fehérjék filogenetikai vizsgálata. A *Drosophila* és más rovar fajok aminosav szekvenciáinak összerendezéséhez MUSCLE algoritmust használtunk. A filogenetikai fát MEGA7 programmal generáltuk, Neighbor-Joining módszerrel és 1000 Bootstrap ismétléssel. A Bootstrap érték (az elágazásokat jelölő szám) az egyes elágazások helyességének valószínűségét százalékban adja meg. A törzsfá léptéke 0,1, ami azt jelenti, hogy az adott hosszúságú szakaszon 0,1 szubsztitúció jutott egy aminosavnyi helyre. 1-el a Cdc26 homológ szekvenciákat, 2-el a Cdc26-like homológ szekvenciákat jelöltük a *Drosophilidae* családba tartozó fajokban. Pirossal a Cdc26 leszármazási vonalát, kékkel a Cdc26-like leszármazási vonalát jelöltük.

A vizsgált szekvenciák közül majdnem mindegyik a *Diptera* rendbe tartozó fajokból származott, kivéve *Hymenoptera* rendbe tartozó háziméh Cdc26 homológ szekvenciáját, melyet kulcsoportként alkalmaztunk. A szekvenciák összerendezését követően felrajzolt törzsfán látszik, hogy a *Drosophila* Cdc26 paralógok szétválása azt követően történt, hogy a

fehérjék fejlődési vonala elvált a többi vizsgált kétszárnyú fajtól. A Cdc26 és Cdc26-like feltehetően valamikor a *Drosophila* evolúció kezdetén vált el egymástól, valószínűleg egy génduplikációs esemény következményeként, törzsfelődésük pedig szépen követi a *Drosophila* fajok evolúcióját (Clark és mtsai. 2007). A *Drosophila melanogaster* legközelebbi rokonai a *D. simulans*, *D. erecta* és *D. yakuba*, amelyek Cdc26 és Cdc26-like szekvenciái is 93 %-nál magasabb egyezést mutatnak. A *D. permislilis* törzsfelődésileg távolabb áll, Cdc26 szekvenciája közel 70%-os, Cdc26-like szekvenciája 63%-os egyezést mutat. A legtávolabbi rokonok a *D. grimhawi* és *D. virilis*, melyek a Cdc26 esetén közel 60%-os, a Cdc26-like esetén 50%-os egyezést mutatnak (F2. ábra).

4.8. A humán Cdc26 túltermeltetése komplementálja a *Drosophila* Cdc26 mutáns letális fenotípusát

A Jing Wang és munkatársai (2009) strukturális és genetikai vizsgálatokkal mutatták ki humán Cdc26 kötődését az APC/C-vel, illetve felfedték a Cdc26 N-terminális régiója (Cdc26^N) és az APC6 TPR motívuma közötti kapcsolatot, amely egy stabil szerkezetet hoz létre. Emellett azt is igazolták, hogy a két fehérje által létrehozott szerkezet evolúciósan konzervált. Egyrészt rovar sejtekben termeltetett Cdc26^N-t sikerült együtt tisztítani karmosbéka APC6-al, másrészt sarjadzóélesztőben, Cdc26 mutáns háttéren túltermeltetett humán Cdc26 menekítette annak hőszenzitív fenotípusát. Ennek alapján elmondható, hogy a Cdc26 szerepe az APC/C felépítésében feltehetően nem változott az evolúció során. Így ha a humán eredetű Cdc26 (HsCdc26) képes menekíteni a *Drosophila* homológ fehérjét kódoló gén (*CG17343*) mutációjának letális fenotípusát, akkor abból következtethetünk arra, hogy a két különböző fajtól származó fehérje hasonló szerepet tölt be az APC/C felépítésében és stabilizálásában.

A *Drosophila* Cdc26 aminosav szekvenciáját vizsgálva feltűnt, hogy az Apc6-al való kölcsönhatásban kulcsszerepet játszó, más fajokban magasfokú konzerváltságot mutató, Leu2 aminosav argininre cserélődött, a 7-es pozícióban pedig a treonin glutaminra cserélődött, a treonin pedig a nyolcas pozícióban foglal helyet (13. ábra). Kérdéses volt tehát, hogy ezek a változások mennyire befolyásolják a *Drosophila* Cdc26 kapcsolatát az APC/C-vel. Annak érdekében, hogy ezt kiderítsük, a *HsCdc26* gént hordozó transzgenikus *Drosophila* vonalakat kereszteztük olyan mutáns vonalakkal, melyek a *Drosophila* Cdc26 P-elem inszerciós allélját hordozták, mely homozigótaként bábletalitást eredményez. A *HsCdc26*-ot da-GAL4 driverrel hajtottuk meg, így a transzgén folyamatosan és minden sejtben kifejeződött és komplementálta a mutáns letális fenotípusát (3. táblázat).

A 3. táblázatban leírt keresztezésekből származó utódok vizsgálata azt mutatta, hogy a transzgenikus *HsCdc26*-ot expresszálló *CG17343^{EY19920}* homozigóták és heterozigóták aránya megfelel a mendeli eloszlásnak, ami jelzi, hogy a homozigóták mind fertilis adultakká fejlődtek. Az eredmények alapján elmondható, hogy a humán és ecetmuslica *Cdc26* aminosav szekvenciában levő különbségek ellenére a fehérjék hasonló szerepet tölthetnek be, ami valószínűsíti, hogy az ecetmuslicába *Cdc26* fehérje az APC/C egyik alegységként a fehérjekomplex stabilizálásában játszik szerepet.

3. táblázat. Az ecetmuslica *Cdc26* mutáns letális fenotípusának menekítése *HsCdc26* túltermeltetésével.

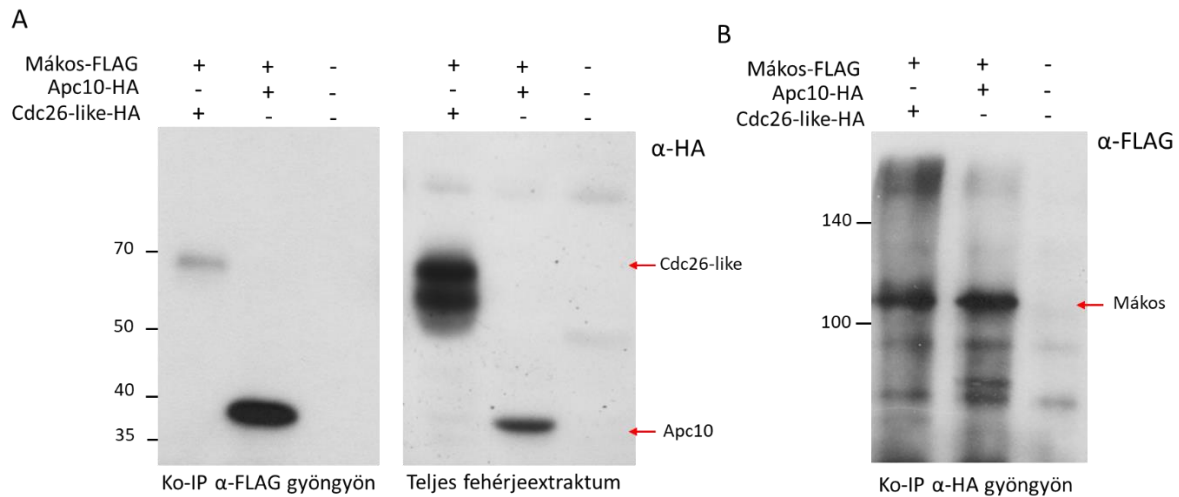
Keresztezések	F1 utódok száma	
	<i>CG17343^{EY19920}</i>	<i>CG17343^{EY19920}/+</i>
<i>CG17343^{EY19920}/CyO, GFP</i> ♀ <i>X</i> <i>CG17343^{EY19920}/CyO, GFP</i> ♂	0	194
<i>CG17343^{EY19920}/CyO, GFP; pTW-HsCdc26</i> ♀ <i>X</i> <i>CG17343^{EY19920}/CyO, GFP; da-Gal4</i> ♂	98	164

4.9. A *Cdc26*-like az APC/C egyik alegysége

A *Cdc26*-al ellentétben, *Cdc26*-like-ot kódoló gén nem esszenciális, mutációja nem eredményez látható fenotípust, viszont túltermeltetve menekítette a *Cdc26* mutáns letális fenotípusát (Horváth Judit szakdolgozat, 2009). Azt hogy a *Cdc26*-like az APC/C alegységként játszik szerepet az ecetmuslicában, koimmunoprecipitációs kísérletekkel mutattuk ki (19. ábra).

A koimmunoprecipitációs kísérletek során a *Cdc26*-like és a Mákos/*Cdc27* fehérjék közötti fizikai kapcsolatot vizsgáltuk. Ehhez α -FLAG mágneses gyögyökkel izoláltuk a FLAG-el jelölt Mákos/*Cdc27* alegységet, illetve a hozzá kapcsolódó fehérjéket, amelyek közül α -HA ellenanyaggal kimutattuk a HA-val jelölt *Cdc26*-like-ot és a pozitív kontrollként használt *Apc10*-et (19A. ábra). A α -HA agaróz gyögyön pedig izoláltuk a HA-jelölt *Cdc26*-like-ot és *Apc10*-et, illetve a velük kölcsönhatásban levő fehérjéket, amelyek között detektáltuk a Mákos/*Cdc27*-FLAG-et (19B. ábra). Mivel a Mákos/*Cdc27* az APC/C egyik esszenciális

alegysége *Drosophila* (Deak és mtsai. 2003), így a vele közvetlenül vagy közvetetten kötődő fehérjék feltételezhetően egyazon komplex alegységei.



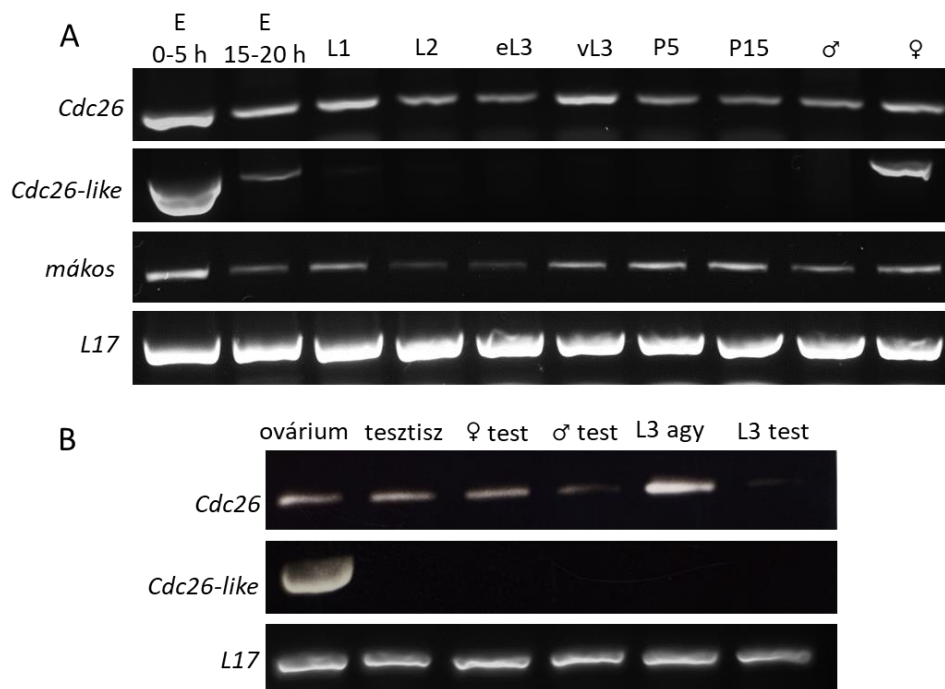
19. ábra. A *Cdc26-like* és a *mákos/Cdc27* fehérjék kölcsönhatásának vizsgálata koimmunprecipitációs kísérletekkel. A α -FLAG mágneses gyöngyökön izolált *mákos/Cdc27*-FLAG fehérje kölcsönható partnereinek és a teljes fehérje extraktumnak vizsgálata Western blottal, α -HA ellenanyaggal (A). A α -HA gyöngyökön izolált *Cdc26-like-HA* és *Apc10-HA* kölcsönható partnereinek vizsgálata Western blottal, α -HA ellenanyaggal (B).

4.10. A *Cdc26* és *Cdc26-like* mRNS expressziós mintázata eltér a különböző fejlődési stádiumokban és szövetekben

A gének kifejeződési mintázatának feltérképezése az egyedfejlődés során támpontot adhat ahhoz, hogy szerepüket jobban megértsük. A *Drosophila* több egyedfejlődési stádiumából származó mRNS mintákról átírt cDNS-en RT-PCR-t végeztünk, melynek eredményeképpen össze tudtuk hasonlítani a *Cdc26* és *Cdc26-like* gének kifejeződési mintázatát (20. ábra). Az *L17* riboszómális háztartási gén kifejeződése minden stádiumban azonos, így ezt használtuk bemérési kontrolként. Annak érdekében, hogy az általunk vizsgált gének expresszióját összevegyük más APC/C alegységet kódoló génekével, ugyanazokon a mintákon RT-PCR-t végeztünk *mákos/Cdc27*-ra specifikus primerekkel is (20A. ábra). Az egyedfejlődési profil alapján pedig kiválasztottunk egyes szöveteket, melyekben külön vizsgáltuk a *Cdc26*-ot és *Cdc26-like*-ot (20B. ábra).

A 20A. ábrán látható, hogy a *Drosophila* egyedfejlődése során a *Cdc26* és a *mákos/Cdc27* minden stádiumban kifejeződik. Mivel tudjuk, hogy a vándorló L3 lárvában a szövetek közül az agy egy mitotikusan igen aktív szövet (Homem és Knoblich 2012), így az anafázis-metafázis átmenetben kulcsszerepet játszó APC/C is ebben a szövetben a legaktívabb.

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk együtt jár-e ez a *Cdc26* expressziójának növekedésével, vándorló L3 lárvákból agyat boncoltunk, majd összehasonlítottuk a gén expresszióját az agyban és az agy nélküli lárva testben (20B. ábra). Az eredmények alapján elmondható, hogy a mitotikusan aktív agyban jelentősen magasabb a *Cdc26* expressziója, mint a többi lárvális szövetben. A *Cdc26-like* ettől jelentősen eltér, ugyanis csupán az embrióban és az felnőtt nőtényben mutatható ki. Ugyanakkor markáns különbség figyelhető meg a géntermék mennyiségében a korai és késői embrió között, a korai embrió javára. Ugyan a *Cdc26* esetében is megfigyelhető a géntermék csökkenése a késői embrióban, de ez a változás minimális a *Cdc26-like*ban megfigyelhetőhöz képest. A 20B. ábrán látható, hogy a *Cdc26-like* kifejeződése a felnőtt nőtényben az ováriumba korlátozódik.

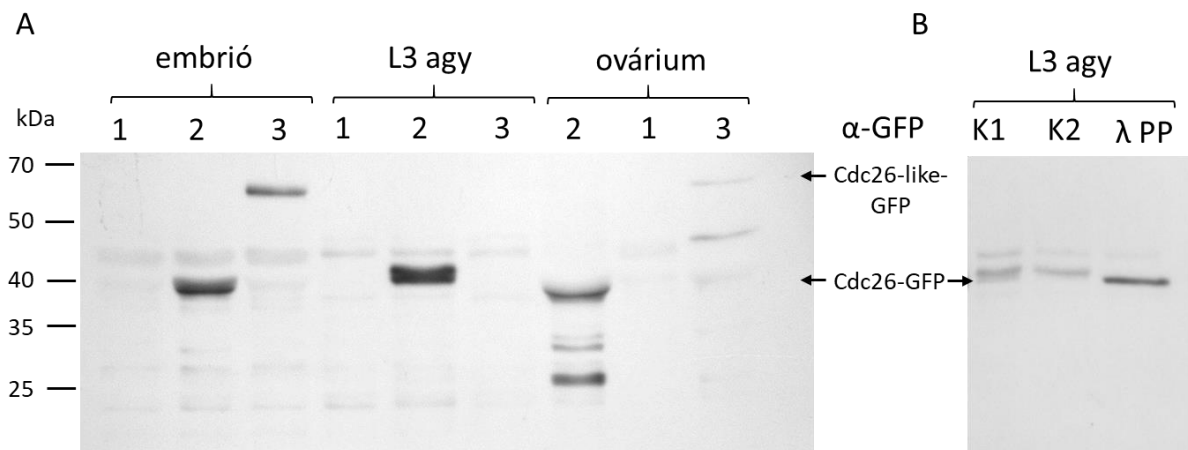


20. ábra. A *Cdc26* és *Cdc26-like* és *mákos/Cdc27* gének expressziójának vizsgálata RT-PCR-el a *Drosophila* egyedfejlődése során (A) és különböző szövetekben (B). Az *rpL17*-et bemérési kontrollként alkalmaztuk.

Figyelembe véve azt, hogy a *Cdc26-like* géntermék jelenléte a korai embrióban a legjelentősebb, és ezen kívül csupán az ováriumban fejeződik ki, akkor elképzelhető, hogy a *Cdc26-like* gén az ováriumban íródik át, jelenléte az embrióban pedig az anyai hatásnak köszönhető. Ez azt jelenti, hogy az amíg nem indul be a transzkripció, az embrió a citoplazmájában levő, anyai eredetű mRNS-t és fehérjét használja.

4.11. A Cdc26 és Cdc26-like fehérjék kifejeződésének vizsgálata

A Cdc26 és Cdc26-like fehérjék vizsgálatához olyan transzgenikus konstrukciókat készítettünk, amelyek az átíródó, GFP-vel fuzionált Cdc26 és Cdc26-like a saját promóterük szabályozása alatt áll. A transzgéneket hordozó ecetmuslicában így vizsgálható, hogy a fehérjék kifejeződése hogyan változik a különböző szövetekben és fejlődési stádiumokban. A transzgenikus konstrukciók kifejeződését *Cdc26* és *Cdc26-like* P-elem inszerciós mutáns háttéren vizsgáltuk, *Cdc26^{EY19920};Cdc26-GFP* és *Cdc26-like^{15/1};Cdc26-like-GFP* genotípusú ecetmuslicákban. Az RT-PCR adatok alapján embrióból, vándorló L3-as stádiumú lárva agyából és felnőtt ováriumból izoláltunk fehérjét, melyet SDS-PAGE-el szeparáltunk, majd Western blottal vizsgáltunk (21. ábra).



21. ábra. Cdc26 és Cdc26-like saját promóterrel meghajtott fehérjék vizsgálata különböző szövetekben (A) illetve a Cdc26 fehérje foszforilációjának kimutatása (B). 1- vad típusú kontrol, 2- *Cdc26^{EY19920};Cdc26-GFP*, 3- *Cdc26-like^{15/1};Cdc26-like-GFP*, melyek expresszióját embrióban, L3 agyban és ováriumban vizsgáltuk (A). A Cdc26 foszforilációját L3 agyban vizsgáltuk, kontrollként foszfatázzal nem kezelt és azonnal forralt mintát (K1), illetve jégen fél órát inkubált mintát (K2) használtunk.

A 21A. ábrán látható, hogy Cdc26 jelen van az embrióban és a két vizsgált szövetben is. Ezzel ellentétben a Cdc26-like az embrióban és kisebb mértékben található meg az ováriumban, addig teljesen hiányzik az L3-as stádiumú lárvából izolált agyból. Amint az az ábrán látható az embrióban és ováriumban 40 kDa-körül, az L3-as stádiumú lárva agyában pedig két sávot észleltünk, melyek közül az egyik szintén 40 kDa körül, míg a másik enyhén fölötte helyezkedik el. Az eredmények alapján azt feltételeztük, hogy a méretbeli különbséget és a dupla sáv karaktert a fehérje poszttranszlációs módosítása okozta. A kis különbség miatt legnagyobb valószínűséggel a fehérje foszforilációja. Annak érdekében, hogy teszteljük ezt az

elméletet, L3-as stádiumú lárva agyából származó teljes fehérje extraktumot kezeltünk lambda protein foszfatázzal (λ PP), mely fél óras inkubációt követően eltávolította a fehérjéről a foszfátcsoportot. A 21B. ábrán látható, hogy a foszfatázzal kezelt mintában a Cdc26-GFP esetében a két sáv helyett csupán egy detektálható, ami jelzi, hogy a Cdc26-hoz foszfátcsoport kapcsolódott, melyet az enzim eltávolított.

A *Cdc26* és *Cdc26-like* gének és az általuk kódolt fehérjék vizsgálata alapján elmondhatjuk, hogy valószínűleg mindkét gén funkcionális kapcsolatban áll az APC/C-vel. A Cdc26 jelenléte a *Drosophila* egyedfejlődés során végig kimutatható, míg a Cdc26-like az ováriumra és embrióra korlátozódik. Ennek fényében elképzelhető, hogy *ecetmuslica* rendelkezik egy egyedi felépítésű APC/C-vel, amelynek a reprodukció során illetve az embrió korai sejtmagi osztódásaiban lehet szerepe.

5. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

5.1. Az ubikvitinkészlet dinamikusán változik az *ecetmuslica* egyedfejlődési stádiumaiban és különböző szöveteiben

Az ubikvitináció számos sejt folyamat szabályozásában játszik kulcsszerepet a transzkripciótól kezdve a degradációig. A szervezetek normál működésekor a szabad monoubikvitin-készlet sejten belüli mennyisége és a kötött ubikvitinhez viszonyított aránya állandó, de ez sejt- illetve szövettípusok között változó. A reakciókban felhasznált vagy degradált szabad monoubikvitin pótlása kétféle mechanizmuson keresztül történik. Egyrészt a szabad monoubikvitin-készletbe kerülnek az ubikvitin génekről újonnan szintetizálódott és a DUB-ok által feldolgozott monoubikvitinek, viszont ez nem elegendő a megfelelő monoubikvitin-szint fenntartásához. Ebben szintén lényeges szerepet játszik az ubikvitinek újrahasznosítása, amit a DUB-ok végeznek, a különböző fehérjékhez kötött ubikvitinek felszabadításával (Kimura és Tanaka 2010; Park és Ryu 2014).

Munkánk során az ubikvitin formák dinamikus egyensúlyát vizsgáltuk az *ecetmuslica* fejlődési stádiumaiban, differenciálódott lárvális és felnőtt szöveteiben, valamint az ubikvitin rendszert érintő mutánsokban. Először a legmegfelelőbb módszert szeretnénk volna alkalmazni a különböző ubikvitin formák mennyiségi változásainak követésére. Az elmúlt évtizedek folyamán már számos módszert alkalmaztak a sejtek és szövetek ubikvitin tartalmának mérésére. Az ubikvitin mennyiségi vizsgálatához először ELISA és RIA módszereket használtak, amelyek lényege, hogy az ubikvitin formák elkülönítése a szabad illetve kötött ubikvitinre specifikus ellenanyagokkal történik. Kereskedelmi forgalomban azonban nincs olyan ubikvitin ellenanyag, amely teljes mértékben specifikus lenne egyik vagy másik ubikvitin formára. Mivel az ubikvitin formák mérésére használt ellenanyagok reaktivitása átfed, ELISA-val és RIA-val nem határozható meg pontosan az ubikvitin tartalom (Takada és *mtsai*. 1995, 1996).

Ennél sokkal részletesebb képet kapunk a sejtek és szövetek ubikvitin összetételéről tömegspektrometriás módszerekkel, mint például az Ub-PSAQ, amely nem csupán a szabad és konjugált ubikvitin, hanem a különböző poliubikvitin lánc típusok kvantifikálására is alkalmas (Kaiser és *mtsai*. 2011a). Ezek a módszerek azonban speciális és költséges felszerelést igényelnek, így nem alkalmazhatóak rutinszerűleg nagy mennyiségű minta méréséhez.

Vizsgálatainkhoz ezért Oh és munkatársai (2013) által egér modellre kifejlesztett Western blot alapú módszert módosítottuk, majd alkalmaztuk. Ez a módszer kiküszöböli az

ellenanyag-specifitás kérdését avval, hogy a homogenizált mintákban, a bennük jelen lévő DUB enzimek aktivitásának eredményeként, a sejtek teljes ubikvitin-tartalmát szabad monoubikvitinekké konvertálja. Így egyetlen ubikvitin-ellenes ellenanyag elegendő a mérésekhez. Az ubikvitin formák mennyiségi meghatározása teljes fehérje extraktumok és ubikvitin standardok SDS-PAGE, majd pedig Western blot analízisével, és az ubikvitin sávok denzitometriás mérésével történik. Az egér és *ecetmuslica* fiziológiai eltérései miatt a protokollt számos ponton módosítanunk kellett, több paraméter optimalizáltunk *Drosophilára*. Ez a *Drosophilára* adaptált módszer lehetővé tette számunkra, hogy viszonylag egyszerű és költséghatékony módon, de mégis megbízhatóan mérjük a minták szabad és teljes ubikvitin-tartalmát. Ezekből a kísérleti adatokból kiszámítható a kovalensen kötött ubikvitin mennyisége is.

A szabad és konjugált ubikvitin formák egyensúlyát *Drosophila* modellszervezetben eddig még nem vizsgálták átfogóan. Azt gondoljuk, hogy ilyen adatok sokat elmondhatnak egy-egy vizsgált biológiai folyamat ubikvitin-igényéről és az ubikvitin-függő folyamatok aktivitásáról. Az általunk meghatározott egyedfejlődési profil az ubikvitinkészletek dinamikus voltát igazolja. Nagy változásokat mértünk mind a teljes ubikvitin tartalomban, mind a mono- és konjugált ubikvitin arányában, amelyeket a *de novo* szintézis mellett az ubikvitin-újrahasznosítása és körforgása is alakítja. A fejlődési stádiumok között a teljes ubikvitin koncentrációja gyorsan változik, akár a háromszorosára is ugorhat, mint például a késői embrió és az L1 lárva között, vagy nagymértékben lecsökkenhet, mint a korai L3 lárva esetén. A teljes ubikvitinszintje az L1 lárzában az egész egyedfejlődési profilt nézve is kimagasló, a nőstényben mért, szintén magas teljes ubikvitin mennyiségnek is mintegy kétszerese. Ennek oka részben az lehet, hogy L1 lárzában igen magas a neuroblasztok mitotikus aktivitása, ugyanis a belőlük képződő neuronok alakítják majd ki az adult központi és perifériás idegrendszerét (Truman és mtsai. 1993). Ezen kívül, a lárvafejlődés során a neuronok átrendeződését az axonok és dendritek irányított degenerációja kíséri, amely szintén ubikvitin-függő (Rumpf és mtsai. 2011). A szabad és kötött ubikvitin-formák aránya ugyancsak dinamikusan változik az egyedfejlődés alatt. Megfigyelhető, hogy az összetett átrendeződési folyamatok, mint a lárva-báb, illetve a báb-adult átmenetek, igen magas monoubikvitin aránnyal járnak együtt. Különösen a lárva-báb átmenet érdekes, ahol nagyon hirtelen fordul meg az ubikvitin arány. Míg a vándorló L3 lárzában még 1/3-2/3 a szabad és konjugált ubikvitin aránya, addig a korai (P1) bábban a szabad monoubikvitin aránya 2/3. Ez a teljes ubikvitin-tartalom csökkenésével és a szabad ubikvitin-tartalom növekedésével következik be.

Az ubikvitin formák mennyiségi feltérképezése során több *Drosophila* szövetben is méréseket végeztünk. A legmagasabb ubikvitinszintet a petefészekben, a tesztiszben, illetve a fej nélküli nősténytestben mértük. A reproduktív szervek magas ubikvitin-tartalma nem meglepő, ugyanis sejtjeiben számos ubikvitin-igényes illetve az ubikvitin rendszert érintő folyamat megy végbe. Például a csírvonal őssejtek fenntartásában fontos szerepet játszó ciklin A degradációja (Chen és mtsai. 2009), vagy a H2B hiszton dezubikvitinációja a *scrawny* (*scny*) DUB által (Buszczak és mtsai. 2009). A hímivarsejtek végső differenciációja során a sejtek nagymértékű átrendeződése történik, amely során a citoplazma nagy része eltűnik. Ebben a folyamatban szerepük van az apoptotikus proteineknek, amelyek szintén az ubikvitin rendszer szabályozása alatt állnak (Arama és mtsai. 2007). Ezen kívül érdemes megemlíteni, hogy az ivarvonal sejtjeinek és a follikuláris őssejtek osztódása, illetve a dajkasejtekben végbemenő endociklus is magas ubikvitin-szintet igényelhetnek (Kirilly és Xie 2007; Lilly és Spradling 1996). A vizsgált szövetek között a szabad monoubikvitin aránya az L3-as lárvaagyban volt a legmagasabb, a teljes ubikvitin tartalom megközelítőleg 80%-a szabad monoubikvitin. Elképzelhető, hogy a magas szabad monoubikvitin arány a mitótikusan aktív sejtekben a gyors fehérjedegradációt segíti elő. A lárvális agyakban megy végbe a neuroblasztok aszimmetrikus osztódása, amely az adult központi idegrendszer kialakításáért felelős (Homem és Knoblich 2012). Az ubikvitin rendszer kulcsszerepet játszik a sejtciklus lépéseinek szabályozásában, mind a szabályozó fehérjék szintjének szabályozásával, mind pedig a nem degradációs mechanizmusok által is. Szerepe van többek között a DNS replikációban, a nukleoszóma összeszerelésében, a kromoszómák szegregációjában és a mitótikus exitben (Gilberto és Peter 2017) is. A magas szabad ubikvitin arány az L3-as lárvaagyban utalhat arra, hogy az osztódó, illetve az osztódásra készülő sejteknek egy nagyobb szabad ubikvitinkészletre van szüksége, ami fedezi a gyors folyamatok ubikvitin-igényét. Az adultak központi idegrendszerének ubikvitin tartalmát testtől elválasztott fejből izolált fehérjeextraktumban mértük. A minták teljes ubikvitinszintje jóval alacsonyabb volt a lárvaagyakban mértnél, a szabad monoubikvitin aránya viszont itt is igen magas volt. Az agy monoubikvitin aránya nem csak az ecetmuslicában, hanem más organizmusban is igen magas. Az egéragyban a monomerek a teljes ubikvitin-tartalom megközelítőleg 60 %-át teszik ki, míg az emberi frontális lebenyben a teljes ubikvitin mennyiség 82 %-át (Kaiser és mtsai., 2011; Oh és mtsai., 2013). Emlősökben a szabad monoubikvitin magas aránya a neuronok szinaptikus plaszticitásával függhet össze. Az információk feldolgozása és a tanulás folyamata a neuronális hálózatok átrendeződésével jár, melyben fontos szerepe van az ubikvitin-függő fehérjelebontásnak (Mabb és Ehlers 2010). A szabad monoubikvitin-készlet jelenléte elengedhetetlen az egéragy megfelelő működéséhez.

Ezt igazolja az is, hogy az egér *Usp14* gén funkcióvesztéses mutációja a monoubikvitin-tartalom csökkenéséhez és ezáltal idegrendszeri diszfunkciókhoz vezet (Anderson és mtsai. 2005).

5.2. Az ubikvitin-proteaszóma rendszer különböző lépéseit érintő mutációk eltérően hatnak az ubikvitin egyensúlyra

Korábban már ismert volt, hogy egyes gének funkcióvesztése zavart okoz az *ecetmuslica* ubikvitin homeosztázisában (Saeki és mtsai. 2002). Az *Rpn10/p54* kiesése például a konjugált ubikvitin akkumulációját okozza bábokban (Szlanka és mtsai. 2003). Az *Usp5* hiányában pedig L3 stádiumú lárvákban mutatták ki a szabad ubikvitinláncok akkumulációját, ezzel párhuzamosan pedig a monoubikvitin-szint csökkenését (Wang és mtsai. 2014; Kovács és mtsai. 2015). Az általunk alkalmazott ubikvitinmérési módszer alkalmas volt arra, hogy megfigyeljük az ubikvitin rendszert érintő mutánsokban bekövetkező változások természetét. A p54/Rpn10 proteaszóma alegység és az *Usp5* DUB csendesítése egyaránt a teljes ubikvitin tartalom mintegy kétszeres növekedését eredményezte. A p54/Rpn10 poliubikvitin receptorként funkcionáló alegységnek fontos szerepe van a proteaszóma szubsztrát szelekciójában (Grice és Nathan 2016). Ez alapján arra következtethetünk, hogy a felhalmozódott ubikvitin-fehérje konjugátumok olyan proteaszóma szubsztrátok, melyek felismerésében és megkötésében kizárólag a p54/Rpn10 játszhat szerepet. A konjugált ubikvitin mennyiségét ebben a mutánsban nem tudtuk teljes pontossággal megállapítani, ugyanis a PII pufferben feltárt mintákban a konjugált ubikvitin több óra inkubáció után sem bomlott le teljesen monomerekre. Ennek egy lehetséges magyarázata, hogy a nem lebontható konjugátumok egy része olyan elágazó poliubikvitin láncokból állhat, amelyek rezisztensek DUB hidrolízisre. Ismert ugyanis a p54/Rpn10 humán homológjáról, az S5a-ról, hogy szerepe van az elágazó poliubikvitin konjugátumok kialakulásának gátlásában (Kim és mtsai. 2009). A 26S proteaszóma alacsony affinitással rendelkezik az elágazó poliubikvitin láncok iránt, és a proteaszóma asszociált DUB-ok is csak igen lassan hasítják el ezeket a lánc típusokat (Kim és mtsai. 2007). A konjugált ubikvitin mellett a p54/Rpn10 hiányában az ubikvitin monomerek mennyisége is lényegesen megnőtt, a kontrollhoz képest több mint kétszeresére. Ebből arra következtethetünk, hogy a p54/Rpn10 funkcióvesztése nincs hatással az ubikvitin *de novo* szintézisére, illetve az elágazó ubikvitinláncok kivételével, az ubikvitin-újrahasznosítás is tovább működik.

Az *Usp5* DUB gén csendesítése szintén kétszeres növekedést eredményezett a teljes ubikvitin mennyiségében, viszont az ubikvitin formák eloszlása teljesen más képet mutatott. A

legszenbetűnőbb ebben a mutánsban a szabad poliubikvitin láncok felhalmozódása. Méréseink szerint a vándorló L3 lárvákban a szabad poliubikvitin láncok és a konjugált ubikvitin együttes mennyisége mintegy négyszerese volt a vad típusú kontrollban mértnek. A szabad poliubikvitin láncok mennyiségének jelentős növekedését már korábban is kimutatták, amely annak köszönhető, hogy az Usp5 felelős ezek hasításáért monomerekké (Amerik és mtsai., 1997; Dayal és mtsai., 2009; Kovács és mtsai., 2015). A szabad poliubikvitin láncok eredetéről ismert, hogy a proteaszómális fehérjedegradációt megelőzően, a proteaszóma alegységeként működő DUB, az Rpn11, *en block* lehasítja a fehérjéről a poliubikvitin láncokat, amelyek ezt követően a citoplazmába kerülnek (Cope és mtsai. 2002). Az Usp5 aktivitásának hiányában felhalmozódó szabad poliubikvitin láncok kompetitíven gátolják a proteaszómát, és ezzel magyarázható az *Usp5* mutánsok letális fenotípusa (Kovács és mtsai., 2015). Ugyanakkor a szabad monoubikvitin mennyiségében rendszeresen, de csak enyhe csökkenést tudtunk mérni az *Usp5* mutánsokban, noha az ubikvitin-újrahasznosítás hiányában nagyobb mértékű csökkenést vártunk. Egy lehetséges magyarázat az lehet, hogy *Usp5* mutánsokban megemelkedhet az ubikvitin gén expressziója, ami részben, vagy teljesen kompenzálni képes a fellépő monoubikvitin hiányt. Ezt az elképzelést azonban eddig még nem teszteltük.

Az ubikvitin-újrahasznosítás az ubikvitin-proteaszóma rendszerben nem csupán egy módon történhet. Az *Usp14* proteaszóma asszociált DUB még a degradációra való elköteleződést megelőzően hasítja le a láncvégi (disztális) ubikvitineket, ezáltal azok visszakerülnek a szabad monoubikvitinkészletbe. Az *Usp14* hiánya élesztőben és egérben is a szabad ubikvitinkészlet általános csökkenését eredményezte (Anderson és mtsai. 2005; Leggett és mtsai. 2002). *Drosophilában* a gén mutációja hímsteril fenotípust eredményezett, így nem meglepő módon a szövetek ubikvitin tartalmának mérése során a mutáns testiszben a monoubikvitin készlet megközelítőleg 30%-os csökkenését mutattuk ki a kontrollhoz képest. A *Usp14^{Δ32}* fenotípusát lényegesen súlyosbította az *Ubi-p63E^{EY07341}* hipomorf mutánsal való keresztezés. Az *Ubi-p63E* poliubikvitin gén felelős elsődlegesen a testiszben az ubikvitinszintézisért (Lu és mtsai. 2013). Az *Ubi-p63E^{EY07341}* mutáns testiszben a monoubikvitinszint drasztikus csökkenését mutattuk ki, mely az *Usp14^{Δ32}; Ubi-p63E^{EY07341}* kettős mutánsban tovább csökkent. Ebből arra következtethetünk, hogy a két gén kölcsönhat a testisz szabad ubikvitinkészletének fenntartásában. Hiányukban az ubikvitin-egyensúly felborul, a lecsökkent szabad ubikvitinkészlet pedig már nem elégséges a testisz ubikvitin-igényének a kielégítésére.

5.3. A Cdc26 és Cdc26-like az APC/C alegységei *Drosophila melanogaster*ben

Az ubikvitin-proteaszóma rendszer szubsztrátspecifitása az ubikvitin-protein ligázoknak (E3 enzim) köszönhető. Az E3 enzimek koordinálják és katalizálják az ubikvitin tranzícióját az E2 enzimről a megfelelő célfehérjére. A szubsztrátok sokfélesége miatt az eddig azonosított E3 enzimek száma is igen magas, az ember esetében számuk több mint 500. Az enzimek nagy részét egyetlen polipeptidlánc alkotja, viszont előfordulnak nagyméretű, számos alegységből álló fehérjekomplexek is. A sejtciklusban szerepet játszó SCF és APC/C a legösszetettebb ubikvitin ligázok, amelyek számos alegységgel, ezáltal pedig igen sokrétű szabályozással rendelkeznek. Az APC/C nagy szerepet játszik a mitózis és G1 fázis szabályozásában. A regulátor fehérjék időzített degradációjával biztosítja a fázisok közötti átmenetek hibamentes lefolyását és kijelöli azok irányát. Az APC/C mérete tükrözi funkciójának összetettségét. A koaktivátorok kötődése, az alegységek foszforilációja, illetve a gátló mechanizmusok mind hozzájárulnak ahhoz, hogy az APC/C a megfelelő időben a megfelelő szubsztrátokat jelölje ki degradációra. A fenti szabályozó mechanizmusoknak köszönhetően, a komplex aktivitása és szubsztrátspecifitása a sejtciklus előrehaladtával változik (Alfieri és mtsai. 2017a; Watson és mtsai. 2019). A *Drosophila* APC/C legalább 13 alegységgel rendelkezik, amelyek három alkomplexbé szerveződnek. A Cdc26 az APC/C egyik legkisebb alegysége, amely az emberi TPR alkomplex szerkezeti stabilitásában játszik szerepet (Wang és mtsai. 2009). Csoportunk *Drosophila melanogaster*ben szekvencia homológia alapján két Cdc26 paralóg fehérjét azonosított. A szekvenciák filogenetikai elemzéséből arra következtettünk, hogy a két fehérje a *Drosophilidae* evolúció kezdetén, valószínűleg egy génduplikáció következtében alakulhatott ki. Az eddigi adatok alapján csupán a *Drosophilidae* családba tartozó fajok rendelkeznek két Cdc26 homológ fehérjével, melyeket Cdc26-nak és Cdc26-like-nak nevezünk el.

A két fehérjét kódoló gének közül csupán az egyik, a *Cdc26* bizonyult létfontosságúnak. A *Cdc26* mutáns lárvális agypreparátumainak mitotikus fenotípusa nagyon hasonló volt az eddig vizsgált *mákos/Cdc27* (Deak és mtsai. 2003), *Apc5* (Bentley és mtsai. 2002), *Apc6* és *Apc8* (Pál és mtsai. 2007a) illetve az *Apc10* (Pál és mtsai. 2007b) mutánsoknál tapasztaltnak (Horváth Judit szakdolgozat, 2009). A hasonlóság alapján elképzelhető volt, hogy a Cdc26 a *Drosophila* APC/C felépítésében játszik szerepet. Ezt az elképzelést megerősítette, hogy a *HsCdc26* menekítette a *Drosophila Cdc26* mutáns letális fenotípusát, ami funkcionális konzerváltságot feltételez az emberi és *Drosophila Cdc26* között. Mivel a humán eredetű Cdc26-ról már korábban kimutatták, hogy a kapcsolódik az *Apc6* TPR alegységhez (Wang és

mtsai. 2009), feltételezhető, hogy ha a Cdc26 szerepe nagyrészt változatlan maradt az evolúció során, nagy valószínűséggel *Drosophilában* is az Apc6 kiegészítő alegységeként működik.

A Cdc26-like fehérjét kódoló gén mutációja nem eredményezett látható fenotípust. Túltermeltetve azonban menekítette a *Cdc26* mutánsok letális fenotípusát, így valószínűsíthető, hogy az APC/C alegységeként játszik szerepet. Koimmunprecipitációs kísérletekkel igazoltuk, hogy a Cdc26-like fizikailag is kölcsönhat az APC/C-vel, ami igazolja, hogy a Cdc26-al együtt részt vesz az APC/C szerkezeti egységének felépítésében. Expressziós mintázata azonban lényegesen eltér a Cdc26 és más APC/C alegységnél tapasztaltnál. A *Cdc26* és *mákos/Cdc27* gének expressziója hol erősebben, hol gyengébben, de az egyedfejlődés minden szakaszában kimutatható. A Cdc26-like ezzel szemben az adult nőstényben, ezen belül is az ováriumban expresszálódik. Ezen kívül a korai (0-2,5 órás) embriókban is nagy mennyiségű *Cdc26-like* mRNS-t mutattunk ki, ami valószínűleg anyai hatásnak köszönhető. A késői embriókban a *Cdc26-like* mRNS szintje drasztikusan lecsökken. A fehérjeszintű vizsgálataink is azt támasztják alá, hogy a Cdc26-like jelenléte leginkább az ováriumra és az embriókra korlátozódik. Elképzelhető, hogy Cdc26-like-nak az APC/C részeként szerepe van az embriók korai mitotikus aktivitásában, ennek felderítéséhez viszont további vizsgálatokra van szükség.

5.4. A legfontosabb eredmények összefoglalója

- Egy egyszerű és pontos ubikvitin mérési módszert adaptáltunk és optimalizáltunk *Drosophila* modellre.
- A teljes ubikvitintartalom továbbá a szabad és konjugált ubikvitin formák aránya is dinamikusan változik az egyedfejlődési stádiumokban és különböző szövetekben.
- A p54/Rpn10 proteaszómális ubikvitinreceptor funkcióvesztése ubikvitin akkumulációt eredményez, ami kiterjed a szabad és konjugált ubikvitinre is.
- Az Usp5 DUB funkcióvesztésével járó ubikvitin akkumulációt leginkább a szabad poliubikvitin láncok felhalmozódása okozza, míg a szabad ubikvitinkészlet enyhén csökken.
- Az Usp14 mutáns testiszben csökken a szabad monoubikvitin mennyisége.
- A Cdc26 és Cdc26-like az APC/C alegységei *Drosophilában*, expressziós mintázata eltérő, így elképzelhető, hogy az egyedfejlődés különböző szakaszaiban játszanak szerepet.

6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Deák Péternek, hogy kutatócsoportjában lehetőséget adott a dolgozatom elkészítéséhez szükséges genetikai és molekuláris biológiai ismeretek elsajátítására, illetve a munkám során adott tudományos és szakmai tanácsokat. Köszönöm Dr. Pál Margitnak és Dr. Kovács Leventének a sok-sok segítséget és hasznos tanácsot, melyek a megfelelő irányba tereltek munkám során. Köszönöm Dr. Udvardy Andornak és Dr. Lipinszki Zoltánnak a kísérletekben nyújtott segítséget és jó tanácsokat. Ezenkívül, szeretném megköszönni a családomnak, különösen a férjmemnek, Andrásinak Norbertnek a tanulmányaim során nyújtott támogatást.

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

7. BIBLIOGRÁFIA

- Abdul Rehman, S. A., Kristariyanto, Y. A., Choi, S. Y., ... Kulathu, Y. (2016). MINDY-1 Is a Member of an Evolutionarily Conserved and Structurally Distinct New Family of Deubiquitinating Enzymes. *Molecular Cell*, 63(1), 146–155.
- Alfieri, C., Chang, L., Zhang, Z., ... Barford, D. (2016). Molecular basis of APC/C regulation by the spindle assembly checkpoint. *Nature*, 536(7617), 431–436.
- Alfieri, C., Zhang, S., és Barford, D. (2017). Visualizing the complex functions and mechanisms of the anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C). *Open Biology*, 7(11). doi:10.1098/rsob.170204
- Amerik, A. Y., Swaminathan, S., Krantz, B. A., Wilkinson, K. D., és Hochstrasser, M. (1997). In vivo disassembly of free polyubiquitin chains by yeast Ubp14 modulates rates of protein degradation by the proteasome, 16(16), 4826–4838.
- Anderson, C., Crimmins, S., Wilson, J. A., Korbel, G. A., Ploegh, H. L., és Wilson, S. M. (2005). Loss of Usp14 results in reduced levels of ubiquitin in ataxia mice. *Journal of Neurochemistry*, 95(3), 724–731.
- Arama, E., Bader, M., Rieckhof, G. E., és Steller, H. (2007). A Ubiquitin Ligase Complex Regulates Caspase Activation During Sperm Differentiation in *Drosophila*. *PLoS Biology*, 5(10), e251.
- Barford, D. (2011). Structure, function and mechanism of the anaphase promoting complex (APC/C). *Quarterly Reviews of Biophysics*, 44. doi:10.1017/s0033583510000259
- Bateman, J. R., Lee, A. M., és Wu, C. T. (2006). Site-specific transformation of *Drosophila* via ϕ C31 integrase-mediated cassette exchange. *Genetics*, 173(2), 769–777.
- Bentley, A. M., Williams, B. C., Goldberg, M. L., és Andres, A. J. (2002). Phenotypic characterization of *Drosophila ida* mutants: defining the role of APC5 in cell cycle progression. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 5), 949–61.
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254.
- Branzei, D., és Szakal, B. (2016). DNA damage tolerance by recombination: Molecular pathways and DNA structures. *DNA repair*, 44, 68–75.
- Buszczak, M., Paterno, S., és Spradling, A. C. (2009). *Drosophila* stem cells share a common requirement for the histone H2B ubiquitin protease scrawny. *Science*, 323(5911), 248–251.

- Cabrera, H. L., Barrio, R., és Arribas, C. (1992). Structure and expression of the *Drosophila* ubiquitin-52-amino-acid fusion-protein gene. *The Biochemical Journal*, 286(1), 281–8.
- Calvo, M. N., Bartrons, R., Castaño, E., Perales, J. C., Navarro-Sabaté, A., és Manzano, A. (2006). PFKFB3 gene silencing decreases glycolysis, induces cell-cycle delay and inhibits anchorage-independent growth in HeLa cells. *FEBS Letters*, 580(13), 3308–3314.
- Chang, L., Zhang, Z., Yang, J., McLaughlin, S. H., és Barford, D. (2015). Atomic structure of the APC/C and its mechanism of protein ubiquitination. *Nature*, 522(7557), 450–454.
- Chen, D., Wang, Q., Huang, H., ... Chen, D. (2009). Effete-mediated degradation of Cyclin A is essential for the maintenance of germline stem cells in *Drosophila*. *Development*, 136(24), 4133–4142.
- Ciechanover, A. (1998). EMBO MEMBER ' S REVIEW The ubiquitin – proteasome pathway : on protein death and cell life. *EMBO Journal*, 17(24), 7151–7160.
- Ciechanover, A. (2015). The unravelling of the ubiquitin system. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(5), 322–324.
- Clague, M. J., Urbé, S., és Komander, D. (2019). Breaking the chains: deubiquitylating enzyme specificity begets function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1.
- Clark, A. G., Eisen, M. B., Smith, D. R., ... MacCallum, I. (2007). Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature*, 450(7167), 203–218.
- Collins, G. A., és Goldberg, A. L. (2017). The Logic of the 26S Proteasome. *Cell*, 169(5), 792–806.
- Cooper, E. M., Cutcliffe, C., Kristiansen, T. Z., Pandey, A., Pickart, C. M., és Cohen, R. E. (2009). K63-specific deubiquitination by two JAMM/MPN+ complexes: BRISC-associated Brcc36 and proteasomal Poh1. *The EMBO Journal*, 28(6), 621–631.
- Cope, G. A., Suh, G. S. B., Aravind, L., ... Deshaies, R. J. (2002). Role of Rpn11 Metalloprotease in Deubiquitination and Degradation by the 26S Proteasome. *Science*, 298, 611–615.
- Datta, A. B., Hura, G. L., és Wolberger, C. (2009). The Structure and Conformation of Lys63-Linked Tetraubiquitin. *Journal of Molecular Biology*, 392(5), 1117–1124.
- Dayal, S., Sparks, A., Jacob, J., Allende-Vega, N., Lane, D. P., és Saville, M. K. (2009). Suppression of the Deubiquitinating Enzyme USP5 Causes the Accumulation of Unanchored Polyubiquitin and the Activation of p53. *Journal of Biological Chemistry*, 284(8), 5030–5041.
- Deak, P., Donaldson, M., Glover, D. M., Frasch, M., és Glover, D. M. (2003). Mutations in

- mákos, a *Drosophila* gene encoding the Cdc27 subunit of the anaphase promoting complex, enhance centrosomal defects in polo and are suppressed by mutations in twins/aar, which encodes a regulatory subunit of PP2A. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 20), 4147–58.
- Deng, L., Wang, C., Spencer, E., ... Chen, Z. J. (2000). Activation of the I κ B Kinase Complex by TRAF6 Requires a Dimeric Ubiquitin-Conjugating Enzyme Complex and a Unique Polyubiquitin Chain. *Cell*, 103, 351–361.
- Dimova, N. V., Hathaway, N. A., Lee, B.-H., ... King, R. W. (2012). APC/C-mediated multiple monoubiquitylation provides an alternative degradation signal for cyclin B1. *Nature Cell Biology*, 14(2), 168–176.
- Dong, Y., Bogdanova, A., Habermann, B., Zachariae, W., és Ahringer, J. (2007). Identification of the *C. elegans* anaphase promoting complex subunit Cdc26 by phenotypic profiling and functional rescue in yeast. *BMC Developmental Biology*, 7(19).
- Duffy, J. B. (2002). GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis*, 34(1–2), 1–15.
- Eddins, M. J., Varadan, R., Fushman, D., Pickart, C. M., és Wolberger, C. (2007). Crystal Structure and Solution NMR Studies of Lys48-linked Tetraubiquitin at Neutral pH. *Journal of Molecular Biology*, 367(1), 204–211.
- Eguren, M., Machado, E., és Malumbres, M. (2011). Non-mitotic functions of the Anaphase-Promoting Complex. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 22(6), 572–578.
- Elsasser, S., Chandler-Militello, D., Müller, B., Hanna, J., és Finley, D. (2004). Rad23 and Rpn10 Serve as Alternative Ubiquitin Receptors for the Proteasome. *Journal of Biological Chemistry*, 279(26), 26817–26822.
- Emmerich, C. H., és Cohen, P. (2015). Optimising methods for the preservation, capture and identification of ubiquitin chains and ubiquitylated proteins by immunoblotting. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 466(1), 1–14.
- Faesen, A. C., Luna-Vargas, M. P. A., Geurink, P. P., ... Sixma, T. K. (2011). The differential modulation of USP activity by internal regulatory domains, interactors and eight ubiquitin chain types. *Chemistry and Biology*, 18(12), 1550–1561.
- Gilberto, S., és Peter, M. (2017). Dynamic ubiquitin signaling in cell cycle regulation. *The Journal of Cell Biology*, 216(8), 2259–2271.
- Gmachl, M., Gieffers, C., Podtelejnikov, A. V., Mann, M., és Peters, J.-M. (2002). The RING-H2 finger protein APC11 and the E2 enzyme UBC4 are sufficient to ubiquitinate

- substrates of the anaphase-promoting complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16), 8973–8978.
- Grice, G. L., Lobb, I. T., Weekes, M. P., Gygi, S. P., Antrobus, R., és Nathan, J. A. (2015). The proteasome distinguishes between heterotypic and homotypic lysine-11-Linked polyubiquitin chains. *Cell Reports*, 12(4), 545–553.
- Grice, G. L., és Nathan, J. A. (2016). The recognition of ubiquitinated proteins by the proteasome. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 73(18), 3497–506.
- Haracska, L., és Udvardy, A. (1997). Mapping the ubiquitin-binding domains in the p54 regulatory complex subunit of the *Drosophila* 26S protease. *FEBS Letters*, 412(2), 331–336.
- Hershko, A., és Ciechanover, A. (1998). THE UBIQUITIN SYSTEM. *Annual Review of Biochemistry*, 67(1), 425–479.
- Hershko, A., Heller, H., Elias, S., és Ciechanover, A. (1983). Components of Ubiquitin-Protein Ligase System. *The Journal of Biological Chemistry*, 258(13), 8206–8214.
- Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G.-L., Pyrowolakis, G., és Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*, 419(6903), 135–141.
- Homem, C. C. F., és Knoblich, J. A. (2012). *Drosophila* neuroblasts: a model for stem cell biology. *Development*, 139(23), 4297–4310.
- Horváth, J.K. (2009). Cdc26-szerű gének vizsgálata kizárólag muslicákra jellemző APC/C felépítésre utal. *MSc. Értekezés.*
- Hu, M., Li, P., Song, L., ... Shi, Y. (2005). Structure and mechanisms of the proteasome-associated deubiquitinating enzyme USP14. *EMBO Journal*, 24(21), 3747–3756.
- Huibregtse, J. M., Scheffner, M., Beaudenon, S., és Howley, P. M. (1995). A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(7), 2563–7.
- Inobe, T., és Matouschek, A. (2014). Paradigms of protein degradation by the proteasome. *Current Opinion in Structural Biology*, 24(1), 156–164.
- Izquierdo, M. (1994). Ubiquitin genes and ubiquitin protein location in polytene chromosomes of *Drosophila*. *Chromosoma*, 103(3), 193–197.
- Kaiser, S. E., Riley, B. E., Shaler, T. A., ... Kopito, R. R. (2011). Protein standard absolute quantification (PSAQ) method for the measurement of cellular ubiquitin pools. *Nature methods*, 8(8), 691–696.

- Kim, H. T., Kim, K. P., Lledias, F., ... Goldberg, A. L. (2007). Certain pairs of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) and ubiquitin-protein ligases (E3s) synthesize nondegradable forked ubiquitin chains containing all possible isopeptide linkages. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(24), 17375–86.
- Kim, H. T., Kim, K. P., Uchiki, T., Gygi, S. P., és Goldberg, A. L. (2009). S5a promotes protein degradation by blocking synthesis of nondegradable forked ubiquitin chains. *The EMBO Journal*, 28(13), 1867–1877.
- Kimura, Y., és Tanaka, K. (2010). Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis. *Journal of Biochemistry*, 147(6), 793–798.
- Kirilly, D., és Xie, T. (2007). The *Drosophila* ovary: an active stem cell community. *Cell Research*, 17(1), 15–25.
- Komander, D., Clague, M. J., és Urbé, S. (2009). Breaking the chains: Structure and function of the deubiquitinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(8), 550–563.
- Komander, D., Lord, C. J., Scheel, H., ... Barford, D. (2008). The Structure of the CYLD USP Domain Explains Its Specificity for Lys63-Linked Polyubiquitin and Reveals a Box Module. *Molecular Cell*, 29(4), 451–464.
- Komander, D., és Rape, M. (2012). The Ubiquitin Code. *Annual Review of Biochemistry*, 81(1), 203–229.
- Kovács, L. (2015, május 5). A DmUsp5 dezubikvitiláz fiziológiai funkciójának meghatározása *Drosophila melanogaster*ben. *Doktori dolgozat*, <http://doktori.bibl.u-szeged.hu/2603/>.
- Kovács, L., Nagy, Á., Pál, M., és Deák, P. (2019). Usp14 is required for spermatogenesis and ubiquitin stress responses in *Drosophila melanogaster*. *bioRxiv*, 724153.
- Kovács, L., Nagy, O., Pál, M., Udvardy, A., Popescu, O., és Deák, P. (2015). Role of the Deubiquitylating Enzyme DmUsp5 in Coupling Ubiquitin Equilibrium to Development and Apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *PLOS ONE*, 10(3), e0120875.
- Krishna, T. S. R., Fenyő, D., Kong, X. P., ... Kuriyan, J. (1994). Crystallization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) from *saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Biology*, 241(2), 265–268.
- Lee, H. S., Simon, J. A., és Lis, J. T. (1988). Structure and expression of ubiquitin genes of *Drosophila melanogaster*. *Molecular and cellular biology*, 8(11), 4727–35.
- Lee, K., és Myung, K. (2008). PCNA modifications for regulation of post-replication repair pathways. *Molecules and cells*, 26(1), 5–11.
- Lee, M. J., Lee, B.-H., Hanna, J., King, R. W., és Finley, D. (2011). Trimming of ubiquitin

- chains by proteasome-associated deubiquitinating enzymes. *Molecular és cellular proteomics*, 10(5), R110.003871.
- Leggett, D. S., Hanna, J., Borodovsky, A., ... Finley, D. (2002). Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function. *Molecular Cell*, 10(3), 495–507.
- Lilly, M. A., és Spradling, A. C. (1996). The *Drosophila* endocycle is controlled by Cyclin E and lacks a checkpoint ensuring S-phase completion. *Genes és development*, 10(19), 2514–26.
- Lipinszki, Z., Pál, M., Nagy, O., Deák, P., Hunyadi-Gulyas, E., és 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), 4833–4844.
- Lorick, K. L., Jensen, J. P., Fang, S., Ong, A. M., Hatakeyama, S., és Weissman, A. M. (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(20), 11364–9.
- Lu, C., Kim, J., és Fuller, M. T. (2013). The polyubiquitin gene Ubi-p63E is essential for male meiotic cell cycle progression and germ cell differentiation in *Drosophila*. *Development*, 140(17), 3522–31.
- Lu, Y., Lee, B., King, R. W., Finley, D., és Kirschner, M. W. (2015). Substrate degradation by the proteasome: a single-molecule kinetic analysis. *Science (New York, N.Y.)*, 348(6231), 1250834.
- Mabb, A. M., és Ehlers, M. D. (2010). Ubiquitination in Postsynaptic Function and Plasticity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 26(1), 179–210.
- Majka, J., és Burgers, P. M. J. (2004). The PCNA-RFC Families of DNA Clamps and Clamp Loaders. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 78, 227–260.
- Masuda, K., Chiyoda, T., Sugiyama, N., ... Kuninaka, S. (2015). LATS1 and LATS2 phosphorylate CDC26 to modulate assembly of the tetratricopeptide repeat subcomplex of APC/C. *PLoS ONE*, 10(2), 1–22.
- Matsumoto, M. L., Wickliffe, K. E., Dong, K. C., ... Dixit, V. M. (2010). K11-linked polyubiquitination in cell cycle control revealed by a K11 linkage-specific antibody. *Molecular Cell*, 39(3), 477–484.
- Mevissen, T. E. T., és Komander, D. (2017). Mechanisms of Deubiquitinase Specificity and Regulation. *Annual Review of Biochemistry*, 86(1), 159–192.
- Meza-Gutierrez, F., Simsek, D., Mizrak, A., ... Toczyski, D. P. (2018). Genetic Analysis

- Reveals Functions of Atypical Polyubiquitin Chains. *eLife*, 7, e42955.
- Nagy, O., Pál, M., Udvardy, A., ... 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(9).
- Narbonne-Reveau, K., Senger, S., Pal, M., ... Lilly, M. A. (2008). APC/CFzr/Cdh1 promotes cell cycle progression during the *Drosophila* endocycle. *Development*, 135(8), 1451–1461.
- Oh, C., Yoon, J. H., Park, S., és Yoo, Y. J. (2013). Simultaneous quantification of total and conjugated ubiquitin levels in a single immunoblot. *Analytical Biochemistry*, 443(2), 153–155.
- Ohtake, F., Saeki, Y., Ishido, S., Kanno, J., és Tanaka, K. (2016). The K48-K63 Branched Ubiquitin Chain Regulates NF- κ B Signaling. *Molecular Cell*, 64(2), 251–266.
- Ozkan, E., Yu, H., és Deisenhofer, J. (2005). Mechanistic insight into the allosteric activation of a ubiquitin-conjugating enzyme by RING-type ubiquitin ligases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(52), 18890–18895.
- Ozkaynak, E., Finley, D., Solomon, M. J., és Varshavsky, A. (1987). The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions. *The EMBO journal*, 6(5), 1429–39.
- Pál, M., Nagy, O., Ménesi, D., Udvardy, A., és Deák, P. (2007a). Structurally related TPR subunits contribute differently to the function of the anaphase-promoting complex in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Cell Science*, 120(Pt 18), 3238–48.
- Pál, M., Varga, K., Nagy, O., és Deák, P. (2007b). Characterization of the APC10/DOC1 subunit of the anaphase promoting complex in *Drosophila melanogaster*. *Acta Biologica Hungarica*, 58(Supplement 1), 51–64.
- Park, C.-W., és Ryu, K.-Y. (2014). Cellular ubiquitin pool dynamics and homeostasis. *BMB reports*, 47(9), 475–82.
- Parker, J. L., és Ulrich, H. D. (2009). Mechanistic analysis of PCNA poly-ubiquitylation by the ubiquitin protein ligases Rad18 and Rad5. *The EMBO Journal*, 28(23), 3657–3666.
- Paul, B. S., és Bownes, B. (1981). Staging the metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *Journal Embryology and Experimental Morphology*, 66(1967), 57–80.
- Peng, J., Schwartz, D., Elias, J. E., ... Gygi, S. P. (2003). A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nature Biotechnology*, 21(8), 921–926.
- Prakash, S., Tian, L., Ratliff, K. S., Lehotzky, R. E., és Matouschek, A. (2004). An unstructured initiation site is required for efficient proteasome-mediated degradation. *Nature Structural és Molecular Biology*, 11(9), 830–837.

- Qiao, R., Weissmann, F., Yamaguchi, M., ... Peters, J.-M. (2016). Mechanism of APC/C CDC20 activation by mitotic phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(19), E2570–E2578.
- Rahighi, S., Ikeda, F., Kawasaki, M., ... Dikic, I. (2009). Specific Recognition of Linear Ubiquitin Chains by NEMO Is Important for NF- κ B Activation. *Cell*, 136(6), 1098–1109.
- Ritorto, M. S., Ewan, R., Perez-Oliva, A. B., ... Trost, M. (2014). Screening of DUB activity and specificity by MALDI-TOF mass spectrometry. *Nature Communications*, 5(4763).
- Rumpf, S., Lee, S. B., Jan, L. Y., és Jan, Y. N. (2011). Neuronal remodeling and apoptosis require VCP-dependent degradation of the apoptosis inhibitor DIAP1. *Development*, 138(6), 1153–1160.
- Shabek, N., Herman-Bachinsky, Y., Buchsbaum, S., ... Ciechanover, A. (2012). The Size of the Proteasomal Substrate Determines Whether Its Degradation Will Be Mediated by Mono- or Polyubiquitylation. *Molecular Cell*, 48(1), 87–97.
- Shabek, N., Iwai, K., és Ciechanover, A. (2007). Ubiquitin is degraded by the ubiquitin system as a monomer and as part of its conjugated target. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 363(2), 425–431.
- Sivakumar, S., és Gorbsky, G. J. (2015). Spatiotemporal regulation of the anaphase-promoting complex in mitosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(2), 82–94.
- Skaug, B., Jiang, X., és Chen, Z. J. (2009). The Role of Ubiquitin in NF- κ B Regulatory Pathways. *Annual Review of Biochemistry*, 78(1), 769–796.
- Swatek, K. N., és Komander, D. (2016). Ubiquitin modifications. *Cell Research*, 26(4), 399–422.
- Szabó, Á., Papin, C., Cornu, D., ... Rouyer, F. (2018). Ubiquitylation Dynamics of the Clock Cell Proteome and TIMELESS during a Circadian Cycle. *Cell Reports*, 23(8), 2273–2282.
- Szlanka, T., Haracska, L., Kiss, I., ... Udvardy, A. (2003). Deletion of proteasomal subunit S5a/Rpn10/p54 causes lethality, multiple mitotic defects and overexpression of proteasomal genes in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Cell Science*, 116(6), 1023–1033.
- Takada, K., Hibi, N., Tsukada, Y., Shibasaki, T., és Ohkawa, K. (1996). Ability of ubiquitin radioimmunoassay to discriminate between monoubiquitin and multi-ubiquitin chains. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1290(3), 282–288.
- Takada, K., Nasu, H., Hibi, N., ... Yokosawa, H. (1995). Immunoassay for the quantification

- of intracellular multi-ubiquitin chains. *European Journal of Biochemistry*, 233(1), 42–47.
- Tang, Z., Li, B., Bharadwaj, R., ... Yu, H. (2001). APC2 Cullin Protein and APC11 RING Protein Comprise the Minimal Ubiquitin Ligase Module of the Anaphase-promoting Complex. *Molecular Biology of the Cell*, 12(12), 3839–3851.
- Thornton, B. R., és Toczyski, D. P. (2003). Securin and B-cyclin/CDK are the only essential targets of the APC. *Nature Cell Biology*, 5(12), 1090–1094.
- Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., ... Shi, Y. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *The EMBO Journal*, 19(1), 94–102.
- Verma, R., Aravind, L., Oania, R., ... Deshaies, R. J. (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science*, 298(5593), 611–615.
- Virdee, S., Kwasna, D., Ahel, I., ... Gibbs-Seymour, I. (2018). Discovery and Characterization of ZUFSP/ZUP1, a Distinct Deubiquitinase Class Important for Genome Stability. *Molecular Cell*, 70(1), 150-164.e6.
- Visintin, R., Prinz, S., és Amon, A. (1997). CDC20 and CDH1: A Family of Substrate-Specific Activators of APC-Dependent Proteolysis. *Science*, 278(5337), 460–463.
- Vølund, A. (1978). Application of the four-parameter logistic model to bioassay: comparison with slope ratio and parallel line models. *Biometrics*, 34(3), 357–65.
- Vujanovic, M., Krietsch, J., Raso, M. C., ... Lopes, M. (2017). Replication Fork Slowing and Reversal upon DNA Damage Require PCNA Polyubiquitination and ZRANB3 DNA Translocase Activity. *Molecular Cell*, 67(5), 882-890.e5.
- Walden, M., Masandi, S. K., Pawłowski, K., és Zeqiraj, E. (2018). Pseudo-DUBs as allosteric activators and molecular scaffolds of protein complexes. *Biochemical Society Transactions*, 46(2), 453–466.
- Wang, C.-H., Chen, G.-C., és Chien, C.-T. (2014). The deubiquitinase Leon/USP5 regulates ubiquitin homeostasis during *Drosophila* development. *Biochemical and biophysical research communications*, 452(3), 369–75.
- Wang, J., Dye, B. T., Rajashankar, K. R., Kurinov, I., és Schulman, B. A. (2009). Insights into anaphase promoting complex TPR subdomain assembly from a CDC26–APC6 structure. *Nature Structural és Molecular Biology*, 16(9), 987–989.
- Wang, Q., Young, P., és Walters, K. J. (2005). Structure of S5a bound to monoubiquitin provides a model for polyubiquitin recognition. *Journal of Molecular Biology*, 348(3), 727–739.

- Watson, E. R., Brown, N. G., Peters, J. M., Stark, H., és Schulman, B. A. (2019). Posing the APC/C E3 Ubiquitin Ligase to Orchestrate Cell Division. *Trends in Cell Biology*, 29(2), 117–134.
- Weissman, A. M., Shabek, N., és Ciechanover, A. (2011). The predator becomes the prey: regulating the ubiquitin system by ubiquitylation and degradation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(9), 605–620.
- Wertz, I. E., és Dixit, V. M. (2010). Signaling to NF-kappaB: regulation by ubiquitination. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(3), a003350.
- Wiborg, O., Pedersen, M. S., Wind, A., Berglund, L. E., Marcker, K. A., és Vuust, J. (1985). The human ubiquitin multigene family: some genes contain multiple directly repeated ubiquitin coding sequences. *The EMBO Journal*, 4(3), 755–759.
- Worden, E. J., Padovani, C., és Martin, A. (2014). Structure of the Rpn11–Rpn8 dimer reveals mechanisms of substrate deubiquitination during proteasomal degradation. *Nature Structural és Molecular Biology*, 21(3), 220–227.
- Wu, T., Merbl, Y., Huo, Y., Gallop, J. L., Tzur, A., és Kirschner, M. W. (2010). UBE2S drives elongation of K11-linked ubiquitin chains by the Anaphase-Promoting Complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(4), 1355–1360
- Yau, R., és Rape, M. (2016). The increasing complexity of the ubiquitin code. *Nature Cell Biology*, 18(6), 579–586.
- Ye, Y., Blaser, G., Horrocks, M. H., ... Komander, D. (2012). Ubiquitin chain conformation regulates recognition and activity of interacting proteins. *Nature*, 492(7428), 266–270.
- Zachariae, W., Shin, T. H., Galova, M., Obermaier, B., és Nasmyth, K. (1996). Identification of subunits of the anaphase-promoting complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 274(5290), 1201–4.
- Zhan, Z., Ding, Y., Zhao, R., ... Wang, W. (2012). Rapid Functional Divergence of a Newly Evolved Polyubiquitin Gene in *Drosophila* and Its Role in the Trade-off between Male Fecundity and Lifespan. *Molecular Biology and Evolution*, 29(5), 1407–1416.
- Zhang, S., Chang, L., Alfieri, C., ... Barford, D. (2016). Molecular mechanism of APC/C activation by mitotic phosphorylation. *Nature*, 533(7602), 260–264.
- Zuin, A., Isasa, M., és Crosas, B. (2014). Ubiquitin signaling: extreme conservation as a source of diversity. *Cells*, 3(3), 690–701.

8. ÖSSZEFOGLALÓ

A fehérjék ubikvitinációja fontos szerepet tölt be szinte valamennyi sejt folyamat szabályozásában. Az ubikvitináció során egy enzimkaszád ubikvitin monomereket, vagy poliubikvitin láncokat kapcsol kovalensen célfehérjékhez. Az ubikvitináció folyamata a dezubikvitináló enzimeknek (DUB-oknak) köszönhetően reverzibilis. A DUB-ok felszabadítják a fehérjékkel konjugált ubikvitin molekulákat, melyek így új ubikvitinációs reakciókban vehetnek részt. Az ubikvitináció és dezubikvitináció ellentétes reakcióinak következtében az ubikvitinmolekulák állandó körforgásban vannak a szabad monomer, illetve a fehérjékkel konjugált forma között. Az ubikvitin-egyensúly szabályozása igen összetett, melyben számos gén játszik szerepet. Annak érdekében, hogy vizsgálni tudjuk ezeknek a géneknek a pontos szerepét *Drosophila* modellben, egy olyan módszert alkalmaztunk, amellyel egyszerűen és pontosan mérhetjük az ubikvitinformák mennyiségi változásait. Mivel ezt a módszert eredetileg egérszövetekre dolgozták ki, ezért többszörösen módosítani kellett, hogy optimalizáljuk *Drosophilára*. A módszer Western blot kísérletek denzitometriás mérésén alapszik, melynek segítségével megállapítható a különböző szövetek szabad monoubikvitin és összubikvitin mennyisége, a kettő különbségéből pedig a konjugált ubikvitin-tartalom.

Először vad típusú ecetmuslicában mértük meg az ubikvitin formák változását az egyedfejlődés során, illetve lárva és adult szövetekben, így képet kaphattunk arról, hogy a metamorfózis milyen változásokkal járt az ubikvitin dinamikában. Eredményeink azt mutatják, hogy a szabad és konjugált ubikvitin aránya dinamikus változáson megy keresztül az egyedfejlődés folyamán. A nagy átrendeződési folyamatokat igénylő lárva-báb és báb-adult átmeneteknél a szabad monoubikvitin aránya jelentősen megemelkedett. Magas monoubikvitin arányt mértünk mitótikusan aktív agy, illetve ovárium és tesztisz mintákban is.

Az ubikvitin formák dinamikájának szabályozásában számos gén vesz részt, amelyek mutációi felborítják az ubikvitin homeosztázist. A mutánsok ubikvitinszintjében és az ubikvitin formák arányában történő mennyiségi változások mérésével közelebb kerülhetünk annak megértéséhez, hogy az egyes gének milyen szerepet tölthetnek be az ubikvitin rendszerben. Kísérleteink során a *p54/Rpn10*, *Usp5* és *Usp14* géneket vizsgáltuk. Az ubikvitinmérési módszerünkkel az eddiginél részletesebb képet kaptunk a vizsgált gének funkcióvesztésének hatásáról az ubikvitin-egyensúlyra. Méréseink szerint *p54/Rpn10* hiányában a teljes ubikvitinszint legalább a kétszeresére emelkedett, melyhez nagymértékben hozzájárult a szabad ubikvitin monomerek koncentrációjának lényeges növekedése is. Az *Usp5* DUB enzimről köztudott, hogy a proteaszóma szubsztrátokról lehasított szabad poliubikvitinláncok

feldolgozásában, ezáltal az ubikvitin-újrachasznosításában játszik szerepet. Az *Usp5* funkcióvesztése szintén kétszeres növekedést eredményezett a teljes ubikvitin mennyiségében. Ez a növekedés azonban kizárólag a szabad poliubikvitinláncok, illetve a konjugált ubikvitinek felhalmozódásának eredménye, ugyanis a monomerek szintjében enyhe csökkenés volt megfigyelhető.

Az *Usp14* enzim egy proteaszóma-asszociált DUB, amely a proteaszóma szubsztrátok láncvégi ubikvitinjeinek lehasításával járul hozzá a szabad ubikvitinkészlet fenntartásához. A *Drosophila Usp14* mutánsok lárvális és adult homogenizátumaiban nem találtunk eltérést az ubikvitinformák mennyiségét és arányát illetően, csupán a mutánsok testiszében volt kimutatható a szabad monoubikvitin koncentrációjának csökkenése, ami hímsterilitással járt együtt. Az *Usp14* fenotípusát lényegesen súlyosbította az ubikvitin testisz-specifikus *de novo* szintéziséért felelős *Ubi-p63E* gén hipomorf allélja. A két gén szinergisztikus kölcsönhatása arra utal, hogy együttesen játszhatnak szerepet a testisz szabad ubikvitinszintjének fenntartásában.

Munkám során az ubikvitin rendszert más megközelítésből is vizsgáltam. Az APC/C ubikvitinligáz kulcsszerepet játszik a mitózisban, illetve a G1 fázis fenntartásában a szabályozó fehérjék időzített lebontásával. Az APC/C legalább 13 evolúciósan konzervált alegységből áll. Ezek közül a legkisebb, de létfontosságú alegység a *Cdc26*, amelynek azonban *Drosophila* ortológját a *Drosophila* Genom Projektben nem azonosították. Szekvenciahomológia alapján csoportunkban sikerült azonosítani két lehetséges *Cdc26* fehérjét is, amelyek *Cdc26* és *Cdc26-like* jelölést kaptak. A két homológot kódoló gének közül csupán a *Cdc26* bizonyult létfontosságúnak, míg a *Cdc26-like* funkcióvesztése nem eredményezett látható fenotípust, viszont a fehérje túltermelése menekítette a *Cdc26* mutáns fenotípusát. A *Cdc26* és *Cdc26-like* aminosav-szekvenciáinak filogenetikai analízise rámutatott arra, hogy a két gén valamikor a *Drosophilidae* evolúció kezdetén jöhetett létre egy génduplikáció eredményeként. A humán CDC26 fehérje transzgenikus túltermelése menekítette a *Drosophila Cdc26* mutáns letális fenotípusát, amiből arra következtethetünk, hogy a *Drosophila Cdc26* funkcionális homológja a humán fehérjének. Koimmunprecipitációs kísérletekkel sikerült kimutatni a *Cdc26-like* és az APC/C kapcsolatát is. Ugyanakkor RT-PCR és Western blot kísérletek azt mutatják, hogy a két gén expressziója nem azonos: míg *Cdc26* az egyedfejlődés minden szakaszában kifejeződik, a *Cdc26-like* csupán az ováriumban és az embrióban van jelen detektálható mennyiségben. Elképzelhető, hogy mindkét alegység az APC/C felépítésében játszik szerepet, azonban az egyedfejlődés különböző szakaszaiban. További vizsgálatok szükségesek a két fehérje szerepének tisztázásához.

9. SUMMARY

Protein ubiquitination plays an important role in many, if not in all cellular processes. In this process, ubiquitin monomers or polyubiquitin chains are attached covalently to target proteins by an enzyme cascade. The ubiquitination can be reversed by deubiquitinating or DUB enzymes, which release the conjugated ubiquitin from the substrates. The released ubiquitin can be recycled in new reactions. Due to the opposing effect of ubiquitination and deubiquitination, ubiquitin molecules constantly cycle between their free monomeric and conjugated forms. Multiple genes play important roles in the maintenance and regulation of the ubiquitin pools. To examine the function of these genes we adapted a simple and reliable method to monitor quantitative changes in the different ubiquitin forms. This method was originally developed for mouse tissues, so we optimized it to *Drosophila* by changing the protocol at several steps. The method is based on densitometric analyses of Western blots that allowed the simultaneous quantification of free and total ubiquitin levels from protein extracts.

Using this approach, first we measured changes in the quantity and ratio of the ubiquitin forms during *Drosophila* development and in some larval and adult tissues. Our results show that ubiquitin levels and the ratio of the ubiquitin forms change dynamically in different developmental stages. At developmental transitions that require complex tissue remodeling, such as larval-pupal and pupal-adult transitions, the ratio of free monoubiquitins increased substantially. High monomer ratio could also be determined in mitotically active brain, ovary and testis tissues.

Regulation of ubiquitin dynamics require the involvement of many genes. Mutations of such genes disrupt the ubiquitin homeostasis, which generates measurable changes in the ubiquitin pools. Quantification of these changes can contribute to better understanding of how these genes regulate the ubiquitin system. In this study, we examined the effects of *p54/Rpn10*, *Usp5* and *Usp14* mutations to the ubiquitin equilibrium. Based on our measurements, the loss of *p54/Rpn10* function causes a minimum twofold increase in the total ubiquitin concentration, which includes the accumulation of both conjugated and free monoubiquitins. Though the loss of *Usp5* function also led to a two-fold increase in the total ubiquitin level, this was due to the accumulation of not only conjugated ubiquitins, but free polyubiquitin chains as well, while the monoubiquitin pool slightly decreased. This result is consistent with *in vitro* studies pointing to the main function of *Usp5* as being the disassembly of free polyubiquitin chains, most frequently liberated from ubiquitylated proteins just before proteasomal degradation.

Usp14 is a proteasome associated DUB that trims polyubiquitin chains of proteasome substrates by removing monomers from their distal tip. In larval and adult samples of *Usp14* mutants, we could not detect any change in ubiquitin content or ratio except in testes, decrease in the free monoubiquitin concentration only in the testis, which was accompanied with male sterility. The severity of the mutant phenotype increased substantially in double mutant combination with a hypomorph allele of the testis-specific *Ubi-p63E* polyubiquitin gene. This synergistic interaction of *Usp14* and *Ubi-p63E* implies that the two genes play a role jointly in the maintenance of the monoubiquitin pool in testes.

In my thesis work, I also examined the ubiquitination system from another perspective. The substrate specificity of ubiquitination relies on the last member of the ubiquitinating enzyme cascade, the E3 ubiquitin ligase. Several hundred E3 enzymes were identified in eukaryotes, and one of them, the anaphase promoting complex/cyclosome or APC/C plays key roles in mitosis and the maintenance of G1 phase by targeting regulator proteins to proteasomal degradation. The APC/C contains at least 13 evolutionary well-conserved subunits. The smallest, but still essential subunit, Cdc26, was not identified in the *Drosophila* Genome Project. Based on sequence homology, our group identified two putative Cdc26 homologues in *Drosophila*, and designated them as Cdc26 and Cdc26-like. Only one of the genes, *Cdc26* proved to be essential, while loss of function of *Cdc26-like* had no visible phenotype, but its overexpression complemented the lethal phenotype of *Cdc26* mutations. Phylogenetic analysis of Cdc26 and Cdc26-like amino acid sequences suggests that the two paralogues emerged at the beginning of *Drosophilidae* evolution, probably from a gene duplication event. In addition to this, I also demonstrated that transgenic overexpression of human *Cdc26* gene rescued the lethal phenotype of *Drosophila Cdc26* mutants. This result suggests that the *Drosophila Cdc26* is a functional homologue of the human protein. Coimmunoprecipitation experiments revealed physical link between Cdc26-like and the APC/C. However, the expression pattern of *Cdc26* and *Cdc26-like* differs: while *Cdc26* is expressed in all developmental stages, Cdc26-like mRNA and protein was present only in adult ovaries and embryos. It is plausible that both proteins serve as APC/C subunits, but in different developmental stages or tissues. More research is needed to find out the role of these proteins.

10. A DOLGOZAT 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209080>

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)

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.

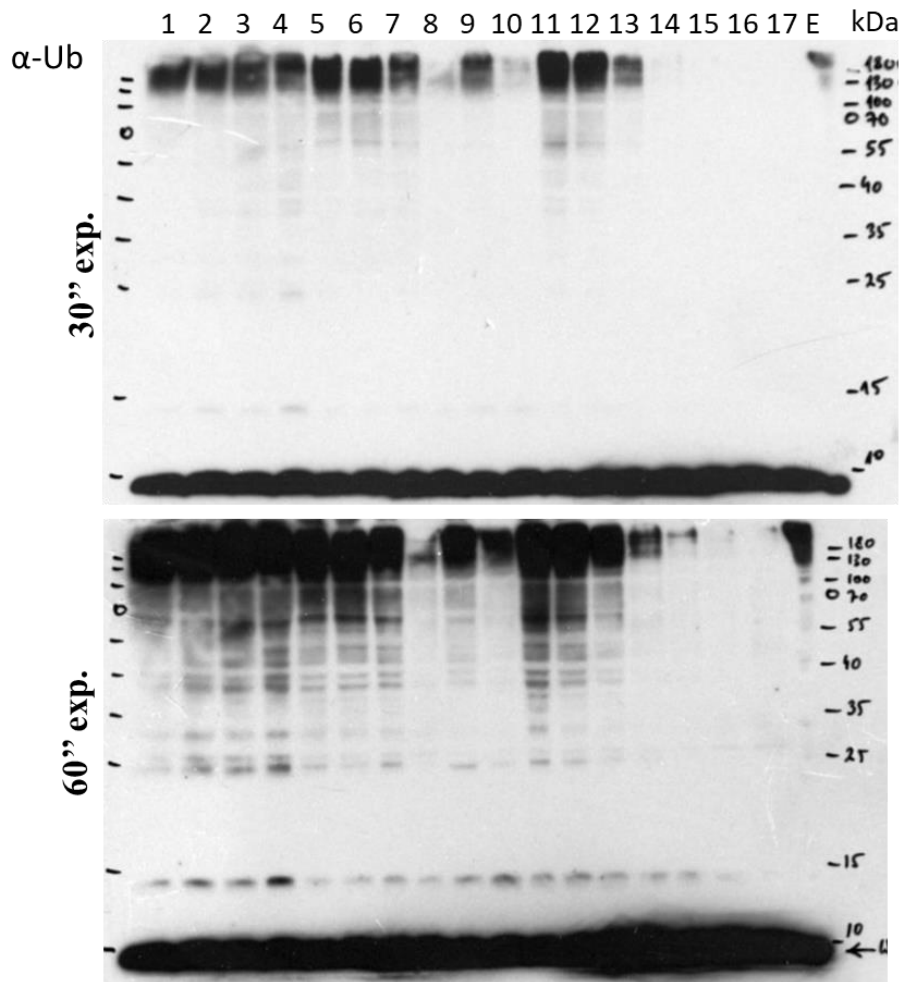
Nagy Á, Kovács L, Lipinszki Z, Pál M, Deák P. (2018). Developmental and tissue specific changes of ubiquitin forms in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*, 13(12): e0209080.

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

11. FÜGGELÉK



F1. Ábra Az ubikvitin mérési módszer optimalizálása ecetmuslicára. 1-8 minták: P5 bábok homogenizálása az ecetmuslica fiziológiájának megfelelő BI pufferben. 9-15: P5 bábok homogenizálása az ecetmuslica fiziológiájának megfelelő BI pufferben és inkubációja 25 °C. DUB inhibitorok tesztelése: 1- IAA/NEM – 0 min, 2- IAA/NEM – 2 h, 3- NEM – 0 min, 4- NEM – 2 h, 5- IAA – 0 min, 6- IAA – 2 h, 7- DUB inhibitor nélkül – 0 min, 8- DUB inhibitor nélkül – 2 h. A proteaszóma inhibitor és proteináz inhibitor koktél tesztelése: 9-Mg132 és PIC nélkül – 0 min, 10- Mg132 és PIC nélkül – 2 h. Inkubációs idő beállítása BII pufferben: 11- 0 min, 12- 15 min, 13- 30 min, 14- 60 min, 15- 90 min, 16- 120 min, 17- 260 min, E- embrió extraktum.

F1. táblázat A *Drosophila* egyedfejlődési stádiumokban és a szövetekben végzett mérések statisztikai elemzése egyszempontos ANOVA ($p < 0.05$) analízist követő SNK (Student–Newman–Keuls, $p < 0.05$) post hoc teszttel végeztük. Az azonos betűvel jelölt mintákban a mérési eredmények átlaga nem tért el szignifikánsan.

Minták	Teljes Ubikvitin	Szabad ubikvitin
Developmental stages		
E0-3	efg	de
E8-11	fg	de
E16-19	efg	e
L1	a	b
L2	cd	c
eL3	fg	de
vL3	de	de
P1	efg	cd
P4	c	c
P15	fg	de
hím0	ef	c
hím3	g	de
nőstény0	b	b
nőstény3	c	a
Tissues		
L3 agy	bc	b
L3 zsírtest	bc	bc
L3 nyálmirigy	c	c
tesztisz	b	b
petefészek	a	a
hím fej	bc	bc
hím test	bc	bc
nőstény fej	bc	bc
nőstény test	a	a

Az *ecetmuslica* Cdc26 (CG17343) és Cdc26-like (CG3457) fehérje szekvenciáinak összehasonítása

CG17343	MRRRELQTIQLKLSDLKEYEQAKMERLNRQQLLPRTPTPPSDSEVLPAATSSSVPVALL	60
CG3457	MLKRDQLKITLKLSDLKDYEVARQKNKLGAPRPRLSQDALPGDDASTSGTTA	53
	* : ** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
CG17343	ASGKNLDDDDAD-----KSE-PTTKPSTST-----	84
CG3457	SCSSNTEATETASGSGSGSGSGSGSGSYITGMGYRSETPSSASYTTSTTPTPATQEE	113
	: ... * : : :	
CG17343	-----	84
CG3457	ILRPSSAVTATTTTGTNSGSTDDVSVAAVVDLDTIDEISDDNWVDLNADTNDVTQP	173
CG17343	-----	84
CG3457	EEQDQLQVEVEEDGARGGV	192

A *Drosophilidae* családba tartozó fajok Cdc26 homológ szekvenciáinak összehasonlítása

virilis	MRRRELQTIQLKLSDLKEYEQAKLERAKARQQVPSRPTPTPSTSDIMLLPSSSVFTILL	60
grimshawi	MRRRELQTIQLKLSDLKEYEQAKLERAKARQQISSRPTPTPSSSDIMLLPSSSVPAILL	60
yakuba	MRRRELQTIQLKLSDLKEYEQAKMERLRSRQQLLPRTPTPPSDSEVLPAATSSSVPVALL	60
melanogaster	MRRRELQTIQLKLSDLKEYEQAKMERLNRQQLLPRTPTPPSDSEVLPAATSSSVPVALL	60
simulans	MRRRELQTIQLKLSDLKEYEQAKMERLRSRQQLLPRTPTPPSDSEVLPAATSSSVPVALL	60
erecta	MRRRELQTIQLKLSDLKEYEQAKMERLRSRQQLLPRTPTPPSDSEVLPAATSSSVPVALL	60
persimilis	MRRRELQTIQLKLSDLKEYEQAKLERIKTRQQVVTRPTPTPPSDNEVLAMPSTSVPAILL	60
	***** : *	
virilis	ANNSTNADDEAQPAGKDNAI----	80
grimshawi	ANNEVDADADDASSKDNAA-----	79
yakuba	ASGKSVNDDADRSEPTTKPSTST	84
melanogaster	ASGKNLDDDDADKSEPTTKPSTST	84
simulans	ASGKSLDDDDADKSEPTTKPSTST	84
erecta	ASGKNLDDDAEKSEPTTKPSTST	84
persimilis	ASGATEEEDACS--TTKPTSSM-	81
	* . . :	

A *Drosophilidae* családba tartozó fajok Cdc26-like homológ szekvenciáinak összehasonlítása

virilis	MLKRELQSIKLLSDLEEYAVRRRNKIKAAIEAGRSS-----SVTA	42
grimshawi	MLKRNLQRIHLTLADLEEYQALRRRNKLRATIDASRSSS-----SSVTA	44
persimilis	MLKRDLSITLKLSDLKEYDAKRLEHFKFNQR-PRHSVETITGDDASTSGTATSSFTA--	57
yakuba	MLKRDQLKITLKLSDLKDYEIARQKNKLNAPQPTLSQDGLTGDDASTSGTTASCSSNTE	60
erecta	MLKRDQLKITLKLSDLKDYEIARQKNKLGAPPRLSQDALTGDDASTSGTTASCSSNTE	60
melanogaster	MLKRDQLKITLKLSDLKDYEVARQKNKLGAPPRLSQDALPGDDASTSGTTASCSSNTE	60
simulans	MLKRDQLKITLKLSDLKDYEAARQKNKLGAPPRLSQDALTGDDASTSGTTASCSSNTE	60
	**** : *	
virilis	TATE-----TAPSTASDS--TSETPVTQRQM	66
grimshawi	TATE-----TAPSTDNS--TSETPVTQRHL	68
persimilis	-----GTCTETPSSGTPGTSTTPTLATQEDL	83
yakuba	TATETASGSLGLSGSGSGSGSGSGSYMTGMGYRSETPSSASYTTSTTPTPATQEEV	120
erecta	TATESASGSLGSLVSGSGSGSGSGSYITGMGYRSETPSSASYTTSTTPTPATQEEV	120
melanogaster	TATETASGSGS-----GSGSGSGSGSGSYITGMGYRSETPSSASYTTSTTPTPATQEEI	114
simulans	TATETASGSGS-----GSGSGSGSGSGSYITGMGYRSETPSSASYTTSTTPTPATQEEI	114
	: ** : : : * : * : * : * : *	
virilis	EDLPAAGWSTAVIVSSNTNSGSTEDDTSVAAVADDNDTIAELSDDGWVDIDE-----	119
grimshawi	EDLPAATGWATAVVTNSNTNSGSTEDDTSVAAVVDNDTIAELSDDGWVDIDE-----	121
persimilis	ADRSRPTSVAAATATTTNSGSTDDDI SVAAVADDNDTIDDFSDDNWVDLDADTNDAD-	142
yakuba	LRPS---SAVTATTTTGTNSGS-TDDVSVAAVVDLDTIDEISDDNWVDLNADTNDTVD	176
erecta	LRPS---SAVTATTTTGTNSGS-TDDVSVAAVVDLDTIDEISDDNWVDLNADTNDTVD	176
melanogaster	LRPS---SAVTATTTTGTNSGS-TDDVSVAAVVDLDTIDEISDDNWVDLNADTNDTVD	170
simulans	LRPS---SAVTATTTTGTNSGS-TDDVSVAAVVDLDTIDEISDDNWVDLNADTNDTVD	170
	: * . . . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
virilis	-----EDGARGGEP-----	128
grimshawi	-----EDGARGGEP-----	130
persimilis	-----EEGARGGA-----	150
yakuba	THQEEQEQLPEVEEEDGARGGA-----	201
erecta	THQEEQEQLPVAE---EEDGARGGALNADTNDTVDTPQEEQDQLQVEVEEDGARGGV	230
melanogaster	TQ---EEQDQLQVEVEEDGARGGV-----	192
simulans	TQ---EEQDQLQVEVEEDGARGGV-----	192

F2. ábra Cdc26 és Cdc26-like homológ aminosav szekvenciák összehasonlítása a *Drosophilidae* családban, Clustal Omega algoritmussal.