

**A DmUsp5 dezubikvtiláz fiziológiai funkciójának  
meghatározása *Drosophila melanogaster*ben**

Doktori értekezés

**Kovács Levente**

Témavezet : Dr. Deák Péter

SZTE TTIK Biológia Doktori Iskola

SZTE TTIK Genetikai Tanszék

MTA SZBK Biokémiai Intézet

Szeged, 2015

# TARTALOMJEGYZÉK

A DOLGOZAT ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNY .....	1
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	2
IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	4
1. Az ubikvitiláció mechanizmusa és jelentése.....	4
2. Az ubikvitiláció szerepe az apoptózis szabályozásában.....	6
3. A dezubikvitiláló enzimek .....	8
3.1 A dezubikvitiláló enzimek szerkezete .....	8
3.2. A dezubikvitiláló enzimek funkciói .....	11
3.3. A dezubikvitiláló enzimek szerepe az ubikvitin egyensúly fenntartásában.....	13
CÉLKITŰZÉSEK.....	16
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	18
1. Bioinformatikai módszerek.....	18
2. Felhasznált <i>Drosophila melanogaster</i> törzsek.....	18
3. Letálfázis meghatározás.....	19
4. Apoptotikus fenotípus vizsgálata szemben.....	20
5. Szemikvantitatív, reverz transzkripcióhoz kapcsolt PCR (RT-PCR).....	20
6. Kvantitatív valós idejű PCR (qPCR).....	21
7. Deléciós mutánsok elállítása P elem remobilizációval.....	22
8. Citológiai analízis.....	23
9. DmUsp5 túltermelés konstrukciók készítése .....	24
10. A heterológ menekítési kísérlet.....	25
11. Western blot kísérletek .....	25
12. Cikloheximid etetési teszt.....	25
EREDMÉNYEK.....	27
1. Dezubikvitiláló enzimek a <i>Drosophila</i> genomban .....	27
2. A <i>Drosophila</i> dezubikvitiláló enzimek elzetes jellemzése.....	29
3. A dezubikvitiláló enzimek szerepe apoptotikus fenotípusra.....	30
4. A <i>CG12082</i> gén funkciójának kiesése lárvaletalitást eredményez .....	32
5. A <i>CG12082</i> hiánya megemelkedett apoptózishoz vezet .....	34
6. A <i>CG12082</i> az Ubp14/USP5 funkcionális <i>Drosophila</i> ortológját kódolja.....	35

7. A DmUsp5 hiányában szabad és kötött poliubikvitin láncok halmozódnak fel és csökken a szabad monoubikvitinek mennyisége .....	37
8. A DmUsp5 hiánya a <i>DmUsp14</i> fokozott expresszójához és a proteaszóma alegységek túltermeléséhez vezet.....	39
9. A DmUsp5 mutánsok cikloheximid érzékenységet mutatnak .....	41
10. A <i>DmUsp5</i> mutánsokban aktiválódnak a proapoptotikus gének .....	42
11. A DIAP1 túltermeltetése részlegesen menekíti a DmUsp5 mutánsok letális és apoptotikus fenotípusát.....	44
EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA .....	46
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	53
IRODALOMJEGYZÉK.....	54
ÖSSZEFOGLALÓ.....	63
SUMMARY .....	67
MELLÉKLETEK.....	70

## **A DOLGOZAT ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNY**

Kovacs L, Nagy O, Pal M, Udvardy A, Popescu O, Deak P

Role of the Deubiquitylating Enzyme DmUsp5 in Coupling Ubiquitin Equilibrium to Development and Apoptosis in *Drosophila melanogaster*.

PLOS ONE 10:(3) Paper e0120875. (2015)

IF: 3.534

A cikk MTMT azonosítószáma: 2871663

A dolgozat alapjául szolgáló közlemény teljes terjedelmében a dolgozat végén mellékeltem.

## **SZÓBELI EL ADÁSOK AZ ALÁBBI KONFERENCIÁKON**

- Molekuláris Élettudományi Konferencia, Eger, 2015. március 27-29.
- Magyar Biokémiai Egyesület 2014. évi Vándorgy lése, Debrecen, 2014. augusztus 24-27.
- Szegedi Biológus Doktorandusz Konferencia 2014, Szeged, 2014. május 19-20.
- 23rd European *Drosophila* Research Conference, Barcelona, 2013. október 16-19.
- 13th FEBS Young Scientists Forum, Szentpétervár, 2013. július 3-5.
- MTA SZBK Straub-Napok, Szeged, 2012. május 23-24.
- International Training Course 2nd Alumni Conference, "Multidisciplinary Approaches to Biological Problems", Szeged, 2011. szeptember 1-3.
- IX. Magyar Genetikai Kongresszus és XVI. Sejt- és Fejl ésbiológiai Napok, Siófok, 2011. március 25-27.

## **POSZTER BEMUTATÓK AZ ALÁBBI KONFERENCIÁKON**

- Federation of European Biochemical Societies Congress (FEBS) 2013 "Mechanisms in Biology", Szentpétervár, 2013. július 6-11.
- MTA SZBK, Straub-Napok, Szeged, 2013. május 29-30.
- Molekuláris Élettudományi Konferencia, Siófok, 2013. április 5-7.
- FEBS3+ Meeting, "From molecules to life and back", Opatija, 2012. június 13-16.
- Magyar Biokémiai Társaság Éves Vándorgy lése, Pécs, 2011. augusztus 28- szeptember 3.
- Ubiquitin-Like Molecules in Disease Meeting, Cambridge, 2011. június 27.
- FEBS Advanced Lecture Course, Trends in Genetics: Genomic Instability and Pathways of Response, Jereván, 2011. február 20-26.

## **EGYÉBB KÖZLEMÉNY**

Lipinszki Z, Kovacs L, Deak P, Udvardy A

Ubiquitylation of *Drosophila* p54/Rpn10/S5a Regulates Its Interaction with the UBA-UBL Polyubiquitin Receptors

BIOCHEMISTRY 51:(12) pp. 2461-2470. (2012)

IF: 3.377

A cikk MTMT azonosítószáma: 2015348

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

- ANK** – az ubikvitin hidrofób foltjával kölcsönható motívum (ankyrin repeat)
- APC/C** – metafázis-anafázis átmenetet és a mitózisból való kilépést szabályozó ubikvitin-ligáz komplex (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome)
- BIR** – az apoptózist gátló fehérjékre jellemző evolúciósan konzerválódott domén (Baculovirus Inhibitory Repeat)
- BLAST** – aminosav, illetve nukleotid szekvenciák összehasonlítására szolgáló algoritmus (Basic Local Alignment Search Tool)
- CAP-Gly** – glicinekben gazdag domén, amely a sejtvázhoz kapcsolódó fehérjékben fordul elő (Cytoskeleton-associated proteins-glycine-rich domain)
- cDNS** – komplementer DNS, RNS szekvenciákról reverz transzkripcióval átírt DNS (complementary DNA)
- DAPI** – a DNS-hez kötődő fluoreszcens festék (4',6-diamidino-2-phenylindole)
- DIAP** – Drosophila apoptózist gátló fehérje (Drosophila inhibitor of apoptosis protein)
- DUB** – dezubikvitiláló enzim
- DUSP** – egyes ubikvitin specifikus proteázokra jellemző domén, a szubsztrátok felismerésében van szerepe (domain present in ubiquitin-specific proteases)
- E1** – ubikvitin-aktiváló enzim
- E2** – ubikvitin-konjugáló enzim
- E3** – ubikvitin-ligáz
- E4** – ubikvitin-lánc elongációs faktor
- ELISA** – enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay)
- FLAG** – fehérjékhez fuzionáltatva, azok megjelölésére alkalmas oktapeptid
- GAL4** – transzkripció aktivátor fehérje élesztőben, az UAS szekvenciához kötődik
- GFP** – zöld fluoreszcens fehérje (Green Fluorescent Protein)
- H2A** – egyik hiszton fehérje típus
- HECT** – egyes ubikvitin-ligázokra jellemző domén (Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus)
- HRP** – tormaperoxidáz (horseradish-peroxidase)
- IAP** – apoptózist gátló fehérjék (inhibitor of apoptosis proteins)
- IBM** – a kaspázokra jellemző motívum (IAP Binding Motif)
- JAMM** – a dezubikvitiláló enzimek cink tartalmú metalloproteáz alosztálya (JAB1/MPN/Mov34 metalloenzyme)
- K** – a lizin aminosav egybetűs nemzetközi kódja
- kDa** – a molekulatömeg mértékegysége (kilo-Dalton)
- MATH** – oligomerizációt elősegítő domén (meprin and TRAF homology domain)
- MIT** – a sejten belüli szállításban résztvevő fehérjékben azonosított domén
- Mit-Mem** – a mitokondriumok megfelelő osztódásáért felelős domén
- MJD** – Machado-Joseph Disease domént tartalmazó proteázok, a dezubikvitiláló enzimek egyik alosztálya
- OTU** – ovariális tumor domént tartalmazó proteázok, a dezubikvitiláló enzimek egyik alosztálya

**PAGE** – poliakrilamid gélelektroforézis

**PCR** – polimeráz-lánreakció, nukleotid szekvenciák sokszorozására alkalmas módszer

**pUAST** – Drosophila expressziós vektor, fehérjék transzgénikus túltermeltetésére alkalmas

**PVDF** – fehérjék megkötésére használatos membrán (polivinilidín-fluorid)

**qPCR** – kvantitatív, valós idejű polimeráz-lánreakció, génexpresszió vizsgálatára alkalmas módszer

**RHG** – Drosophila proapoptotikus fehérjék összefoglaló neve (Reaper, Hid, Grim)

**RING** – egyes ubikvitin ligázokra jellemző cink-ujj motívum (Really Interesting New Gene)

**RT-PCR** – reverz transzkripcióhoz kapcsolt polimeráz-lánreakció, génexpresszió vizsgálatára alkalmas módszer

**SCF** – a sejtciklus szabályozásában fontos szerepet játszó ubikvitin-ligáz komplex (Skp, Cullin, F-box containing complex)

**SDS** – anionos detergens (sodium-dodecyl-sulphate)

**UAS** – enhancer analóg az élesztőben, a GAL4 transzkripció aktivátor fehérje kötőhelye (Upstream Activating Sequence)

**UBA** – ubikvitinnel asszociáló domén (Ubiquitin-Associated domain)

**UBL** – ubikvitin-szerű domén (Ubiquitin-like domain)

**UBX** – az ubikvitinációs útvonal egyes komponenseiben azonosított domén

**UCH** – ubikvitin C-terminális hidrolázok, a dezubikvitiláló enzimek egyik alosztálya

**UIM** – ubikvitinnel kölcsönható motívum (Ubiquitin Interacting Motif)

**USP** – ubikvitin specifikus proteázok, a dezubikvitiláló enzimek egyik alosztálya

**VDRC** – a bécsi Drosophila RNS-interferencia törzsközpont

**WD40** – olyan kb. 40 aminosavból álló ismétlődő motívum, amely triptofán-aszparaginsav (W-D) dipeptidre végződik, fehérjekomplexek összeszereléséhez szükséges

**ZnF-C2H2** – cink-ujj domén, amely a DNS nagy árkáéhoz kötődik

**ZnF-RANBP2** – elsősorban egy Ran kötő fehérjében (Ran binding protein 2) azonosított cink-ujj domén, a sejtmag és a citoplazma közötti szállításban van szerepe, a Ran-al hat kölcsön

**ZnF-UBP** – UBP (Ubiquitin Binding Protein) típusú cink-ujj domén, a szabad poliubikvitin láncok megkötését végzi.

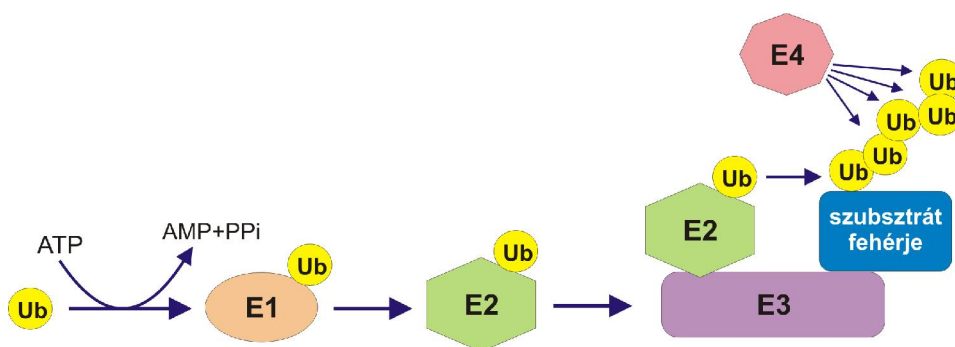
# IRODALMI ÁTTEKINTÉS

## 1. Az ubikvitiláció mechanizmusa és jelentősége

A fehérjék posztszintetikus módosításának több típusa ismert. Olyan dinamikus módosítások, mint az acetiláció és a foszforiláció befolyásolhatják egyes fehérjék enzimikus aktivitását, sejten belüli elhelyezkedését, más molekulákkal történő kölcsönhatását. Az utóbbi évtizedekben a posztszintetikus fehérjemódosítással kapcsolatos ismeretek egy újabb taggal bővültek, az ubikvitiláció mechanizmusával.

Az ubikvitiláció során a szubsztrátfehérjéhez egy ubikvitin molekula vagy több ubikvitinből álló poliubikvitin lánc kapcsolódik kovalens kötéssel. Az ubikvitin egy 76 aminosavból álló, 8 kDa tömegű polipeptid, amelynek C-terminális glicin (Gly76) oldallánca izopeptid kötéssel kapcsolódhat a szubsztrátfehérje vagy egy másik ubikvitin lizin (K) aminosav-oldalláncához (Pickart, 2001). Ha egyetlen ubikvitin monomer kapcsolódik a célfehérje valamelyik lizinjére, akkor azt monoubikvitilációnak nevezzük. Multiubikvitilációról akkor beszélünk, ha a célfehérje több lizinje is monoubikvitilálódik. Poliubikvitilációnak nevezzük azt a folyamatot, amikor az első ubikvitinen keresztül további ubikvitinek kapcsolódnak, és egy úgynevezett poliubikvitin láncot hoznak létre. Az ubikvitinek hét belső lizint tartalmaznak, ezeken keresztül K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63 kapcsolódású poliubikvitin láncok alakulhatnak ki (Komander és Rape, 2012).

Az ubikvitinek egymáshoz, illetve a szubsztrátfehérjéhez történő kapcsolását egy specializált enzimkaszád végzi (1. ábra).



**1. ábra Az ubikvitiláció mechanizmusa.** Az ubikvitin-aktiváló enzim (E1) ATP felhasználásával aktiválja az ubikvitint, majd továbbadja egy ubikvitin-konjugáló enzimnek (E2). Az ubikvitin áthelyezését a szubsztrátfehérjére az ubikvitin-ligáz (E3) katalizálja. Egyes fajokban az ubikvitin-lánc elongációs faktor (E4) is részt vesz a megfelelő méretű poliubikvitin láncok kialakításában.

Első lépésként az ubikvitint az E1, vagy ubikvitin-aktiváló enzim ATP és  $Mg^{2+}$  jelenlétében aktiválja, miközben az ubikvitin, egy tioészter kötéson keresztül, az E1 enzimhez kötődik. Ezt követően az E2 ubikvitin-konjugáló enzim átveszi az ubikvitint, ugyancsak egy

tióészter kötést létesítve vele. A harmadik lépésben az E3 ubikvitin-ligáz kölcsönhatásba lép mind az aktivált ubikvitint hordozó E2-vel, mind pedig a szubsztrátfehérjével, és egy izopeptid kötés kialakulását katalizálja a célfehérje valamely kitüntetett lizinjének -aminocsoportja és az ubikvitin C-terminális Gly76 karboxil-csoportja között (Hochstrasser, 1996). Mivel az E3 ubikvitin-ligáz ismeri fel és köti meg a szubsztrátfehérjéket, ez határozza meg a folyamat specifitását. Erre utal az a tény is, hogy amíg E1 enzimekből általában csak egy vagy kettő van egy adott fajban, és E2-ből is csupán néhány tucat, addig az E3 ubikvitin ligázok száma több százra tehető. Ezek a legváltozatosabb komponensei az ubikvitiláló kaszkádnak és többségük csak egy-egy szubsztrátcsoporthoz felelős. Az E3 enzimek szerkezetük és működésük szempontjából három csoportba sorolhatóak: 1. A HECT-domént tartalmazó ligázok közvetlenül építik rá az E2-től átvett ubikvitineket a célfehérjére. 2. A RING finger (Really Interesting New Gene) domént tartalmazó ligázok közvetetten, egyfajta platformként vesznek részt az ubikvitilációban. Lehetnének tesztelők, hogy az E2 és a szubsztrát az ubikvitilációhoz szükséges térbeli helyzetet vegyen fel, de maga nem alakítja ki a kötést az ubikvitinnel. 3. A több alegységből felépülő, nagyméretű E3 ligáz komplexek, mint például az SCF és az APC/C.

A nemrég felfedezett E4 ubikvitin-lánc elongációs faktorokat az ubikvitiláló enzimkaszkád negyedik komponenseként írták le. Ezek egyes fajokban a megfelelő méretű poliubikvitin láncok összeszerelését segítik, de általános elterjedésük nem bizonyított. A poliubikvitin láncok típusa, elágazódása meghatározza a szubsztrátfehérje további sorsát. A K11 és K48 lizinjeik által kapcsolódó poliubikvitin láncok a célfehérjét a 26S proteaszóma általi lebontásra ítélik, ezért fontos szerepet játszanak a fehérjék féléletidejének szabályozásában (Hersko és Ciechanover, 1998). A K63 típusú poliubikvitin láncok általában fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakítását segítik elő, ezáltal a jelátviteli utak szabályozásában nélkülözhetetlenek (Skaug és Mtsai, 2009).

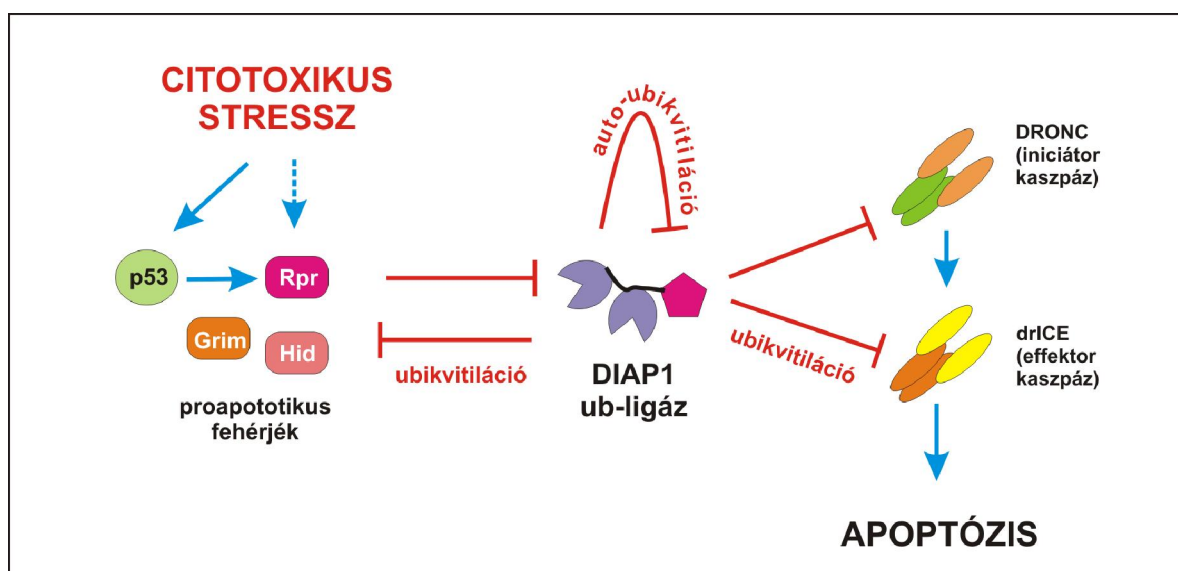
A monoubikvitiláció általában konformációváltozást eredményez, ami például az ubikvitiláció-függő protein kinázok esetében megváltoztathatja aktivitásukat (Chen és Mtsai, 1996) vagy a hisztonok esetében a kromatin szerkezetet és a transzkripciót befolyásolja (Muratani és Tansey, 2003). Az ubikvitiláció olyan alapvető sejtbiológiai folyamatokban játszik szerepet, mint például a génexpresszió szabályozása, fehérjelebontás, enzimaktivitás szabályozása, vagy különböző jelátviteli utak működésének modulálása (Pickart és Eddins, 2004). Szerepe nélkülözhetetlen a sejtciklus (Reed, 2006; Mocciaro és Rape, 2012) és a programozott sejthalál (apoptózis) szabályozásában is (Bader és Steller, 2009).



## 2. Az ubikvitiláció szerepe az apoptózis szabályozásában

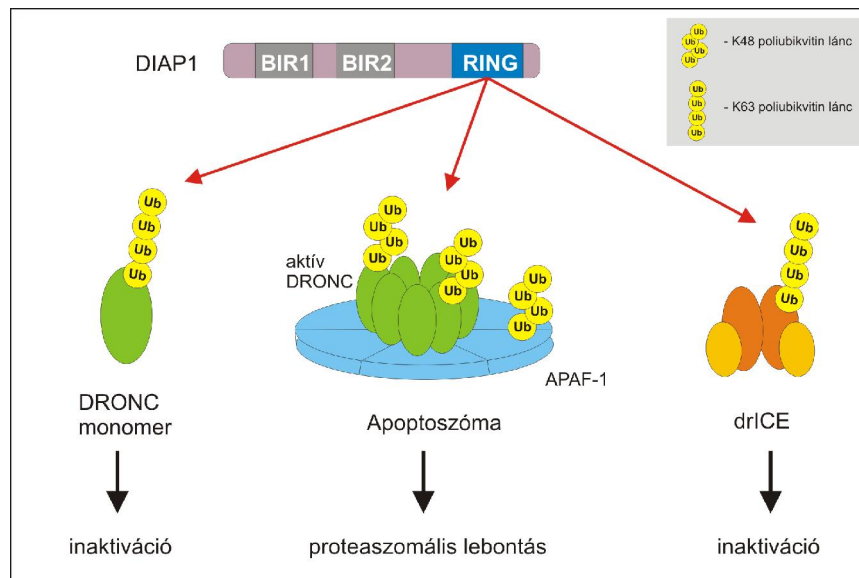
A soksejt szervezetek egyedfejlésének egyik kulcsfontosságú eleme az apoptózis (Steller, 1995). A szövetek kialakításán és homeosztázisának fenntartásán kívül a virális fertőzések elleni védekezésben, az autoimmun reakciók és a rákos burjánzások megakadályozásában is nélkülözhetetlen szerepet játszik ez a folyamat (Thompson, 1995). Az apoptotikus jelátviteli út végpontján a kaszpázok aktiválása áll. A kaszpázok a cisztein proteázok családjába tartoznak. Inaktív zimogén formában képződnek, majd auto- és transzstimulációs mechanizmusok sorozata aktiválja őket. Funkciójuk alapján két csoportba sorolhatók: az iniciátor kaszpázok és az effektor, vagy végrehajtó kaszpázok. Az aktivált iniciátor kaszpázok hasítják az effektor kaszpázok inaktív zimogénjeit. Az effektor kaszpázok szubsztrátjai olyan strukturális és szabályozó fehérjék, amelyek hasítása az apoptózisra jellemző molekuláris és sejt szerkezetbeli változásokat eredményezi. Ilyenek például a laminok, az  $\alpha$ - és a  $\beta$ -aktin, a tubulinok, a kateninek stb. (Fischer és Tsai, 2003).

Mivel csaknem minden eukarióta sejt folyamatosan termeli az apoptotikus jelátviteli út komponenseit, egy precízen szabályozható mechanizmusnak kellett kifejlesztenie a kaszpázok féken tartására, a nem kívánt apoptózis elkerülésére. Az utóbbi évtized munkáinak eredményeként bizonyosságot nyert, hogy a programozott sejt halál szabályozásában kulcsszerepe van az ubikvitilációnak. Az apoptózis kulcsregulátorai az apoptózist gátló fehérjék, az IAP-ok (inhibitor of apoptosis proteins) maguk is E3 ubikvitin-ligázok (Vaux és Silke, 2005). Ubikvitilációval szabályozzák az anti- és proapoptotikus fehérjék szintjét és aktivitását, beleértve önmaguk aktivitását is (2. ábra).



2. ábra Az apoptózis szabályozásának egyszerű sített vázlatja *Drosophilában* (Hay és Gou, 2006 alapján). A DIAP1 (*Drosophila* IAP1) ubikvitilálja az iniciátor és effektor kaszpázokat, valamint a proapoptotikus IAP inhibitorokat. Citotoxikus stressz hatására a proapoptotikus fehérjék túlsúlyba kerülnek, a DIAP1 autoubikvitilálódik és a gátlás alól felszabaduló kaszpáz kaszkád indukálja az apoptózist.

Az IAP-ok fő szubsztrátjai a kaszpázok, amelyeket az evolúciósan konzerválódott BIR (Baculovirus Inhibitory Repeat) doménjükkel kötnek meg (Takahashi és mtsai, 1998). A humán XIAP, cIAP1 és cIAP2 három, míg a *Drosophila* DIAP1 két BIR domént tartalmaz (Bader és Steller, 2009). A BIR domének kölcsönhatnak az kaszpázok IBM (IAP Binding Motif) motívumával. Ismert, hogy bizonyos esetekben a BIR domén kötése önmagában elég a kaszpáz inaktiválásához. Erre példa a humán XIAP, melynek BIR doménje úgy kötődik a kaszpáz-3 illetve a kaszpáz-7 felületéhez, hogy hozzáférhetetlenné teszi azok szubsztrátkötő zsebét (Riedl és mtsai, 2001; Suzuki és mtsai, 2001). Azonban a legtöbb esetben a megkötött kaszpázokat az IAP-ok RING doménjükkel ubikvitilálják (Wilson és mtsai, 2002). A kaszpázok IAP-függő ubikvitilációja mind degradatív, mind nem degradatív módon gátolja az apoptózis indukcióját (3. ábra).



**3. ábra** A DIAP1-függő ubikvitiláció hatása a kaszpázok aktivitására (Broemer és Meier, 2009 alapján). A *Drosophila* IAP (DIAP1) általi ubikvitiláció mind az iniciátor DRONC, mind az effektor drICE kaszpáz esetében nem degradatív inaktivációhoz vezet. A már aktív kaszpázokat tartalmazó apoptoszóma komplex ubikvitilálása annak proteasomális lebontásához vezet.

A legalaposabban tanulmányozott *Drosophila* IAP-ról, a DIAP1-ről ismert, hogy az iniciátor DRONC kaszpáz monomerjeit ubikvitilálva, azokat inaktív állapotban tartja, de ez nem vezet a DRONC monomerek proteasomális degradációjához (Wilson és mtsai, 2002). Proteasomális degradációhoz vezet viszont annak a DRONC-nak az ubikvitilációja, amely aktiválódva az APAF-1-el asszociál és az apoptoszóma komplexet hozza létre. A DIAP1 az apoptoszóma APAF-1 komponensét is ubikvitilálja, amely szintén annak proteasomális lebontásához vezet. A DIAP1 tehát K48 típusú degradatív ubikvitilációval gátolja a spontán apoptoszóma-képződést apoptotikus szignál hiányában (Shapiro és mtsai, 2008). A kaszpáz-3 és kaszpáz-7 effektor kaszpázok *Drosophila* ortológja, a drICE, nem degradatív ubikvitiláció

révén inaktiválódik. A DIAP1 által létrehozott K63 típusú poliubikvitin lánc térben úgy helyezkedik el, hogy eltakarja a drICE katalitikus zsebét annak szubsztrátjai el l (Ditzel és mtsai, 2008). Még nem tisztázott az a mechanizmus, amely eldönti, hogy a DIAP1 mikor kapcsol degradatív K48- és mikor nem degradatív, K63-típusú poliubikvitin láncot szubsztrátjaira.

Apoptotikus szignálok hatására, például amikor valamilyen citotoxikus stressz éri a sejteket, az IAP-ok kaspáz-gátló hatása megsz nik. Ez a proapoptotikus IAP gátló fehérjék révén valósul meg. Drosophilában a legismertebb IAP gátlók a Reaper, a Hid és a Grim (összefoglaló néven RHG) fehérjék (Bader és Steller, 2009). Az RHG fehérjéknek a kaspázokéhoz hasonló IBM doménjük van, amelyen keresztül köt ndnek a DIAP1 BIR doménjeihez. Apoptotikus jel hatására megn ezeknek a fehérjéknek az expressziója, és a nagy mennyiség RHG kompetitíven gátolja a DIAP1 kaspáz-köt kapacitását. Azon kívül, hogy a kaspázokat leszorítják a DIAP1-r l, a RHG-k köt dése olyan konformációváltozást idéz el a DIAP1 szerkezetében, amely annak degradatív auto-ubikvitilációjához vezet (Hays és mtsai, 2002; Ryoo és mtsai, 2002). Ennek a folyamatnak az eredménye a kaspázok felszabadulása és a sejthalál folyamatainak elindítása az aktiválódott kaspáz kaszkád által.

Láthatjuk, hogy az apoptózist szabályozó mechanizmusok vázlatos áttekintésekor is tetten érhet az ubikvitiláció központi szerepe. Ismert azonban, hogy a fehérjék aktivitása és stabilitása nem csak az egyik irányban, az ubikvitinek célfehérjékre kapcsolásával szabályozódik, hanem jelent s szerepe van az ellentétes reakciónak, a dezubikvitilációnak is. Ezt a folyamatot az úgynevezett dezubikvitiláló enzimek katalizálják.

### **3. A dezubikvitiláló enzimek**

A fehérjék posztszintetikus módosításának egyik tulajdonsága, hogy a legtöbb esetben reverzibilis. Nincs ez másként az ubikvitilációval sem. Az egymáshoz vagy a szubsztráthoz izopeptid kötéssel kapcsolódó ubikvitineket a proteázok osztályába tartozó dezubikvitiláló enzimek, vagy DUB-ok távolítják el. Ezen kívül az ubikvitin-szintézis során fúziós fehérjék keletkeznek és ezek hasításával képz ndnek az aktív ubikvitinek. Tehát ehhez a folyamathoz is DUB-okra van szükség.

#### **3.1 A dezubikvitiláló enzimek szerkezete**

A dezubikvitiláló enzimekre el ször az ubikvitilált H2A hiszton vizsgálata során bukkantak rá. Matsui és munkatársai megfigyelték, hogy több faj (éleszt , csirke, karmosbéka és szarvasmarha) sejtextraktuma tartalmaz egy olyan enzimet, amely hasítja a H2A és az

ubikvitin közti izopeptid kötést. Ezt a 38 kDa tömegű enzimét izopeptidáznak nevezték el (Matsui és mtsai, 1982). Ezt követően több kutatócsoport szűréseket végzett olyan enzimek azonosítására, amelyek az ubikvitinnel fuzionált peptideket vagy az ubikvitin-etil-észtereket hidrolizálják. Ezzel a módszerrel tucatnyi dezubikvitiláló enzimét azonosították és jellemeztek élesztőben és emlősökben (Harvey és mtsai, 1989; Mayer és Wilkinson, 1989; Wilkinson és mtsai, 1989). A rákövetkező évtizedben sorra izoláltak és jellemeztek egyedi DUB-okat, majd a genom projektek befejezése élesztőben és emberben is lehetővé tette ezeknek az enzimeknek a szisztematikus azonosítását, elemzését és csoportosítását (Amerik és mtsai, 2000; Nijman és mtsai, 2005).

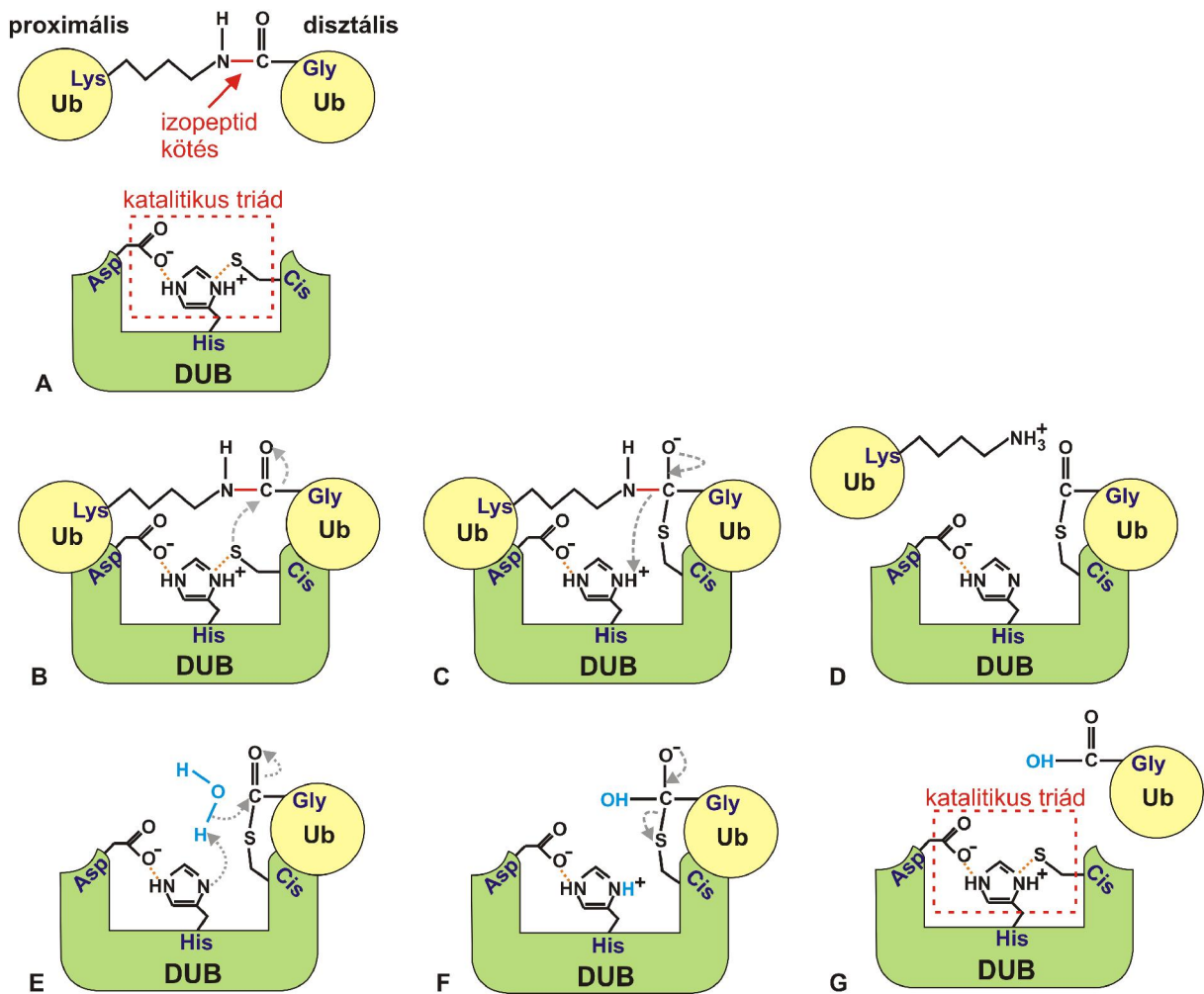
Enzimatisma kötésük szempontjából a DUB-okat két csoportra osztják. Túlnyomó többségük papain típusú cisztein proteáz, amelyekre egy reaktív ciszteint tartalmazó katalitikus diád vagy triád jellemző. Kiseb hányaduk metalloproteáz, amelyek aktív centrumában egy cink ion van. A cink ion közreműködésével aktivált vízmolekula felelős az ubikvitin láncok hidrolíziséért.

A konzervált katalitikus doménjük szerkezete alapján a cisztein proteáz típusú DUB-ok további négy alosztályba sorolhatóak: ubikvitin specifikus proteázok (USP), ubikvitin C-terminális hidrolázok (UCH), ovárium tumor domént tartalmazó proteázok (OTU) és a Machado-Joseph Disease domént hordozó proteázok (MJD).

A 91 eddig azonosított humán DUB több mint fele, 56 az USP alosztályba sorolható, és szerkezetüket és a funkciójukat tekintve a legváltozatosabb enzimeket felsorakoztató alosztály. Ahogy az E3 ubikvitin-ligázok száma nőtt az evolúció során, hasonlóan emelkedett az USP-k száma is. A jelenség a két enzimtípus koevolúciót eredményező funkcionális kapcsolatra utal (Semple és mtsai, 2003, Nijman és mtsai, 2005).

Az USP-k katalitikus doménjében két jól definiálható és konzervált motívum van, egy cisztein (Cys) és egy hisztidin (His) kazetta, amelyek a katalízishez nélkülözhetetlen aminosavakat foglalják magukba. Az enzimatisma aktivitást a cisztein tiol csoportja biztosítja. A cisztein deprotonálását a térben közel elhelyezkedő hisztidin segíti elő, amelyet egy szomszédos aszparaginsav polarizál. Ez a három aminosav alkotja a katalitikus triádot (4. ábra, A). A katalízis során a cisztein tiolcsoportja nukleofil támadást intéz az ubikvitin és a célfehérje, illetve két ubikvitin közötti peptidkötés karbonil csoportja ellen (4. ábra, B). A reakció során egy negatív töltésű, instabil, tetrahedrális közti termék képződik, amelyet a katalitikus cisztein és egy aszparagin által alkotott oxianion zseb stabilizál (4. ábra, C). A hisztidin imidazol oldalláncának hatására a tetrahedrális közti termék összeomlik, egy acil-enzim közti termék képződik, miközben a proximális ubikvitin vagy a szubsztrát fehérje

felszabadul (4. ábra, D). A visszamaradt acil-enzim közti termékkel egy vízmolekula reagál (4. ábra, E), amely újabb instabil tetrahedrális közti terméket eredményez (4. ábra, F). Az újabb köztitermék disszociációja végül a disztális ubikvitin és az aktív enzim felszabadulásához vezet (4. ábra, G) (Clague és mtsai, 2013). A katalitikus cisztein és hisztidin kazetták által határolt fehérjerészlet az USP domén. A két motívum által közrefogott szekvencia hossza azonban enzimenként 300 és 800 aminosav között változik, és szabályozó szerepet tulajdonítanak neki.



**4. ábra Egy USP hasítási mechanizmusának sematikus ábrázolása** (Clague és mtsai, 2013 alapján). (A) Egy USP alosztályba tartozó DUB (zöld) katalitikus triádjának molekuláris szerkezete (piros keret). Az egyszer ség kedvéért itt a DUB szubsztrátja egy izopeptid kötéssel (piros vonal) kapcsolódó diubikvitin (sárga). (B) A katalitikus cisztein deprotonált tiol csoportja nukleofil támadást intéz a karbonil csoport ellen. (C) Egy negatív töltés tetrahedrális köztitermék jön létre. Az O<sup>-</sup> az oxianon zsebben helyezkedik el, amelyet hidrogénkötések stabilizálnak (nincs feltüntetve). (D) A hisztidin imidazol oldallánca mediálja a tetrahedrális köztitermék hasítását. A proximális ubikvitin felszabadul és egy acil-enzim köztitermék jön létre. (E) Egy vízmolekula támadja az acil-enzim köztiterméket. (F) Egy újabb negatív töltés instabil köztitermék jön létre. (G) A köztitermék bomlásának eredményeként felszabadul a disztális ubikvitin és visszaáll a katalitikus triád eredeti szerkezete.

Az USP doménon kívül az USP-k többsége egyéb funkcionális domént is tartalmaz. Gyakran el fordulnak például az UBP típusú cink-ujj domének (ZnF-UBP), illetve az ubikvitinnel asszociáló (UBA) domének, amelyek az ubikvitinek megkötéséért felel esek (Hurley és mtsai, 2006). Az USP-k meglep en nagy gyakorisággal tartalmaznak ubikvitin-szer (UBL) doméneket, amelyek feltehetően ezeknek az enzimeknek a szubsztrátspecificitását szabályozzák (Zhu és mtsai, 2007).

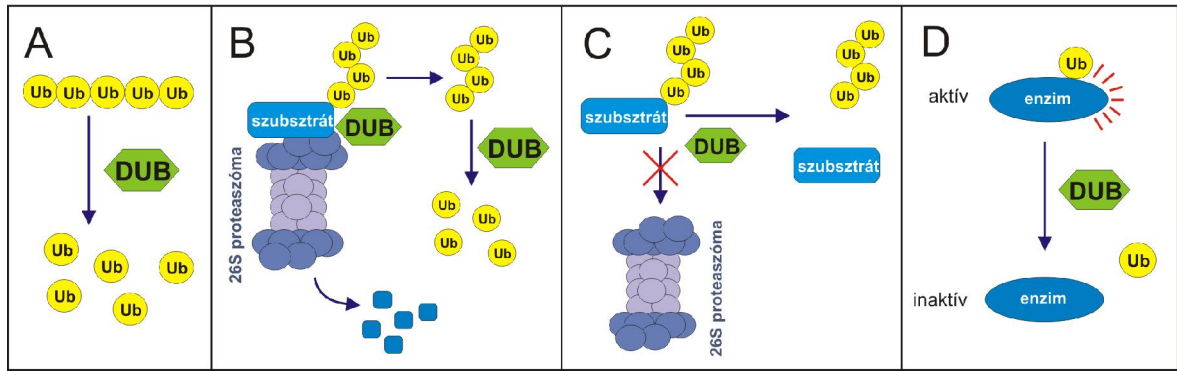
Az USP alosztályhoz képest lényegesen kevesebb képvisel je van a többi cisztein proteáz DUB alosztálynak. Az UCH, MJD és OTU alosztály tagjai kevésbé változatosak mind szerkezetük, mind funkciójuk tekintetében. Katalitikus doménjük az USP domént l els sorban a katalitikus ciszteint és hisztidint polarizáló és stabilizáló aminosavakban különbözik. Az UCH alosztály esetében a katalitikus triád megegyezik az USP-kével, de az oxianion zseb kialakításában az aszparagin helyett egy glutamin vesz részt. Az MJD katalitikus doménben szintén glutamin játszik szerepet az oxianion zseb alkotásában, illetve a katalitikus triádban aszparaginsav helyett aszparagin van. Az OTU domén kristályszerkezetének meghatározása kiderítette, hogy a többi cisztein protetáztól eltér en ebben az esetben a katalitikus triád nem teljes, a stabilizálását kitüntetett aminosavak helyett egy hidrogénköt hálózat teszi lehetővé (Nanao és mtsai, 2004; Nijman és mtsai, 2005).

A cisztein proteázokkal ellentétben a JAMM domént tartalmazó metalloproteázok egy  $Zn^{2+}$  ionhoz kötött, polarizált vízmolekula segítségével hoznak létre nem kovalens köztiterméket a szubsztráttal. A  $Zn^{2+}$  ion stabilizálását egy aszparaginsav és két hisztidin végzi (Ambroggio és mtsai, 2004). Ezek az aminosavak konzerváltak a JAMM doménon belül és ezt felhasználva azonosíthatóak az ebbe az alosztályba tartozó DUB-ok.

A dezubikvitiláló enzimek változatos szerkezete lehetővé teszi, hogy az ubikvitilációval kapcsolatos sokféle folyamatot befolyásolják, az ubikvitin-ubikvitin illetve az ubikvitin-szubsztrát kötések hasításával pozitív vagy negatív irányba tereljék azokat.

### **3.2. A dezubikvitiláló enzimek funkciói**

Az utóbbi évtized intenzív kutatásai az ubikvitin jelátvitel számos pontján feltárták a dezubikvitiláló enzimek funkcióját. A kialakult kép azt mutatja, hogy az ubikvitilációhoz szükséges szabad monoubikvitinek szintézisét l, az ubikvitinek újrahasznosításán át a fehérjék féléletidejének és aktivitásának szabályozásáig mindenhol szükség van DUB-okra (5. ábra).



**5. ábra A dezubikvitiláló enzimek funkcióinak összefoglalása.** A DUB-ok szerepet játszanak az ubikvitin szintézisben, a frissen szintetizált lineáris ubikvitin fúziókat processzálják (A). A DUB-ok nélkülözhetetlenek az ubikvitinek újrahasonosításához (B). A DUB-ok a fehérjék féleletidejét befolyásolhatják azáltal, hogy eltávolítják a degradatív poliubikvitin szignált (C). A DUB-ok egyes enzimek aktivitását modulálják (D). (sárga: ubikvitin; kék: szubsztrát fehérje; szürke: a 26S proteaszóma; zöld: DUB).

Az ubikvitinek a riboszomális fehérjékhez fuzionálva vagy lineáris poliubikvitin láncokként szintetizálódnak (Finley és mtsai, 1987; Finley és mtsai, 1989; Redman és Rechsteiner, 1989). Ezeknek a fuzionált poliubikvitineknek a processzálását DUB-ok végzik (5. ábra, A). Az ubikvitin C-terminális hidrolázok (UCH) specifikusan kötik a lineáris ubikvitin fúziókat és az egyes ubikvitinek C-terminálisánál hidrolizálva felszabadítják az ubikvitin monomereket (Larsen és mtsai, 1998).

A poliubikvitilált fehérjék proteaszomális degradációja a kovalensen kötött ubikvitinek degradációját is eredményezheti. Ezt kivédend, a proteaszóma regulátor komplexének DUB aktivitású alegységei még a lebontás előtt eltávolítják a poliubikvitin láncokat a megkötött szubsztrátról (5. ábra, B). Három proteaszómához kötődő dezubikvitiláló enzim ismert. Az Rpn11 és az UCH37 állandó proteaszóma alegységek, míg az Usp14 átmenetileg kötődik a proteaszómához az UBL doménjén keresztül (Koulich és mtsai, 2008). A poliubikvitin láncok eltávolításért az Rpn11 metalloproteáz felelős. Ez a DUB a szubsztrátfehérje lizinje és proximális ubikvitin C-terminálisa közötti kötést hasítja, és egyben távolítja el a poliubikvitin láncokat (Yao és Cohen, 2002). A felszabaduló poliubikvitin láncokat további DUB-ok szabdalják monomerekre. Az UCH37 és az Usp14 a proteaszómához kötődő szubsztrát poliubikvitin láncának disztális végéről egyenként távolítják el az ubikvitinek (Hu és mtsai, 2005; Koulich és mtsai, 2008). Az ubikvitinek eltávolítása a degradációra ítélt fehérjékről lehet végezni az ubikvitinek újrahasonosítását, ami jelentősen hozzájárul a sejt szabad ubikvitin-készletének szinten tartásához.

A proteaszomális fehérjelebontás alapvetően befolyásolja a fehérjék stabilitását. Számos olyan példa ismert, amelyben a DUB-ok úgy interferálnak ezzel a folyamattal, hogy még a proteaszómához érkezésük előtt eltávolítják a poliubikvitin láncokat a szubsztrát

fehérjékre, amivel megnövelik az adott fehérjék féléletidejét (5. ábra, C). Ilyen például a p53 tumorszupresszor szabályozása. Normális körülmények között a p53 féléletideje rövid, mivel az MDM2 ubikvitin-ligáz degradatív módon poliubikvitilálja. A p53 stabilizálásához az USP7/HAUSP DUB szükséges, amely kölcsönhat a p53-al és dezubikvitilálja, miáltal megelzi annak proteasomális lebontását (Li és mtsai, 2002). Egy másik példa a DNS hibajavításban szerepet játszó BRCA2 mennyiségének szabályozása. Az USP11 egy több alegységbe álló fehérjekomplex révén kölcsönhat a BRCA2-vel és azt dezubikvitilálva fokozza annak stabilitását (Schoenfeld és mtsai, 2004).

A proteasomális fehérjelebontáson túl az ubikvitiláció egyes enzimek aktivitását is szabályozza. A szubsztrát fehérjék lizinjeinek monoubikvitilációja nem degradatív jel és aktiválja például a Ras jelátviteli utat, vagy a DNS hibajavítás egyes lépéseit. A dezubikvitiláló enzimek ezekben a jelátviteli utakban negatív regulátorok, mivel eltávolítják az aktiváló monoubikvitineket (5. ábra, D). Jó példa az élesztő Ubp3, amely a Ras jelátviteli utat gátolja azáltal, hogy dezubikvitilálja az Ira2 RasGAP faktort (Li és Wang, 2013).

### **3.3. A dezubikvitiláló enzimek szerepe az ubikvitin egyensúly fenntartásában**

Mivel még az ubikvitin szintézishez is DUB-okra van szükség (Larsen és mtsai, 1998), jelentős szerepük lehet a sejtek ubikvitin készletének biztosításában. Néhány recens kísérleti adat arra utal, hogy a hozzáférhető szabad monoubikvitinek mennyisége limitált, és csak kisebb hányadát képezik a sejt teljes ubikvitin állományának (Kaiser és mtsai, 2011; Oh és mtsai, 2013). Néhány élesztő DUB-ról kimutatták, hogy a hiányuk hatással van az ubikvitin monomerek mennyiségére (Amerik és mtsai, 2000; Kimura és mtsai, 2009). A proteasomához asszociáló Ubp6 hiányában csökken a hozzáférhető szabad ubikvitinek koncentrációja. Az Ubp6 DUB-nak különösen akkor nagy a jelentősége, ha a sejtben valamilyen okból kevés a szabad ubikvitin, azaz úgynevezett ubikvitin stressz lép fel. Ekkor az Ubp6 expressziója megemelkedik, lassítja a proteasomális fehérjedegradáció sebességét, a disztális ubikvitineket eltávolítva próbálja kompenzálni az ubikvitin deficitet (Hanna és mtsai, 2006; Hanna és mtsai, 2007). Az Ubp6-hoz hasonlóan, egy másik élesztő DUB, a Doa4 hiánya is csökkenti a monoubikvitinek mennyiségét. A Doa4 elsősorban az endocitotikus membránokhoz kötött fehérjékre hat, lehasítja az ubikvitineket, és a szabad poliubikvitin láncok jelentős részét is monomerekre bontja (Dupré és Haguenaer-Tsapis, 2001; Kimura és mtsai, 2009).

A hisztonok monoubikvitilációjának eddig elsősorban a transzkripció szabályozásában és a kromatin átrendezésében tulajdonítottak jelentőséget (Osley és mtsai, 2006). Dantuma



és munkatársai megfigyelték, hogy ubikvitin stressz esetén, például proteaszóma gátlószerekkel történő kezelést követően a hisztonokhoz kötött ubikvitinek mobilizálódnak, és a citoplazmába vándorolnak, miáltal hozzáférhetővé válnak az ubikvitilációs folyamatok számára (Dantuma és mtsai, 2006). Valószínű, hogy ubikvitin stresszkor is a dezubikvitiláló enzimek távolítják el a hisztonokról az ubikvitineket. Feltételezhető, hogy a sejtekben egyensúlyi állapot van a szabad és a konjugált ubikvitinek között, amely fenntartásában nélkülözhetetlen szerepük lehet a DUB-oknak. A folyamat részletes mechanizmusa, illetve az abban résztvevő dezubikvitiláló enzimek kevésbé ismertek. A sejtben rendelkezésre álló, limitált szabad ubikvitinért olyan folyamatok versengenek, mint az irányított fehérje degradáció, a transzkripció szabályozása, vagy az apoptózis. Nem teljesen tisztázott, hogy az ubikvitiláció által szigorúan szabályozott folyamatokra hogyan hat az ubikvitin egyensúly felbomlása, például azáltal, hogy olyan DUB-ok funkciója sérül, amelyeknek szerepe lehet a folyamatban.

Munkánk során azonosítottuk a *Drosophila* DUB-okat és elvégeztük az egyes genetikai jellemzésüket. Az egyes jellemzést követően olyan DUB-ok vizsgálatára koncentráltunk, amelyek hiányában fokozott apoptózis történik. Hét DUB gént azonosítottunk, amelyek szemspecifikus csendesítése apoptotikus fenotípust eredményezett. Az egyik a *CG12082* gén volt. Erről a génről már 2014-ben megjelent egy közlemény, amelyben leírják, hogy a *CG12082* hiánya a szemdiszkszokban apoptózishoz vezet (Fan X és mtsai, 2014). A *CG12082* génről heterológ menekítési kísérlettel megállapítottuk, hogy az élleszt *Ubp14* és az emberi *USP5* ortológját kódolja, és *DmUsp5*-nek neveztük. Az élleszt *Ubp14*-ről és a emberi *USP5*-ről ismert, hogy a proteaszomális fehérjelebontás után visszamaradó szabad poliubikvitin láncokat bontják ubikvitin monomerekké (Amerik és mtsai, 1997; Dayal és mtsai, 2009). Egy recens közleményben a emberi *USP5*-ről leírták, hogy HeLa sejtvonalakban a kettős szálú DNS törések hatékony kijavításához nélkülözhetetlen (Nakajima és mtsai, 2014). A *DmUsp5* funkciójának részletes analizéséhez deléciós mutánsokat állítottunk elő. A *DmUsp5* deléciós mutánsai vándorló harmadik stádiumú lárvaként elpusztultak, agyukban és imágokorongjaikban apoptotikus sejtek halmozódtak fel. Kimutattunk, hogy a *DmUsp5* mutánsokban felhalmozódnak az szabad és a kötött poliubikvitinek, illetve a monoubikvitin készlet kimerül. A monoubikvitin készlet kimerülése ubikvitin stresszhez vezet. A *DmUsp5* mutánsokban az ubikvitin stressz a *DmUsp14* expressziójának megemelkedése és a cikloheximid érzékenység bizonyította. Megállapítottuk, hogy a *DmUsp5* mutánsokban több proapoptotikus gén aktiválódik és a *DIAP1* inaktiválódik. Az apoptotikus kaszkád beindulását feltehetően az váltja ki, hogy a *DmUsp5* hiányában az ubikvitin homeosztázis felborul.

A dolgozatomban készítése közben megjelent egy közlemény, amely szintén a DmUsp5 szerepét vizsgálta a *Drosophila* egyedfejlésében (Wang és mtsai, 2014). A szerzők megállapították, hogy a DmUsp5 nélkülözhetetlen az egyedfejléshez, hiányában szabad és kötött poliubikvitinek halmozódnak fel valamint megemelkedik a proteasóma alegységek expressziója, amely összecseng mi eredményeinkkel. A tapasztalt fenotípusokat ez a közlemény is az ubikvitin homeosztázis felborulásának tulajdonítja, de nem vizsgálták az ubikvitin stresszt és az apoptózist. Wang és munkatársainak, illetve a mi munkánknak az összehasonlítására az Eredmények megvitatása fejezetben térek ki.

## CÉLKIT ZÉSEK

Az ubikvitin-függő jelátviteli folyamatok az ubikvitiláció és a dezubikvitiláció egyensúlyán keresztül valósulnak meg. Az utóbbi pár évtizedben kutatások sorozata vizsgálta az ubikvitilációt, viszont a dezubikvitiláció és az azt katalizáló DUB-ok csak nemrég kerültek az érdeklődés középpontjába. Noha ennek az enzimosztálynak számos tagját azonosították és biokémiaiailag jellemezték mind élesztőben, mind humán sejtekben, keveset tudunk konkrét élettani jelentőségükről. Remélhető, hogy soksejtű intakt modellszervezeteken végzett kutatások közelebb visznek szerepük kiderítéséhez. A közelmúltban az Usp14 és az Ataxin-3 DUB-ok esetében egérmodellben kimutatták, hogy szerepük van az idegsejtek normális működésének szabályozásában (Chen és mtsai, 2011; Neves-Carvalho, 2015). Egyes DUB-okat már jellemezték *Drosophila* modellben is (Chen és mtsai, 2002; Zhao és mtsai, 2008; Mukai és mtsai, 2010; Scheuermann és mtsai, 2010). Munkám kezdetekor, 2012-ben még nem történt meg az összes potenciális DUB-ra kiterjedő szisztematikus genetikai analízis *Drosophilában*. A különféle fajokból származó dezubikvitiláló enzimek szekvenciáinak hasonlósága azt mutatja, hogy az ubikvitilációs enzimkaszád tagjaihoz hasonlóan a DUB-ok többsége is evolúciósan konzervált élesztőtől az emberig. A DUB-ok szisztematikus funkcionális vizsgálata olyan többsejtű modellorganizmusban, mint a *Drosophila melanogaster* hozzájárulhat ennek a DUB-ok jobb megértéséhez, funkcionális jelentőségük feltárásához.

A *Drosophila melanogaster*, vagy ecetmuslica egy 109 éves laboratóriumi modellfaj, jól kezelhető és igen közkedvelt a genetikusok körében. Széles genetikai eszköztára lehetővé teszi a gének mutációinak hatékony elállítását. A mutánsok fenotípusa könnyen vizsgálható, amiből következtethetünk az ép gének funkciójára, a genetikai interakciókból pedig a folyamatokban résztvevő molekulák kapcsolataira, és szerepére. Az ecetmuslicában lehetőség van a gének célzott sejt- és szövetspecifikus csendesítésére, transzgenikus muslicák készítésére, a fehérjék túltermelésére.

A genetikai analízisen túl az ecetmuslicában lehetőség van például a sejtciklus és az apoptózis résztvevőinek sejtbiológiai módszerekkel történő tanulmányozására. Imaginális szöveteik diploid sejtjei lárva korban folyamatosan osztódnak, és ha a folyamat zavart szenved, a változás mikroszkópos és immunhisztokémiai módszerekkel könnyen detektálható, vizsgálható.

A *Drosophila* genomprojektnek köszönhetően az *ecetmuslica* teljes genomszekvenciája ismert, és hozzáférhető. Bioinformatikai módszerekkel lehet segítség van bármely fehérje *ecetmuslica* ortológját azonosítani, és a fent említett technikákkal vizsgálni azok élettani jelentőségét egy soksejtű modellorganizmusban.

A csoportunkban folyó kutatások egyik célja a dezubikvitiláló enzimek azonosítása és genetikai analízise az *ecetmuslicában*. A potenciális DUB-okat kódoló gének szisztematikus csendesítésével, valamint funkcióvesztéses mutánsainak vizsgálatával igyekszünk azonosítani az egyedfejlésben szerepet játszó DUB-okat. Ezt követően funkcionális szerekekkel kívánunk fényt deríteni a DUB-ok szerepére az ubikvitin-függő folyamatok szabályozásában. Az egyik általam vizsgálni kívánt folyamat az apoptózis. Az apoptózisról ismert, hogy számos pontján szabályozódik ubikvitilációval (Broemer és Meier, 2009). Ésszerű feltételeznünk, hogy a dezubikvitiláló enzimeknek is szerepe lehet az apoptózis szabályozásában. Célom az apoptózisban szerepet játszó DUB-ok azonosítása, illetve érdekes apoptotikus fenotípust mutató DUB-ok szerepének meghatározása az alábbi lépéseken keresztül:

1. Dezubikvitiláló enzimeket kódoló gének azonosítása *Drosophilában* már ismert élesztő és humán DUB szekvenciák alapján, bioinformatikai módszerekkel.
2. Az azonosított *Drosophila* DUB-ok elzetes jellemzése RNS interferenciával és mutánsokkal. A feladat magába foglalja a génexpresszió vizsgálatát, a letálfázisok meghatározását.
3. A DUB-ok szereke az apoptózisban játszott potenciális szerepükre, úgy, hogy szemspecifikus géncsendesítést követően vizsgálom a szemfenotípust.
4. A különösen érdekes szemfenotípust mutató gén(ek) részletesebb funkcionális vizsgálata:
  - allélsorok készítése
  - az apoptózis vizsgálata mikroszkópos és immunhisztokémiai technikákkal
  - apoptotikus gének expressziójának vizsgálata RT-PCR-rel
  - funkcionális homológia vizsgálata heterológ menekítési kísérlettel
  - az ubikvitin háztartás vizsgálata Western blot analízissel

# ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

## 1. Bioinformatikai módszerek

A *Drosophila* dezubikvitiláló enzimek azonosítása során már ismert éleszt és humán DUB-ok szekvenciáját használtuk kiindulási pontnak, amelyeket Amerik és munkatársai illetve Nijman és munkatársai jelentettek meg összefoglaló közleményt (Amerik és mtsai, 2000; Nijman és msai, 2005). A homológia sz rés során a Flybase, NCBI és UniProt adatbázisokban található szekvenciákat és BLAST keres programokat használtuk. Az egyes fehérjék szekvenciájának összehasonlításakor az EMBL-EBI EMBOSS Needle Pairwise Sequence Alignment programját, az egyes fehérjéken belül fellelhető domének azonosítására az EMBL-EBI InterPro Scan programját használtuk.

## 2. Felhasznált *Drosophila melanogaster* törzsek

A *Drosophila melanogaster* egy genetikailag jól jellemzett laboratóriumi modellszervezet. Nagy előnye, hogy életciklusa rövid, 25°C-on néhány nap alatt lezajlik, az embriótól az imágó állapotig. A megtermékenyítést követően a nőstény petét rak. A petéből kikel az első stádiumos lárva, amely két vedlést követően harmadik stádiumos lárává alakul. A harmadik stádiumos lárva kimászik a táptalajból, ekkor vándorló harmadik stádiumos lárvavárról beszélünk. A vándorló harmadik stádiumos lárva bebábozódik, majd a bábban a teljes átlakulással kifejlik az imágó, amely kikel. Az imágó összes szervének kezdeménye megtalálható a lárvában, ún. imágókorongok formájában. A lárva testét felépítő sejtek nem osztódnak, hanem endociklusok sorozatával méretüket növelik. Kivételt képeznek az imágókorongok és az agy, amelyek intenzív mitotikus osztódások sorozatán esnek át. Az imágókorongok kiboncolhatóak, és jól tanulmányozható bennük többek között a sejtciklus és az apoptózis eseményei.

A kísérletekben felhasznált törzseket standard *Drosophila* kukoricadara-éleszt táptalajon tartottuk. A kísérleteket 25°C-on végeztük. A törzsgyűjteményt 18°C-on tartottuk fenn. A transzgénikus RNS-interferencia törzseket és P elem inszerciós mutánsokat a bloomingtoni illetve bécsi és a szegedi *Drosophila* törzsközpontokból szereztük be. A használt genetikai markerek leírása megtalálható a FlyBase-ben (<http://flybase.org>). A vizsgált letális allélokat vagy transzgénikus konstrukciókat hordozó kromoszómákat második kromoszómás *CyO*, vagy *CyO*, *actGFP* és harmadik kromoszómás *TM3*, *Sb Ser* illetve *TM6B*, *Tb Hu actGFP* balanszer kromoszómák fölött tartottuk fenn.

A bécsi törzsközpontból (VDRC) származó transzgenikus RNS-interferencia vonalak elállításánál a pUAST *Drosophila* expressziós vektor módosított változatát használták (Dietzl és mtsai, 2007). A célgén exonjának 300-500 bázispár hosszúságú darabját két példányban, ellentétes orientációban klónozták az expressziós vektorba. Az expressziós vektor lehet vé teszi a transzgenikus konstrukció GAL4-függ expresszióját, ugyanis a szekvencia tíz, tandem elhelyezked optimalizált GAL4 köt hely (UAS: Upstream Activating Sequence) után és az SV40 transzkripcionális terminátor elé van klónozva. A célgén tehát csak azokban a sejtekben aktiválódik, ahol jelen van a GAL4 éleszt transzkripció faktor. A GAL4 transzkripció faktort külön transzgenikus törzs termeli. Azt, hogy a GAL4 milyen sejtekben vagy szövetekben termel dik, az határozza meg, hogy a transzgenikus állatban a GAL4-et kódoló szekvencia milyen *Drosophila* gén promótere mögé van klónozva. Számos, különböz sejt- és szövetspecifikus GAL4 transzkripció aktivátort termel törzs áll rendelkezésre, amelyeket *driver* törzseknek nevezünk. Az *Act5C-GAL4* és a *da-GAL4* törzsek minden szövetükben kifejezik a GAL4-et, míg a például az *eyeless-GAL4* csak a szemkezdemény sejtekben termeli. A transzkripció aktivátor bejuttatása a transzgenikus RNS-interferencia vonalba keresztezéssel történik. Az utódokban együtt lesz a GAL4 transzkripció aktivátor és az RNS-interferencia konstrukció. A GAL4 köt dik az RNS-interferencia transzgen *UAS* helyére és aktiválja annak átíródását. Az ellentétes orientációba klónozott exonrészek expressziója egy kett s szálú RNS-t fog eredményezni, amelyet a Dicer komplex kis interferáló RNS-ekre darabol. Ezek a RISC komplexbe épülve a célgénr l képz d mRNS lebontását indukálják (Tijsterman és Plasterk, 2004).

### 3. Letálfázis meghatározás

A letálfázis meghatározás során azt a fejlődési stádiumot határozzuk meg, amelyben a vizsgált gén funkciójának kiesése miatt az egyedfejl dés leáll, és az állatok elpusztulnak. A letális mutációkat *CyO*, *actGFP* és *TM6B*, *Tb Hu actGFP* kromoszómákkal balanszíroztuk. A transzgenikus RNS interferencia vonalakat *Act5C-GAL4/CyO*, *actGFP* illetve *da-GAL4* driver törzsekhez kereszteztük. A letálfázis meghatározásához törzsenként 20-30 pár imágót petéztet kamrákba helyeztük. A petéztet kamrák aljára Petri csészékben aktív szent tartalmazó táptalajt helyeztünk (2% bacto-agar, 0,8% D-glükóz, 0,1% aktív szén), amelynek a felületére éleszt pasztát kentünk. Az aktív szénnel feketére festett táptalaj kontrasztos hátteret biztosít a lárvák gy jtéséhez, az éleszt pedig megfelel táplálék a muslicáknak. A petéztet kamrákat 25 °C fokon tartottuk és a Petri csészéket 12 óránként cseréltük majd 24 óra elteltével a kikelt lárvákat standard táptalajt tartalmazó fiolákba gy jtöttük. A gy jtést

GFP sz r vel ellátott UV mikroszkóp alatt végeztük, hogy a GFP-t expresszáló balanszerek alapján el tudjuk különíteni a mutáns homozigótákat a heterozigóta testvéreiktől, illetve a drivert hordozó géncsendesített állatokat a kontroll utódoktól. Az egyes fiolákba nem helyeztünk kevesebb, mint 20 és több mint 50 lárvát. Ha túl kevés (kevesebb, mint 20 darab) lárva van egy fiolában, akkor képtelenek megfelelően megrágni a táptalajt és az könnyen kiszáradhat. Ugyanakkor, ha túl sok lárva van, az tömegstresszt idézhet elő, amely negatívan befolyásolja az állatok egyedfejlését. A fiolákba gyjtött lárvákat termosztátban, 25 °C-on neveltünk. Genotípusonként 400-400 lárva metamorfózisát követtük nyomon. Az egyedfejlés különböző stádiumait Bainbridge és Bownes 1981-es közleményében leírtak alapján határoztuk meg (Bainbridge és Bownes, 1981).

#### **4. Apoptotikus fenotípus vizsgálata szemben**

Az apoptotikus fenotípus vizsgálatának egyik könnyen kivitelezhető módszere, ha a géncsendesítést a szem imágókorongokban indukáljuk és vizsgáljuk annak a szem morfológiájára gyakorolt hatását adultokban. A DUB-ok szemspecifikus csendesítéséhez egy második kromoszómás, homozigóta életképes *eyeless-GAL4* drivert használtunk. Erről a driverről ismert, hogy ha az általa indukált géncsendesítés vagy túltermelés apoptózishoz vezet, akkor az adultokban durva felszínű, rendezetlen facettájú szemet, úgynevezett rough-eye fenotípust eredményez (Braid és Verheyen, 2008; Fan Y és mtsai, 2014). A kapott fenotípusokat intenzitásuk szerint kategorizáltuk.

#### **5. Szemikvantitatív, reverz transzkripcióhoz kapcsolt PCR (RT-PCR)**

Az egyes gének expressziójának mérését a mintákból átirított cDNS-en telítési ciklusszám alatti ciklusszámmal végeztük. A reakcióhoz szükséges primerpárokat a DNASTAR és a Clone Manager programmal terveztük, úgy hogy a primerpárok tapadási helyei a gének exonjaiba essenek és lehetőség szerint legalább egy intront fogjanak közre. Bemérési kontrollként a *Drosophila* L17 riboszomális fehérjét kódoló génre tervezett rpL17A primerpárokat használtuk. Telítési ciklusszám alatt (20-25 ciklus) a képződött termék mennyisége egyenesen arányos a templát DNS mennyiségével. Az RNS mintákat Tri Reagent extrakciós kittel (Sigma) izoláltuk. Amennyiben szükséges volt, a mintákat RQ1 RNáz mentes DNÁzzal kezeltük (Promega). Az RNS minták épségét gélelektroforézissel ellenőriztük; a nem degradálódott mintákban jól látható 2 kb-nál a 18S riboszomális RNS alkotott éles sáv. 5µg össz-RNS templátról M-MuLV reverz transzkriptázzal (Fermentas) random hexamer primert használva cDNS-t szintetizáltunk. A polimeráz lánreakciókat Go-Taq (Promega)

h stabil polimerázzal végeztük, standard körülmények között (2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 0.2 mM primer). Az rpL17A primerekkel kapott termék mennyisége alapján kalibráltuk a specifikus primerekkel végzett PCR reakciókba bemért templat mennyiségeket. A PCR-termékeket agaróz gélelektroforézissel detektáltuk. A DUB-ok elzetes jellemzéséhez használt összes primer szekvenciáját e dolgozat keretében nem részletezem.

A CG12082 gén expressziójának vizsgálatához használt primerek:

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

*CG12082 RT lower:* 5'- GCCGCCACTGCCGTCAAAGAAC -3'

A proapoptotikus gének expressziójának vizsgálatához használt primerek:

*p53 RT upper:* 5'- GCTTGGGGGCACGTACATATT-3'

*p53 RT lower:* 5'- ACATGAGCGGGTCTGTAACC-3'

*rpr RT upper:* 5'- CTACATACCCGATCAGGCGACTCT-3'

*rpr RT lower:* 5'- ACTAAAATTGGGTGGGTGTTGTGG-3'

*hid RT upper:* 5'- ACGCCCGGGAGATTGATGG-3'

*hid RT lower:* 5'- CGGGACTGGGTGATATTGGATTG-3'

*grim RT upper:* 5'- AAAGGTTTCCCGGTTGGTTCA-3'

*grim RT lower:* 5'- TGTTCGGCGGTTCTTGTATTCTAT-3'

A proteaszóma alegységek expressziójának vizsgálatához használt primerek:

*DmUsp14 RT upper:* 5'- ACGGTGGTGCCCTTCTCC-3'

*DmUsp14 RT lower:* 5'- GGCGCTGTGGTCCTGTTG-3'

*Rpn11 RT upper:* 5'- GAGGCCGTGGATCCCGTCTTTCA-3'

*Rpn11 RT lower:* 5'- CAGCTGCTCGGGCGTCATTTTCTC-3'

*Rpn10 RT upper:* 5'- AGGCGAGATAAACCTCCTG-3'

*Rpn10 RT lower:* 5'- GGTGTTGGCTTCGTTCTCTG-3'

*Rpn1 RT upper:* 5'- TCTGACCAAGGCCGATCTGAAGGA-3'

*Rpn1 RT lower:* 5'- AGTGGTACGGCCCGACGAATGG-3'

## 6. Kvantitatív valós idej PCR (qPCR)

A proapoptotikus gének expressziójának kvantitatív valós idej PCR-rel történ meghatározásához 1 µg össz-RNS-b 1 cDNS-t szintetizáltunk a RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) felhasználásával. A valós idej PCR-t egy ABI 7500 (Applied Biosystems) készülékkel, SYBR Green kit felhasználásával végeztük az alábbi program szerint: 95 °C, 10 perc, (95 °C, 15 másodperc, 60 °C, 1 perc) X 40 ciklus. A primereket a Clone Manager programmal terveztük. A C<sub>t</sub> értéket minden egyes mRNS esetében az *rpL17A* és az *Actin42A* háztartási gének termékeihez normalizáltuk. Az expressziós szint változásait a C<sub>t</sub> módszerrel számítottuk ki. A kísérletekhez az alábbi primerpárokat használtuk:



*Actin42A forward:* 5'- GCGTCGGTCAATTCAATCTT -3'  
*Actin42A reverse :* 5'- AAGCTGCAACCTCTTCGTCA -3'  
*RpL17A forward:* 5'- GAGCCAAGAACCTGTACG -3'  
*RpL17A reverse:* 5'- CAGGCATGACCTTCTTCC -3'  
*p53 forward:* 5'- CATCGAGGGCATGATTAAGG -3'  
*p53 reverse:* 5'- CGTAGGCACGTTTCTTAAGG -3'  
*rpr forward:* 5'- AGGAGCAGCAGATCCTTC -3'  
*rpr reverse:* 5'- TCTTCCGGTCTTCGGATG -3'  
*hid forward:* 5'- ACCGACCAAGTGCTATACG -3'  
*hid reverse:* 5'- GCGGATACTGGAAGATTTGC -3'  
*grim forward:* 5'- GCGGTCAGAACAACGATG -3'  
*grim reverse:* 5'- GATTGAGCCTGCCTTCC -3'

## 7. Deléciós mutánsok el állítása P elem remobilizációval

Kísérleteim során a *Drosophila* P elemre épül mutagenézis technikával hoztam létre a deléciós mutáns törzseket. Megjegyzem, hogy a „deléció” terminust a genetikában általában néhány bázispár hiányára szokták alkalmazni. A *Drosophila* genetikában azonban „deléció” alatt az egy gént érint , nagyobb kiterjedés DNS szakasz kiesését is értjük, és dolgozatomban is ebben az értelemben szerepel. A P elem remobilizációs mutagenézis módszer lényege, hogy a célgén közelében lévő P elemet transzpozáz bevitelével mobilizáljuk az inszerciós helyre. A P elem kivágódása legtöbbször pontosan történik, amit precíz kivágódásnak nevezünk. Azonban az eseteknek egy részében a kivágódás nem precíz, ezért a P elemmel szomszédos szekvencia egy része is elvész, és deléció keletkezik. A deléció méretét specifikus primerekkel, PCR-rel, majd pedig a DNS fragment szekvenálásával tudjuk bázispár pontossággal azonosítani. A reakcióban a deléciós kromoszómáról kisebb termék keletkezik, mint a vadtypusról.

A *CG12082* gén esetében két P elem inszerciós allélból (*CG12082<sup>EY23569</sup>* és *CG12082<sup>EY20760</sup>*) kiindulva hoztam létre a gént érint deléciókat. A *CG12082<sup>EY23569</sup>/TM3* és *CG12082<sup>EY20760</sup>/TM3* szüzeket tömegben *w<sup>+</sup>*; *Df(3R)C4/TM3*, *Sb P( 2-3)*, transzpozáz termel hímekhez kereszteztem. Az utódok közül *CG12082<sup>EY23569</sup>/TM3*, *Sb P( 2-3)* vagy *CG12082<sup>EY20760</sup>/TM3*, *Sb P( 2-3)* hímekben történik meg a P elem remobilizációja. Ezeket az ún. „*jump-starter*” hímeket egyesével harmadik kromoszómás balanszert hordozó *w*; *TM3*, *Sb Ser/TM6B*, *Tb Hu* szüzekkel kereszteztük. A kikel utódok között kerestünk P elemet vesztett, fehér szem egyedeket, amelyeket aztán balanszer kromoszómákkal törzsekbe állítottuk. A P elem precíz kivágódásakor visszaáll a vad fenotípus, az ilyen kromoszómára nézve homozigóta legyek életképesek és fertiliznek. A nem precíz P elem kivágódás deléciót okozhat, amely egy esszenciális gén esetében letalitást okoz. A homozigóta letális törzseken PCR

reakciót végeztünk. A *CG12082* gént érint deléciót a P elemeken kívülre, a szomszédos génekbe tervezett primerekkel végzett PCR-rel azonosítottam.

Felhasznált primerek:

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

*CG12082 deléciós lower*: 5'- AGCTGCGTGTAAGATGGGAGACC -3'

A várható vad típusú termék mérete: 3705 bp.

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

Egy-légy PCR: 0.5µl 20mg/ml ProteinázK-val kiegészített 50µl SB pufferben (10mM TrisCl pH=8.2, 1mM EDTA, 25mM NaCl) homogenizálunk egy legyet vagy bábót, fél óráig 37°C-on inkubáljuk, majd 95°C-on 2 perc alatt inaktiváljuk a ProteinázK-t. Az így készített oldat közvetlenül bemérhet a PCR-reakcióba, vagy 4 °C tárolható.

A PCR reakciót az alábbi program szerint végeztük: 95 °C, 5 perc, (95 °C 30 másodperc, 65 °C 30 °C, 72 °C, 4 perc) X 35 ciklus, 72 °C, 10 perc. A PCR termékeket 0,8 % töménység agaróz gélen futtatuk. A deléciók töréspontjait szekvenálással határoztuk meg.

A *CG12082* gén jellemzéséhez használt muslica törzsek leírását, illetve a genetikai markerek ismertetését az V. Mellékletben foglaltam össze.

## 8. Citológiai analízis

Mind az orcein, mind az akridin narancs festéshez vándorló harmadik stádiumos lárvák agyát boncoltuk ki. Ezeknek a festési eljárásoknak a pontos leírása megtalálható Pál és munkatársai közleményében (Pál és mtsai, 2007).

Az immunhisztokémiai festéshez vándorló harmadik stádiumos lárvákból boncoltuk imaginális diszkuszokat és 4% formaldehid oldatban fixáltuk 20 percig. A mintákat PBSTx (PBS+ 0.1% TritonX-100) oldattal 3X20 percig mostuk, majd 2 órán át blokkoltuk 1% BSA oldatban. 1:200 hígításban alkalmaztunk nyúlban termeltetett hasított kaszpáz-3 elleni els dleges ellenanyagot (Cell Signaling Technology), 4 °C-on, éjszakán át. 3X20 perc PBSTx mosást követ en az els dleges ellenanyagot 1:400 hígításban alkalmazott Alexa Fluor 647 Goat Anti-Rabbit (Life Technologies) másodlagos ellenanyaggal detektáltuk. A sejtmagok festésére DAPI-t használtunk. A képeket Olympus FV10i konfokális mikroszkóppal készítettük.

## 9. DmUsp5 túltermel konstrukciók készítése

A *DmUsp5* kódoló szekvenciáját az RE70722 cDNS klónból (DGRC) izoláltuk és a pUAS*t* Drosophila expressziós vektor XhoI/XbaI restrikciós helyeire klónoztuk. A létrehozott pUAS*t*-*DmUsp5* plazmid szekvenciáját szekvenálással ellenőriztük és izogenizált  $w^{1118}$  embriókba injektáltuk. A transzformánsokat a  $w^{+mC}$  marker alapján válogattuk és kromoszóma lokalizációra térképeztük. A  $w^{+mC}$  narancssárga szemszín okozó markergén, amely a pUAS*t* vektorban található. A  $w^{+mC}$  marker expressziójának mértéke a genomi környezettől függ, a narancssárga szemszín intenzitása egyenesen arányos az expresszió mértékével, és azt is jelzi, hogy az adott genomi környezet milyen mértékben fokozhatja a transzgén expresszióját. A pUAS*t*-*DmUsp5* transzgénből második és harmadik kromoszómás életképes független inszerciókat hordozó állatokat állítottuk törzsbe. Az transzgént hordozó állatokat *UAS-DmUsp5* névvel jelölöm. A transzgénről történő fehérjetermelést *da-GAL4* driverrel indukáltuk. Mivel a transzgén ebben az esetben véletlenszerűen épült be a genomba, a genomi lokalizáció is befolyásolja az expresszió mértékét, rendszerint erős túltermelést tesz lehetővé.

A *DmUsp5*-öt moderáltan expresszáló törzseket a phiC31 integráz irányította helyspecifikus integráció módszerével (Bateman és mtsai, 2006) állítottuk elő. Ehhez először a *DmUsp5* kódoló szekvenciáját a pENTR1A vektorba klónoztuk, majd olyan Drosophila expressziós vektorokba rekombináltuk, amelyek egyúttal lehetővé teszik a termelődő fehérje N terminális FLAG illetve GFP jelölését. A pTFWattB vektor N terminális FLAG jelölést tesz lehetővé, a pTGWattB vektor pedig N terminálisán GFP-vel jelölt fehérjét eredményez. A létrehozott pTFWattB-*DmUsp5* illetve pTGWattB-*DmUsp5* plazmidokat szekvenálással ellenőriztük, majd olyan embriókba injektáltuk, amelyekben a transzgén a harmadik kromoszómán található mesterséges *su(Hw)attP1* platformba épült be. A *FLAG-DmUsp5* és *GFP-DmUsp5* törzsekben a transzgenek olyan genomi környezetben vannak, amely egy mérsékelt túltermelést eredményez *da-GAL4* driverrel történő indukciót követően.

Azt, hogy a *FLAG-DmUsp5* és a *GFP-DmUsp5* transzgén a *UAS-DmUsp5* transzgenénél gyengébben expresszál, az is jelzi, hogy a *FLAG-DmUsp5* és a *GFP-DmUsp5* muslicák narancssárga szemszíne halványabb, mint a *UAS-DmUsp5* muslicáké. A szemszín intenzitásának különbsége arra utal, hogy a *FLAG-DmUsp5* és a *GFP-DmUsp5* kisebb mértékű expressziót megengedő genomi környezetben található, mint a *UAS-DmUsp5* transzgén.

A túltermelési konstrukciók mennyiségét szemikvantitatív RT-PCR-rel, illetve FLAG-re és GFP-re specifikus immunfestéssel ellenőriztük.

## 10. A heterológ menekítési kísérlet

A heterológ menekítési kísérletben használt élesztő törzseket és expressziós vektort Mark Hochstrasser bocsájtotta rendelkezésünkre. A kísérletben standard élesztő technikákat és minimál táptalajt használtunk. A *DmUsp5*, a *DmUsp14* és az *DmRpn11* kódoló szekvenciáit a pVT102U élesztő expressziós vektorba klónoztuk. A létrehozott *pVT102U-DmUsp5*, *pVT102U-DmUsp14* és *pVT102U-DmRpn11* vektorokat, valamint az üres vektort az UBP14-deficiens *MHY840* (*MAT his 200 leu2-3, 112 ura3-52 lys2-801 trp1-1 ubp14 1::HIS3*) mutáns élesztő törzsbe transzformáltuk standard lítium acetátos protokollt követve. Egyedi *Ura*<sup>+</sup> telepeket 3ml gazdag YPAD tápoldatba oldatba oltottunk és éjszakán át 30 °C-on növesztettük. Kontrollként a vad típusú *MHY501* (*MAT his 200 leu2-3, 112 ura3-52 lys2-801 trp1-1*) törzset használtuk. Az éjszakán át növesztett élesztő kultúrákat 0.1 OD<sub>600</sub>-ra hígítottuk és egy hígítási sort készítettünk, amelyben minden koncentráció a megelvezésnek négyszeres hígítása volt. A hígítási sorokból 5 µl-t nitrogénben gazdag, arginin-mentes SC táptalajra csepegtettünk, amely 0,5 µg/ml koncentrációjú kanavanin-szulfátot tartalmazott. A kanavanin egy arginin analóg, amely a fehérjékbe beépülve azok hibás feltekeredését eredményezi (Fowden és mtsai, 1967). Az ubikvitin-proteaszóma rendszer hatékony működése szükséges a kanavanin által károsított fehérjék degradálásához. A fokozott kanavanin érzékenység jó indikátora annak, hogy az ubikvitin-proteaszóma rendszer funkciója sérült (Seufert és Jentsch, 1990; van Nocker és mtsai, 1996; Ramos és mtsai, 1998).

## 11. Western blot kísérletek

A fehérjemintákat vándorló harmadik stádiumos lárvákból és bábokból izoláltuk. A fehérjéket 12%-os szeparáló gélben SDS-PAGE-el választottuk szét. A felvitt fehérje mennyiségét Coomassie Brilliant Blue festéssel optimalizáltuk. A mintákat PVDF membránra blottoltuk. Az ubikvitinek kimutatására 1:5000 hígításban alkalmaztunk nyúlban termeltetett poliklonális anti-ubikvitin elsődleges ellenanyagot (DAKO), amelyet 1:33000-re hígított anti-nyúl HRP-vel konjugált másodlagos ellenanyaggal (DAKO) detektáltunk. Bemérési kontrollként egérben termeltetett anti-béta-tubulin elsődleges ellenanyagot (DSHB) használtunk 1:1000 hígításban. Ezt anti-egér HRP-vel konjugált másodlagos ellenanyaggal (DAKO) detektáltuk.

## 12. Cikloheximid etetési teszt

A cikloheximid transzláció-gátlószer az eukarióták riboszómájának nagy alegységére hatva gátolja a transzláció elongációs lépését. Az ubikvitin bioszintézis különösen érzékeny a

cikloheximid kezelésre, hatására ubikvitin hiány áll el (Hanna és mtsai, 2003). Ismert az is, hogy az alacsony ubikvitin szint fokozottan érzékenyvé teszi a sejteket a cikloheximiddel szemben (Chernova és mtsai, 2003). Tehát a fokozott cikloheximid érzékenység az ubikvitin hiány egyik indikátora. Az ubikvitin deficit vizsgálatának céljából a mutánsainkat cikloheximiddel etettük.

Szilárd cikloheximidet (Sigma-Aldrich) 34% etanolban oldottunk úgy, hogy 17.6 mM törzsoldatot készítsünk. Els stádiumos lárvákat 3.5 ml standard táptalajt tartalmazó fiolákba gy jtöttük (fiolánként 50-et), majd 60 µl megfelelő koncentrációra hígított cikloheximiddel etettük. Mivel a *DmUsp5<sup>2</sup>* mutációra homozigóta muslicák letálisak, az etetés el tt a *w*; *DmUsp5<sup>2</sup>/TM6B*, *GFP* törzset vad típusú *w<sup>1118</sup>* partnerekkel kereszteztük, petéztettük és a *DmUsp5<sup>2</sup>/+* heterozigóta utódokat etettük. Kontrollként a *w<sup>1118</sup>* lárvákat etettük. A cikloheximid hozzáadását követ en a lárvákat 25 °C-on neveltük, a kikel adultakat fenotípus kategóriák szerint megszámoztuk.

# EREDMÉNYEK

## 1. Dezubikvitiláló enzimek a *Drosophila* genomban

A dezubikvitiláló enzimek besorolásának kritériuma az egyes alosztályokra jellemző konzervált katalitikus domének megléte az általános szekvencia hasonlóságon kívül. A konzervált katalitikus doménekön kívül egyes DUB-okban más funkcionális doméneket is azonosítottak, amelyek a sejten belüli lokalizációt, komplexekbe történő beépülést vagy a szubsztrát specificitást szabályozzák. Ezek között a domének között nagy gyakorisággal fordulnak elő olyan ubiquitin kötő domének, mint az ubiquitinnel asszociáló domén (ubiquitin-associated domain - UBA), az ubiquitin specifikus proteáz típusú cink-ujj domén (zinc finger ubiquitin-specific protease - ZnF-UBP) és az ubiquitinnel kölcsönható motívumok (ubiquitin-interacting motif - UIM). Ezeken kívül több humán DUB-ban kimutathatóak ubiquitin-szerű domének (ubiquitin-like domain - UBL) (Komander és Mutsaers, 2009). Az élesztő és humán DUB-ok szerkezetéről közölt ismereteket használtuk fel a *Drosophila* DUB-ok azonosítására.

A *Drosophila* genomban kódolt dezubikvitiláló enzimeket az alapján azonosítottuk, hogy kimutatható-e bennük valamely DUB alosztályra jellemző konzervált katalitikus domén. Annak meghatározásához, hogy az adott *Drosophila* fehérje mely élesztő illetve humán DUB ortológja, a konzervált katalitikus doméneken kívül összehasonlítottuk az élesztőt, a *Drosophila* és a humán DUB-ok domén topológiáját, egyéb funkcionális domének konzerváltságát illetve az ismert doméneket nem kódoló szekvenciaszakaszok aminosav sorrendjét is. A bioinformatikai elemzés során 58 ismert humán és 21 ismert élesztő DUB szekvenciája alapján 45 potenciális *Drosophila* dezubikvitiláló enzimet azonosítottunk. Az egyes *Drosophila* DUB-ok domén topológiáját, illetve a humán és élesztő homológját az I. mellékletben tüntettem fel. Az öt ismert DUB alosztály közül mindegyiknek van legalább egy *Drosophila* képviselője. Az emberhez hasonlóan a *Drosophilában* is az USP alosztályt reprezentálta a legtöbb DUB. Az élesztő, *Drosophila* és humán DUB alosztályok képviselőinek számát az 1. táblázat mutatja.

A bioinformatikai elemzés során 11 esetben tapasztaltuk, hogy egyazon *Drosophila* DUB-nak két vagy több humán ortológja van. Ennek magyarázata az lehet, hogy a többsejtűek evolúciója során többször bekövetkezett gén és genom-rész duplikáció. A duplikációk és a később bekövetkező mutációk sorozata közös útra visszavezethető, ún.

paralóg fehérjéket eredményezhet. Mindegyik esetben az adott humán DUB-ok egymással is nagy hasonlóságot mutattak, egymás paralógjának tekinthetők.

1. táblázat Az egyes DUB alosztályok képviselőinek száma a homológia sz. részben vizsgált fajoknál.

	Élesztő ( <i>Saccharomices cerevisiae</i> )	Ecetmuslica ( <i>Drosophila melanogaster</i> )	Ember ( <i>Homo sapiens</i> )
USP	13	23	56
UCH	1	4	4
MJD	-	1	4
OTU	2	7	15
JAMM	5	10	12
<b>Összes DUB</b>	<b>21</b>	<b>45</b>	<b>91</b>

A jelenségre egyik példánk az MJD alosztályba tartozó egyetlen, a *CG3781* gén által kódolt *Drosophila* fehérje, amelynek konzervált Josephin doménje mind a két humán MJD alosztályba tartozó Josephin fehérjével nagy hasonlóságot mutat.

A fordított eset is előfordult: két *Drosophila* DUB egyazon humán DUB-bal mutatott hasonlóságot. Az UCH alosztályba tartozó *CG3431/Uch-L5* és a *CG1950/Uch-L5-related* fehérjéknek az egyetlen humán UCH-L5 az ortológja. Egy másik példa a JAMM alosztályba tartozó, *CG8335* és *CG9769* gének termékei, amelyeknek ugyanaz a humán EIF3F az ortológja.

A homológiasz. rész során megállapítottuk, hogy 33 humán DUB-nak nincs azonosítható a *Drosophila* ortológja. Ezeknek humán DUB-oknak élesztő ortológjai sem ismertek. A teljes fehérjeszekvenciát érintő BLAST kereséssel ugyan kimutatható többkevesebb hasonlóság egyes *Drosophila* DUB-okkal, elsősorban a katalitikus domén tekintetében, de ez a hasonlóság kismértékű és az adott *Drosophila* DUB-oknak van más, jól azonosítható humán ortológja.

Mivel vizsgálatunk kiterjedt a teljes *Drosophila* genomra, illetve az élesztő és a humán genom is ismert és annotált, kijelenthetjük, hogy az összes *Drosophila* DUB-ot - 45-öt - azonosítottuk.

A továbbiakban a *Drosophila* DUB géneket érintő mutáns és transzgénikus RNS interferencia vonalakból álló gyűjteményt hoztunk létre, és végeztük el a DUB-ok elzeteles jellemzését.

## 2. A *Drosophila* dezubikvitiláló enzimek elzetes jellemzése

A *Drosophila* dezubikvitiláló enzimek elzetes jellemzésének során azt kívántuk meghatározni, hogy mely képviselők nélkülözhetetlenek az egyedfejléshez. A DUB gének csendesítésének illetve mutációjának hatását 87 transzgenikus RNS interferencia és 45 P elem inszerciós mutáns vonalal vizsgáltuk. Egyes génekre több független mutáns vonal is rendelkezésünkre állt, vagyis lehetőségünk nyílt egy gén több független alléljának vizsgálatára. A géncsökkentés mértékét és specificitását szemikvantitatív reverz transzkripcióhoz kapcsolt PCR-rel (RT-PCR) ellenőriztük. Azt, hogy a vizsgált DUB-ok közül melyek funkciója létfontosságú, úgy állapítottuk meg, hogy megvizsgáltuk a géncsökkentett illetve a mutáns állatok életképességét és fertilitását, meghatároztuk a letálfázist. A letálfázis meghatározás eredményét a 2. táblázat foglalja össze.

2. táblázat A *Drosophila* DUB gének letális fenotípusának összefoglaló táblázata.

életképes, fertilis	steril	szemiletális	farát adult letális	báb- letális	lárva- letális
<i>DUBAI</i> <i>faf</i> <i>PAN2</i> <i>trbd</i> <i>Uch</i> <i>Uch-L5R</i> <i>Usp1</i> <i>Usp12-46</i> <i>Usp30</i> <i>Usp32</i> <i>CG2224</i> <i>CG3781</i> <i>CG4603</i> <i>CG4751</i> <i>CG4968</i> <i>CG6091</i> <i>CG7857</i> <i>CG8335</i>	<i>otu</i> <i>CG5384</i>	<i>Usp15-31</i>	<i>calypso</i> <i>CYLD</i> <i>echinus</i> <i>puf</i> <i>Uch-L5</i> <i>Usp7</i>	<i>Csn5</i> <i>Csn6</i> <i>Usp2</i> <i>Usp20-33</i> <i>Usp8</i> <i>CG3251</i>	<i>eIF-3p40</i> <i>non-stop</i> <i>Prp8</i> <i>Rpn8</i> <i>Rpn11</i> <i>scrawny</i> <i>Usp10</i> <i>Usp16-45</i> <i>Usp39</i> <i>Usp47</i> <i>CG12082</i> <i>CG9769</i>
<b>18 db</b>	<b>2 db</b>	<b>1 db</b>	<b>6 db</b>	<b>6 db</b>	<b>12 db</b>

Az egyes géneket a legersebb alléljaik letálfázisa alapján soroltuk be az egyes kategóriákba.

Megállapítottuk, hogy a dezubikvitiláló enzimeket kódoló gének közül 27 nélkülözhetetlen az állatok egyedfejléséhez. E gének csendesítése illetve kiejtése esetében



valamelyik fejlődési stádiumban bekövetkező pusztulást figyeltünk meg vagy a kikelő állatok sterilitását tapasztaltuk – az *otu* esetében a nőstény-, a *CG5384* esetében a hímsterilitást. Munkánk konzisztenciáját az is bizonyítja, hogy az ismert, egyazon fehérje komplex esszenciális alegységeiként azonosított DUB-ok hasonló letális fenotípust mutattak. A COP9 szignáloszóma két alegységét kódoló *Csn5* és *Csn6* gének mutánsai báb stádiumban pusztultak el. A 26S proteaszóma regulátor komplexének esszenciális alegységeit kódoló *Rpn8* és *Rpn11* mutánsai korai lárva letalitást mutattak.

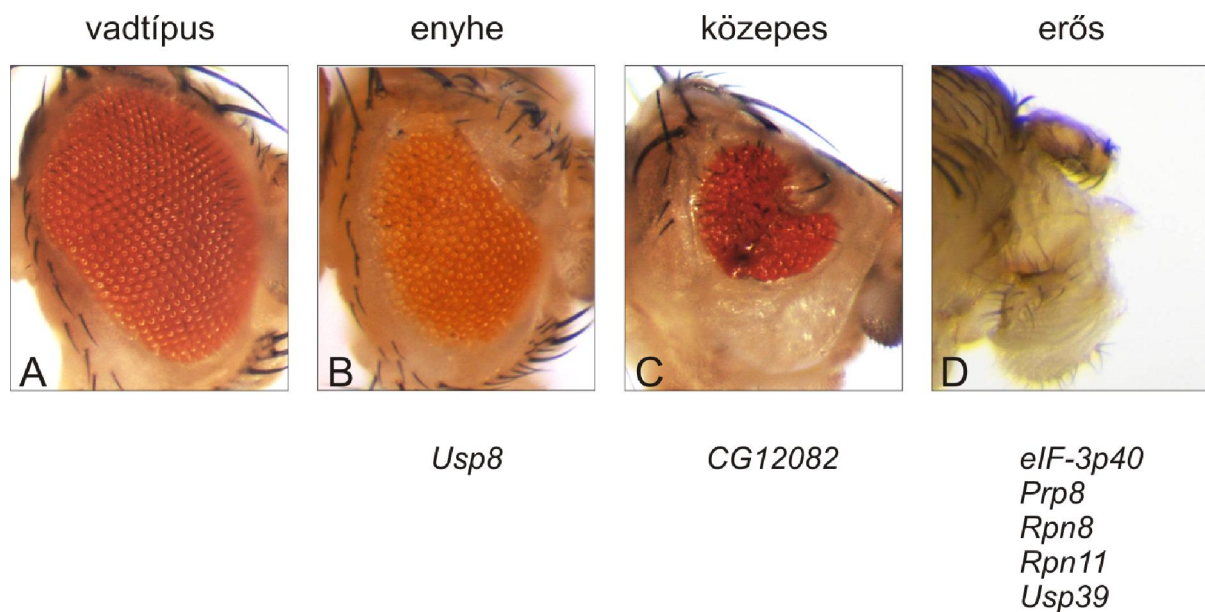
Az általunk vizsgált DUB gének egy részét, például a *faf*, *trbd*, *otu*, *Usp8*, *non-stop*, *CYLD*, *echinus*, *puf*, *DUBAI* géneket már korábban jellemezték (lásd a FlyBase adatbázisban az egyes gének adatlapján felsorolt hivatkozásokat). Az általunk használt mutáns allélok letális és steril fenotípusa megegyezett azzal, amit szakirodalomban az egyes génekről korábban leírtak. A géncsendesítés fenotípusa hasonló volt a mutáns allélokéhoz. Megfigyeltük, hogy az esszenciális gének esetében a géncsendesített muslicák esetenként tovább éltek, mind a null mutánsok. Mivel a géncsendesítés csak lecsökkenti, de nem eliminálja teljesen a génről képződő mRNS-t, a hipomorf mutánsokéhoz hasonló fenotípust okoz. A géncsendesítés hipomorf jellegével magyarázható, hogy a géncsendesített muslicák esetenként tovább éltek, mint a null mutánsok. A DUB gének célzott csendesítését RT-PCR-rel minden esetben igazoltuk.

A DUB gének elvezetés, letális fenotípusra kiterjedő jellemzését követően különböző funkcionális szerepeket terveztünk, amelyekkel vizsgáltuk a DUB-oknak az egyes élettani folyamatokban játszott szerepét. Egyik általunk is vizsgált folyamat a programozott sejthalál, az apoptózis. Az apoptózis vizsgálatát azért tartottuk érdekesnek, mert ismert, hogy benne jelentős szerepe van az ubiquitilációnak (Bader és Steller, 2009). Mivel az ubiquitiláció dinamikájának a fenntartásáért a DUB-ok felelősek, jogosan feltételezhetjük, hogy a DUB-ok egy része közvetlenül (az apoptotikus útvonal komponenseinek dezubikvitilálása által) vagy közvetetten (az ubiquitin háztartás szabályozásán keresztül) részt vesz az apoptózis szabályozásában.

### **3. A dezubikvitiláló enzimek szerepe apoptotikus fenotípusra**

A dezubikvitiláló enzimek apoptózisban betöltött szerepét a *Drosophila* szemben vizsgáltuk. Ismert, hogy a sejthalál jól tanulmányozható a szemben, mivel a szemkezdemény sejtek jelentős mértékű pusztulása nem befolyásolja a muslicák egyedfejlődését, ugyanakkor könnyen azonosítható fenotípust eredményez. Az apoptotikus jelátviteli útvonal több komponensének azonosítása a *Drosophila* szemben történt (Lisi és mtsai, 2000; Hay, 2000). A

DUB gének szemspecifikus csendesítését az *eyeless-GAL4* driverrel végeztük. A szemfenotípus intenzitása alapján három kategóriát különítettünk el: enyhe, közepes és erős szemfenotípus. A kategóriáknak egy-egy reprezentatív képét, illetve az egyes fenotípus-kategóriákba eső DUB gének listáját a 6. ábra szemlélteti. A 45 vizsgált DUB gén közül 7-ben figyeltünk meg valamilyen elváltozást a szemképzésben, facettáinak rendezettségében. Mint látható, az *Usp8* gén csendesítése a szemben a vad típusúnál alacsonyabb számú és szabálytalanul elhelyezkedő facettát eredményezett (6. ábra, B). Mivel ez a fenotípus volt a legkevésbé hangsúlyos, ezért ezt enyhe fenotípus-kategóriába soroltuk. Közepes erősségű szemfenotípust a *CG12082* gén csendesítése okozott. A szem nagymértékben csökevényes volt. A facetták helyét a fejtök kutikulája töltötte ki, esetenként szőrös szálakat is növesztve (6. ábra, C). További öt gén esetében a géncsökkentés erős, szemnélküli fenotípust eredményezett.



**6. ábra. A szemkezdeményben csendesített DUB gének fenotípusa.** Önmagában csak az *ey-GAL4* drivert kifejező, vad típusú (A) szemhez hasonlítva a géncsökkentett muslicák szemét, megkülönböztettünk enyhe, rendezetlen facettás (B), közepes erősségű, csökevényes (C) és erős, szem és fejtök hiányos (D) fenotípust. A szemeket Olympus SZX7 mikroszkópra szerelt DP73 kamerával fényképeztük le. Az egyes kategóriák reprezentatív képe alatt azok a DUB gének vannak felsorolva, amelyek csendesítése az adott fenotípust eredményezte.

Ezekben az esetekben a fejtök jelentős része is hiányzott, csupán a szájszerv és a csápok, illetve az összetett kutikula rész alakult ki (6. ábra, D). A muslicák farát adult stádiumban pusztultak el. A pusztulásnak az lehet a magyarázata, hogy nem alakult ki a fejtök homloki része, amellyel az imágók kikeléskor a bábburkot felszakítják. Az elhalt egyedeket a bábburokból történő kiboncolás után tudtuk fényképezni.

A szemspecifikus driverrel történő szűrést követően, a *CG12082* gént választottuk ki részletesebb jellemzésre. A választás egyik oka az érdekes, kiterjedt apoptózisra utaló szemfenotípus volt, másrészt pedig a gén akkor még nem volt jellemezve és elnevezve, ellentétben a másik hat szemfenotípust mutató génnel. A dolgozatom további részében a *CG12082* gén által kódolt a dezubikvitaláló enzim részletes genetikai és funkcionális jellemzését mutatom be.

#### 4. A *CG12082* gén funkciójának kieseése lárvaletalitást eredményez

A *CG12082* gén elzetes jellemzéséhez három független transzgenikus RNS-interferencia vonal állt rendelkezésünkre. A vonalakat általános, *da-GAL4* és *Act5C-GAL4* driverrel indukálva vándorló harmadik stádiumos lárvától korai P3 bábstádiumig nyúló pusztulást tapasztaltunk, a géncsendesítés mértékének függvényében (3. táblázat).

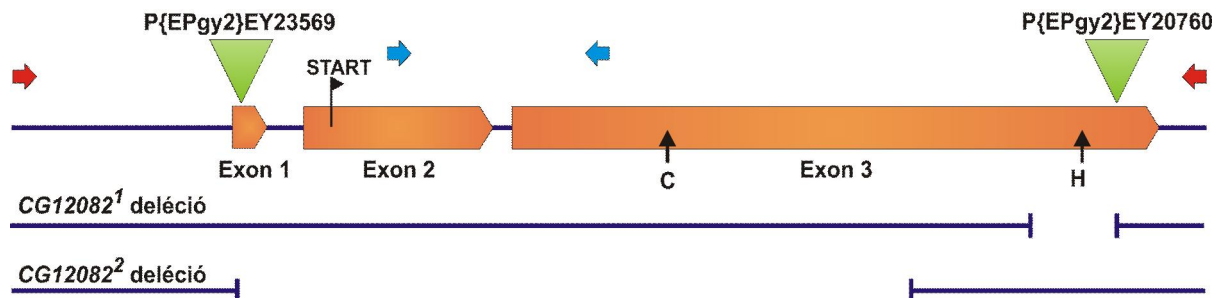
3. táblázat A *CG12082* jellemzéséhez használt mutáns allélok és a *DmUsp14* allélok letálfázisának összefoglaló táblázata. A *CG12082* gént a későbbiekben *DmUsp5*-nek nevezem.

Genotípus	Géndózis	Letálfázis			
		vándorló lárva	báb	farát adult	életképes
Oregon-R	vadtípus			5%	95%
<i>da&gt;CG12082<sup>v17567</sup></i>	gyenge hipomorf	20%	80%		
<i>da&gt;CG12082<sup>NIG.12082R-2</sup></i>	hipomorf	30%	70%		
<i>da&gt;CG12082<sup>JF02163</sup></i>	erős hipomorf	70%	30%		
<i>CG12082<sup>EY23569</sup></i> homozigóta	vad típus			3%	97%
<i>CG12082<sup>EY20760</sup></i> homozigóta	funkcionális null	91%			
<i>CG12082<sup>1</sup></i> homozigóta	funkcionális null	93%			
<i>CG12082<sup>2</sup></i> homozigóta	valódi null	96%			
<i>da&gt;DmUsp14<sup>v110227</sup></i>	hipomorf			6%	94%
<i>DmUsp14<sup>f00779</sup></i> homozigóta	erős hipomorf			7%	93% <sup>a</sup>

<sup>a</sup> steril hímek

Mivel a géncsendesítés csupán mennyiségileg csökkenti, de nem szünteti meg teljesen a génről képződő mRNS-t, úgy viselkedik, mint egy hipomorf mutáns allél. A teljeskörű genetikai analízis azonban megköveteli, hogy különböző erősségű allélokat vizsgáljunk, köztük null allélokat is. Ezért a *CG12082* gén közelében található *P{EPgy2}EY20760* és a *P{EPgy2}EY23569* elemek nem pontos kivágódásával *CG12082* null mutánsokat

készítettünk, amelyekben a deléciók töréspontjait szekvenálással határoztuk meg. A P elemek helyét és a deléciók kiterjedését a 7. ábra szemlélteti.



**7. ábra A *CG12082* gén szerkezetének és a mutációk helyének sematikus ábrázolása.** A gén exonjait barna szín jelöli. A fekete nyilak jelölik a katalitikus cisztein (**C**) és hisztidin (**H**) kódjainak helyét. A transzlációs start kódjának pozícióját a „**START**” felirat mutatja. A zöld nyilak a P elem inszerciók helyét, a megszakított vonalak pedig a deléciók kiterjedését reprezentálják. Kék nyilak a szemi kvantitatív RT PCR-hez használt primerek köt helyét, a piros nyilak pedig a deléciók azonosítására használt primerek helyét mutatják. A *CG12082* gént a későbbiekben *DmUsp5*-nek nevezem.

A *P{EPgy2}EY20760* elem nem precíz kivágódása egy 275 bázispár kiterjedés deléciót okozott a gén 3' végének közelében. Ezt a deléciós allélt *CG12082<sup>1</sup>*-nek neveztük el. A deléció eltávolította a katalízishez nélkülözhetetlen hisztidin kazettát, illetve az UBA2 domént kódoló szekvencia jelentős részét. Az enzimatis funkcióhoz nélkülözhetetlen domének miatt, habár a *CG12082<sup>1</sup>* allélról képződhet mRNS, az nem kódolhat funkcionális fehérjét, vagyis a *CG12082<sup>1</sup>* allél funkcionális null allélnak tekinthető. A *CG12082<sup>1</sup>* homozigóták egyedfejlődése vándorló harmadik stádiumos lárvaállapotban megrekedt és az állatok 3-4 nap stagnálást követően, melanotikus göböket növesztve elpusztultak.

A *P{EPgy2}EY23569* elem nem precíz kivágódásával egy 2147 bp méretű deléció képződött, amely a gén 5' végétől 3' irányba terjedt, és eltávolította a gén szekvenciájának 73%-át, beleértve a „start” kódot is. A deléciós allélt *CG12082<sup>2</sup>*-vel jelöltük. Erről az allélról nem tudtuk kimutatni mRNS képződését, tehát valódi null allélként viselkedik. A *CG12082<sup>2</sup>* homozigóták egyedfejlődése szintén vándorló harmadik stádiumos lárvaállapotban rekedt meg. A lárvák a *CG12082<sup>1</sup>* allélhoz hasonlóan, 3-4 nap stagnálást követően melanotikus göböket képezve pusztultak el. A mindkét deléciót transzheterozigóta állapotban hordozó lárvák a homozigótákéval megegyező fenotípust mutattak. A letalitást mindkét allél esetében menekíteni tudtuk a vad típusú *CG12082* mérsékelt túltermelésével (4. táblázat).

4. táblázat A *CG12082* mutánsok letálfázisának menekítése vad típusú *CG12082* transzgénnel. A *CG12082* gént a későbbiekben *DmUsp5*-nek nevezem.

Genotípus	Letálfázis			
	vándorló lárva	báb	farát adult	életképes
Oregon-R			5%	95%
<i>CG12082</i> <sup>1</sup> homozigóta	93%			
<i>CG12082</i> <sup>2</sup> homozigóta	96%			
<i>da&gt;GFP-CG12082; CG12082</i> <sup>1</sup> homozigóta			24%	76%
<i>da&gt;FLAG-CG12082; CG12082</i> <sup>2</sup> homozigóta			14%	86%
<i>da&gt;UAS-CG12082; CG12082</i> <sup>2</sup> homozigóta		51%	49%	

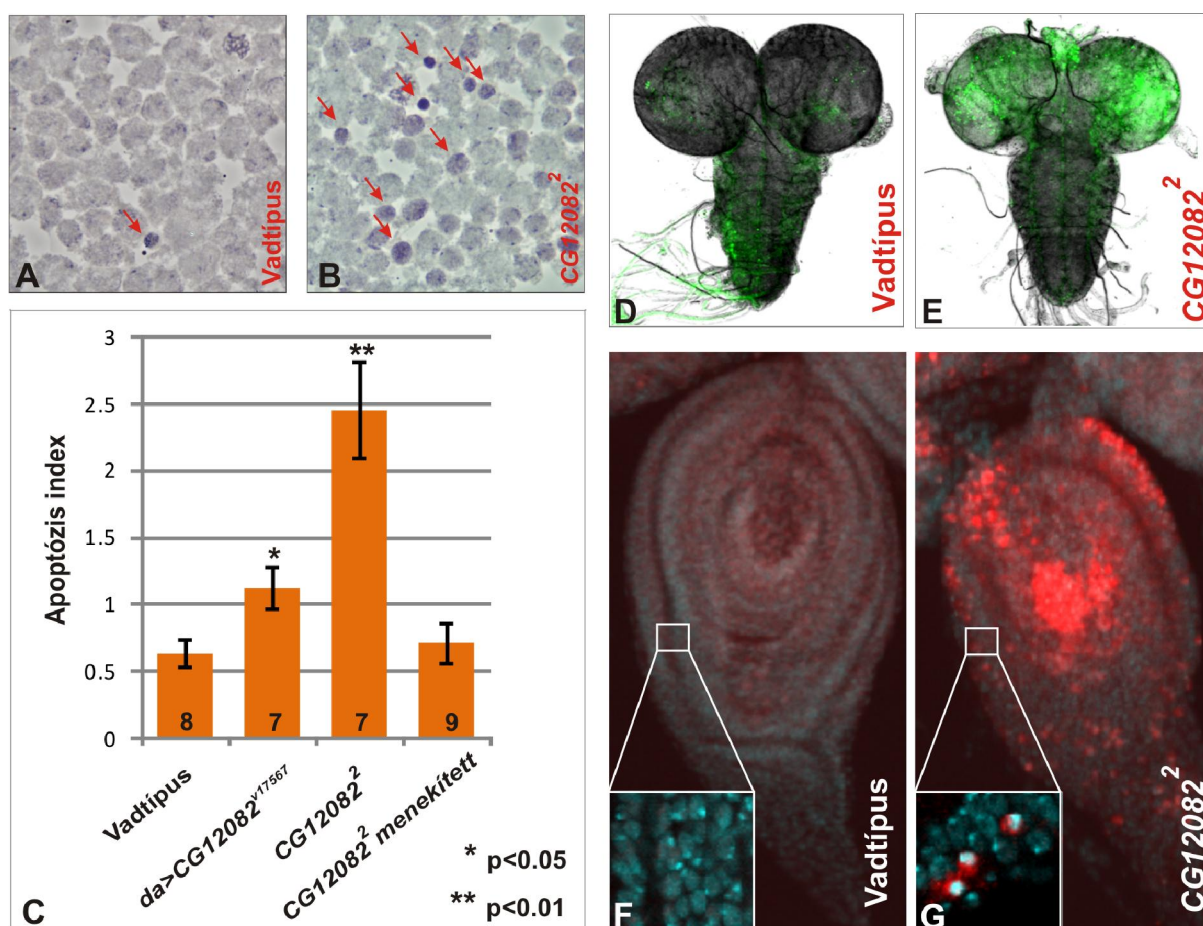
A továbbiakban a *CG12082* génfunkció jellemzését a *CG12082*<sup>2</sup> valódi null allélon keresztül mutatom be.

## 5. A *CG12082* hiánya megemelkedett apoptózishoz vezet

Avégett, hogy meghatározzuk, milyen rendellenesség állhat a lárva letalítás hátterében, a mutánsok lárvális szöveteit vizsgáltuk. Lárvális agyakat és imágókorongokat boncoltunk, majd orceinnel és akridin narancs festéssel, illetve aktivált kaszpáz-3 elleni immunfestéssel vizsgáltuk, olyan módszerekkel, amelyek az apoptotikus sejtek azonosítására jól beváltak.

A *CG12082* mutánsok orceinnel festett lárvális agypreparátumaiban (8. ábra, B) a vad típusú kontrollhoz képest (8. ábra, A) jelentősen nagyobb számú lekerekített, túlfestődött piknotikus sejtet figyeltünk meg, amelyeket számszerűsítve közel ötszörös apoptózis indexbeli emelkedést állapítottunk meg (8. ábra, C). A transzgénikus RNS interferenciával csendesített lárvák apoptózis indexe is szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll mintáké.

A lárvaagyak akridin narancs festése is azt mutatta, hogy a vad típusú agyhoz képest (8. ábra, D) a *CG12082* mutáns lárvák agyában (8. ábra, E) jelentősen nagyobb mértékű a sejtek pusztulása. Hasonlóképpen, az apoptotikus sejtek kimutatására specifikus és érzékeny kaszpáz-3 elleni immunfestés is megemelkedett apoptózist mutatott a mutáns lárvák imágókorongjaiban (8. ábra, G). Mivel ezekből a lárvális szövetekből alakulnak ki később a felnőtt *Drosophila* szervei, az igen intenzív apoptózis magyarázhatja a fent említett letális fenotípust. Az imágókorongok hiányában a muslicák elélhetnek a vándorló harmadik stádiumos lárvaállapotig, mivel az imágókorongok nem szükségesek a lárva fejlődéséhez, de a bebábozódásához már igen.



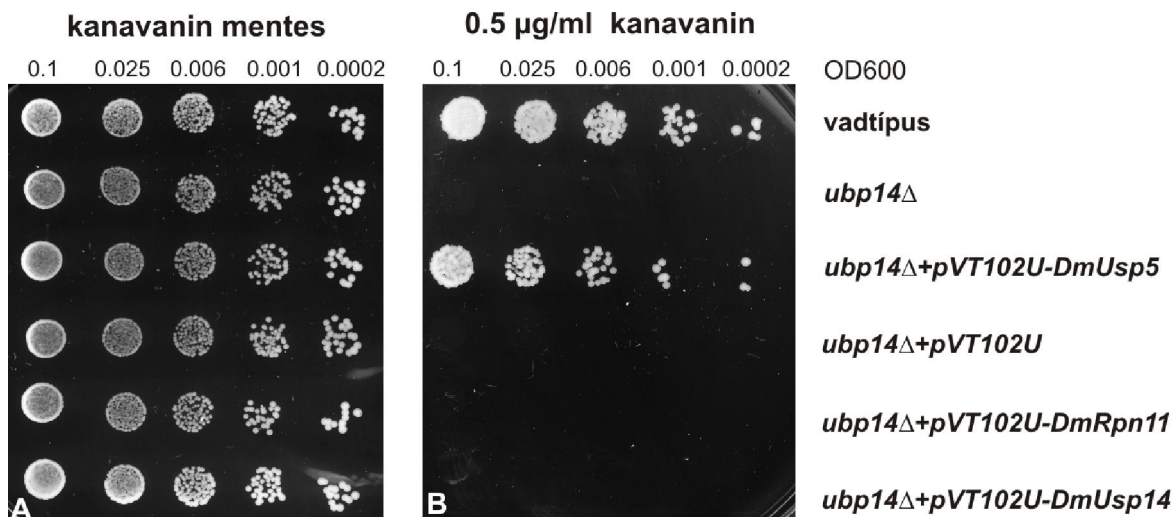
**8. ábra A *CG12082* mutáns apoptotikus fenotípusa.** Vadtípusú (A) és *CG12082*<sup>2</sup> (B) lárvák orceinnel festett agypreparátumait fáziskontraszt mikroszkóppal vizsgáltuk. Piros nyilak jelölik a kis, lekerekedett, piknotikus sejteket. Az apoptózis index (C) azt mutatja meg, hogy egy látómez ben átlagosan hány piknotikus sejtet számoltunk. A vadtípusú, a *CG12082* géncsendesített (*da>CG12082<sup>17567</sup>*), *CG12082* null mutáns (*CG12082*<sup>2</sup>) és a transzgénikusan menekített (*CG12082*<sup>2</sup> menekített) lárvák apoptózis indexét határoztuk meg. Az oszlopok tővénel lév számok azt mutatják, hogy hány független preparátum átlagát és szórását jelöli az oszlop. Preparátumonként 15-25 látómez t számoltunk le. A statisztikai összehasonlítást kétmintás T-próbával végeztük. A vad típusú (D) és a *CG12082* mutáns (E) lárvák agyán akridin narancs festést is végeztünk és konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A vadtípusú (F) és *CG12082* mutáns (G) lárvák lábdiszkuszát DAPI-val (kék) és hasított kaszpáz-3 specifikus ellenanyaggal (piros) festettük. A képeket konfokális mikroszkóppal rögzítettük. A betétképek a jelölt területek kinagyított, egyedileg elkülöníthet sejtjeit mutatják. A *CG12082* gént a kés bbiekben *DmUsp5*-nek nevezem.

A letális fenotípushoz hasonlóan az apoptotikus fenotípus is menekíthet volt a vad típusú *CG12082* mérsékelt túltermeltetésével mutánsokban (8. ábra, C).

## 6. A *CG12082* az *Ubp14/USP5* funkcionális *Drosophila* ortológját kódolja

A FlyBASE predikciós adatai és BLAST keresés alapján megállapítottuk, hogy a *CG12082* gén által kódolt fehérje szekvenciája átlagosan 45,5% illetve 66,4% hasonlóságot mutat az éleszt *Ubp14*, illetve a humán *USP5* fehérjével. Ezen felül a fehérje konzervált USP, UBP típusú cink ujj, valamint az *UBA1* és *UBA2* doménjeinek topológiája nagymértékben megfeleltethet az éleszt és humán ortológok domén-szerkezetének (II.

melléklet). Avégett, hogy megvizsgáljuk, a szerkezeti homológián túlmenően funkcionális homológia is fennáll-e a fehérjék között, heterológ menekítési kísérletet végeztünk. Azt vizsgáltuk, hogy a *Drosophila CG12082* képes-e transzgenikusan ellátni az Ubp14 funkcióját olyan sarjadzó élesztő sejtekben, amelyekből hiányzik az endogén Ubp14. Amint az 9. ábrán látható, az *Ubp14* mutáns (*ubp14*) sejtek a kontrollhoz hasonlóan növekednek standard táptalajon, de növekedésük leáll 0.5 µg/ml kanavanin jelenlétében.



**9. ábra** A *CG12082* expressziója menekíti az *ubp14* sarjadzó élesztő kanavanin érzékeny fenotípusát. Standard (A), illetve 0.5 µg/ml kanavanin tartalmú standard (B) táptalajra csepegtettünk vad típusú, *ubp14* és a feltüntetett konstrukciókat hordozó *ubp14* élesztő sejteket. Az azonos koncentrációjú (0.1 OD600) sejteket egy lineáris hígítási sor szerint csepegtettük. Mindegyik csepp negyedannyi sejtet tartalmaz, mint az előző. A lemezeket 30 °C-on 5 napig növesztettük, majd fényképeztük.

Ismert, hogy a kanavanin egy olyan arginin analóg, amely a fehérjékbe beépülve elrontja azok térszerkezetét (Fowden és mtsai, 1967). Ha az ubikvitin-proteaszóma rendszer zavart szenved, akkor a sejtek nem képesek elég hatékonyan degradálni a kanavanin következtében felhalmozódó hibás fehérjéket, és fokozottan érzékennyé válnak a kanavaninra. Ismert, hogy az *ubp14* élesztőben gátolt a proteaszomális fehérjelebontás, aminek következménye a kanavanin érzékeny fenotípus (Amerik és mtsai, 1997). A továbbiakban, az *ubp14* sejtekbe egy folyamatosan aktív alkohol dehidrogenáz promóterrel ellátott *CG12082* expressziós konstrukciót juttattunk (*pVT102U-DmUsp5*). A *CG12082* géntermék hatására az *ubp14* sejtek is képesek voltak növekedni a kanavanin tartalmú táptalajon (9. ábra, B). A *DmUsp5* expressziójával ellentétben az üres vektor (*pVT102U*), illetve más *Drosophila* DUB-ok kifejeztetése (*pVT102U-DmUsp14* és *pVT102U-DmRpn11*) nem komplementálta az *ubp14* élesztők kanavanin érzékenységét.

Mivel kísérletünkhöz hasonló körülmények között a humán USP5 is képes volt ellátni az élesztő Ubp14 funkcióját (Amerik és mtsai, 1997), eredményeink azt mutatják, hogy a

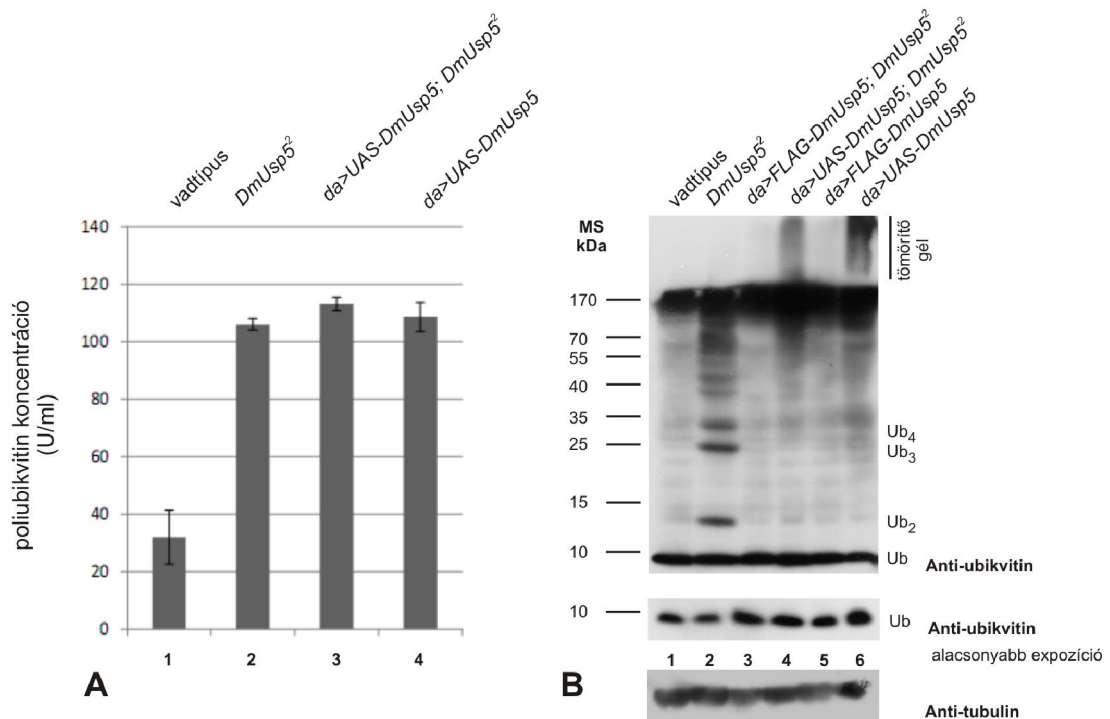
*Drosophila CG12082* gén terméke az Ubp14/USP5 dezubikvitiláló enzim funkcionális ortológja. Ezért ezt a fehérjét DmUsp5-nek neveztük el.

## **7. A DmUsp5 hiányában szabad és kötött poliubikvitin láncok halmozódnak fel és csökken a szabad monoubikvitinek mennyisége**

Az utóbbi években *in vitro* kísérletekkel igazolták, hogy a humán USP5 szubsztrátjait a szabad poliubikvitin láncok képezik, amelyeket a proteaszomális fehérjelebontás során a proteaszóma Rpn11 nevezet DUB alegysége távolít el a lebontandó fehérjékről (Hadari és mtsai, 1992; Verma és mtsai, 2002; Reyes-Turcu és mtsai, 2006). A szabad poliubikvitin láncokat bontó funkciónak megfelelően, a szabad poliubikvitin láncok felhalmozódását mutatták ki mind az élesztőben, mind a humán USP5 hiányában (Amerik és mtsai, 1997; Dayal és mtsai, 2009). Azért, hogy a tapasztalt fenotípusok hátterében álló molekuláris változásokról képet kapjunk, a poliubikvitinek szintjének esetleges változását megmértük a *DmUsp5* mutánsokban CycLex® poliubikvitinre specifikus ELISA kittel. A kit szilárd fázisú szendvics ELISA elven működik. Egy 96 lyukú plate alját poliubikvitinre specifikus monoklonális ellenanyaggal vonták be. Lárvális fehérje-extraktumot ezekben a lyukakban inkubálva, az ellenanyag kiköti a poliubikvitineket. Mosást követően HRP konjugált monoklonális poliubikvitin elleni ellenanyaggal detektáljuk a kikötött poliubikvitineket. A reakció egy ELISA olvasó készülékkel kvantifikálható. A kitet alkalmazva a vad típusúhoz képest a poliubikvitinek körülbelül négyszeres emelkedését mértük a *DmUsp5* null allél esetében (10. ábra, A). Mivel ez a módszer nem tud különbséget tenni a szabad és a fehérjéhez kötött poliubikvitinek között, a továbbiakban western analízist végeztünk ubikvitin-specifikus ellenanyaggal. A western blot alapján megállapítottuk, hogy mind a kis, mind a nagy molekulásúlyú, szabad és fehérjéhez kötött ubikvitilált formák felhalmozódtak a *DmUsp5* mutánsban (10. ábra, B). A kis molekulásúlyú csoport elemei egy 4-5 sávból álló létra fokait alkotják, amelyek az szabad ubikvitin di-, tri-, tetra-, penta- és hexamereknek feleltethetők meg. Ettől elkülönülnek a nagy molekulásúlyú ubikvitilált formák, amelyek elkenődött foltot képeznek a gél felső részében. A folt a detektálható ubikvitin tartalma miatt a felhalmozódott poliubikvitilált fehérjéknek feleltethet meg.

Normális esetben a sejtek teljes ubikvitin készletének csak körülbelül egyharmad része található szabad monomer formában (Kaiser és mtsai, 2011; Oh és mtsai, 2013). A monoubikvitin készletnek a fenntartásához nélkülözhetetlenek a DUB-ok, amelyek monomerek felszabadításával folyamatosan pótolják a megkötött ubikvitineket (Wilkinson, 1997; Larsen és mtsai, 1998).





**10. ábra *DmUsp5* mutánsban felhalmozódnak poliubikvitin származékok és csökken a monoubikvitin szint.** (A) A poliubikvitin koncentráció kvantitatív meghatározása vándorló lárva fehérje extraktumokból történt a Cyclex poliubikvitinekre specifikus ELISA kitel. A poliubikvitinek mennyiségét vadtípusú (1. oszlop), *DmUsp5* null mutáns (2. oszlop), valamint a *DmUsp5*-öt mutáns (3. oszlop) és vadtípusú (4.oszlop) háttéren er sen túltermel lárvákban mértük. (B) Vándorló lárvák fehérje extraktumát 12% töménység SDS gélen futtattuk, PVDF membránra blottoltuk és anti-ubikvitin els dleges ellenanyaggal detektáltuk. A mintákat vadtípusú (1. oszlop), *DmUsp5* null mutáns (2. oszlop), a *DmUsp5*-öt mutáns (3. oszlop) illetve vadtípusú háttéren (5.oszlop) mérsékelt túltermel , valamint a *DmUsp5*-öt mutáns (4. oszlop) illetve vadtípusú háttéren (6. oszlop) er sen túltermel állatokból készítettük. Bemérési kontrollként anti-tubulin monoklonális ellenanyaggal végzett immunoblott szolgált.

Mint ahogy az el bb bemutattam, az *DmUsp5* hiányában az ubikvitinek jelent s része lekötve marad szabad poliubikvitin láncok és poliubikvitalt fehérjék formájában. Azt feltételezhetjük, hogy a *DmUsp5* mutánsokban csökkenhet és kritikussá válhat a szabad monoubikvitin készlet, amiatt, hogy az ubikvitinek nagyrésze poliubikvitinek formájában lekötve marad. Amikor a western blot kísérletet megismételtük nagyobb felbontásban, nem telítési körülmények között, detektálni tudtuk a feltételezett csökkenést (10. ábra, B, 1. és 2. oszlop). A *DmUsp5* enzim mérsékelt túltermeltetése null mutáns háttéren megszüntette mind a szabad, mind a kötött poliubikvitinek akkumulációját, valamint a szabad monoubikvitin készlet kimerülését (10. ábra, B, 3. oszlop). Az eredmények arra utalnak, hogy az éleszt és a humán sejtvonalakhoz hasonlóan, a *DmUsp5* *Drosophilában* a szabad poliubikvitin láncok lebontásában játszik szerepet, valamint nélkülözhetetlen a poliubikvitalt fehérjék zökken mentes degradációjához. Ezen túlmen en úgy t nik, hogy a szabad monoubikvitin utánpótlás f út vonalát is a *DmUsp5* általi ubikvitin-újrahasznosítás képezi.

A kísérleteink során megfigyeltük, hogy a vad típusú DmUsp5 GAL4/UAS rendszerrel történő és túlermelletése negatívan hat az állatok egyedfejlődésére és hőmérsékletfüggő letalitást eredményez (5. táblázat).

5. táblázat A vad típusú DmUsp5 és túlermelletésének hőmérsékletfüggő letalitása.

Genotípus	Letálfázis			
	vándorló lárva	báb	farát adult	életképes
Oregon-R (25 °C-on)			5%	95%
<i>da&gt;UAS-DmUsp5</i> (18 °C-on)		34%	62%	4%
<i>da&gt;UAS-DmUsp5</i> (25 °C-on)		89%	11%	
<i>da&gt;UAS-DmUsp5</i> (29 °C-on)	10%	90%		

A poliubikvitin-specifikus ELISA kittel történő mérés (10. ábra, A) és a Western blot kísérlet (10. ábra, B) azt mutatta, hogy ezekben az és túlermelletett állatokban jelentősen megnövekedett a nagy molekulású, magasan futó poliubikvitilált fehérjék mennyisége. Ráadásul az ubikvitilált származékok jelentős része szokatlan módon nem vándorolt bele a szeparáló gélbe, hanem a tömörítő gél fogságában maradt. Az ubikvitilált származékoknak ez a viselkedése a kis szolubilitású fehérje-aggregátumok elektroforetikus mobilitásához hasonlít (Junn és mtsai, 2003). A megfigyelés arra utal, hogy a DmUsp5 nagymértékű túlermelletése gátolhatja a proteasomális fehérje lebontást. A jelenség lehetséges mechanizmusát és a túlermelletés okozta letalitást a Következtetések fejezetben fogom tárgyalni.

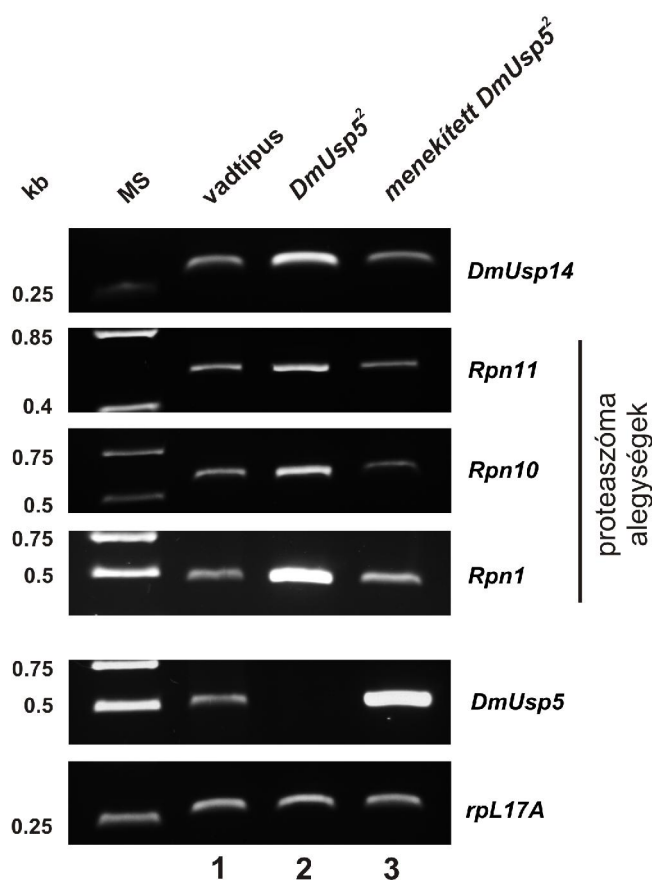
## 8. A DmUsp5 hiánya a *DmUsp14* fokozott expresszójához és a proteasóma aleggységek túlermelletéséhez vezet

Az alacsony ubikvitinszint következményeit eddig csak a *Saccharomyces cerevisiae* sarjadzó élesztőben jellemezték. A szabad monoubikvitin-készlet csökkenése az úgynevezett ubikvitin stresszválasz kialakulásához vezet élesztőben (Hanna és mtsai, 2006; Hanna és mtsai, 2007). A folyamat lényege, hogy egy eddig ismeretlen mechanizmus révén megemelkedik az *UBP6* gén transzkripciója, amely szintén egy DUB enzimet kódol. Az Ubp6 ubikvitinszer (UBL) doménjével kötődik a proteasómához, gátolja a proteasomális fehérjelebontást és fehérjékhez kötött poliubikvitin láncok disztális végéről egyenként eltávolítja az ubikvitin monomereket (Hu és mtsai, 2005; Hanna és mtsai, 2007), ezáltal hozzájárul a monoubikvitin-készlet pótlásához. Mivel az DmUsp5 hiánya szintén ubikvitin hiányhoz vezet, lehetőséget teremt annak megválaszolására, hogy ubikvitin stresszválasz

létezik-e *Drosophila*-ban. A kérdést megválaszolandó a *DmUsp5* mutánsokban megvizsgáltuk az Ubp6 *Drosophila* ortológjának expresszióját.

A FlyBase adatbázis szerint a *CG5384* gén kódolja az élesztő Ubp6 *Drosophila* ortológját, amint arra a nagyfokú szekvencia hasonlóság alapján lehet következtetni. A prediktált fehérje aminosavsorrendjét az ismert élesztő és humán DUB-okkal összehasonlítva megállapítottuk, hogy mind a fehérje szekvenciájában, mind a domén-szerkezetében nagyfokú hasonlóságot mutat az élesztő Ubp6 és a humán Usp14 fehérjékkel (III. melléklet). E hasonlóság alapján a *CG5384* gén termékét e DUB-ok *Drosophila* ortológjának tekintjük és *DmUsp14*-nek nevezzük. Elzetes vizsgálataink azt mutatták, hogy a *DmUsp14* csendesítése transzgenikus RNS interferenciával nem okozott látható fenotípust, viszont egy piggyBac transzpozon inszerciós allélje hímsteril fenotípust mutatott (3. táblázat).

A *DmUsp14* kifejeződését RT-PCR méréssel követtük mind vad típusú, mind *DmUsp5* null mutáns *Drosophila*-okban. Minthogy a *DmUsp14* expressziója jelentősen megemelkedett a *DmUsp5* hiányában (11. ábra), arra következtettünk, hogy a szabad poliubikvitin láncok akkumulációja, valamint a tapasztalt monoubikvitin hiány ubikvitin stresszválaszt vált ki *Drosophila*-ban.



**11. ábra** A *DmUsp5* hiányában megemelkedik a *DmUsp14* és a proteasóma alegységeket kódoló gének kifejeződése. Vad típusú (1. oszlop), *DmUsp5* null mutáns (2. oszlop) és a *DmUsp5* mérsékelt túltermelésével menekített (3. oszlop) vándorló lárvákból össze-RNS-t izoláltunk és cDNS-t szintetizáltunk. A mintákon *DmUsp14* és proteasóma alegységek transzkriptumait felismer primerekkel PCR-t végzünk telítési ciklusszám alatt. A *DmUsp5* expresszióját *DmUsp5* specifikus primerekkel vizsgáltuk. Bemérési kontrollként az *rpL17A* riboszomális alegység expressziója szolgált. (MS – molekulásúly marker)

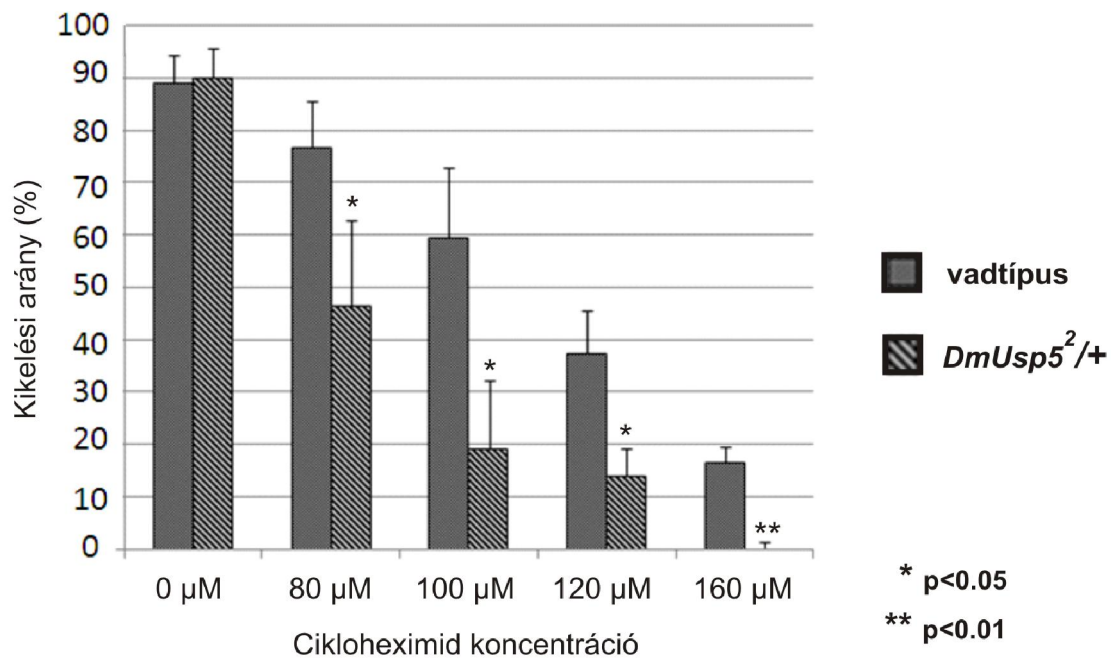
A mutánsainkban tapasztalt poliubikvitilált fehérjék felhalmozódása az esszenciális proteaszóma-alegységek mutánsainak fenotípusára emlékeztet. Korábban kimutatták, hogy a proteaszóma Rpn10 alegységének hiánya az összes többi proteaszóma-alegység jelentős felhalmozódásához vezet (Szlanka és mtsai, 2003; Ju és mtsai, 2004), amely jelenség élesztben proteaszóma stresszként ismert (Hanna és mtsai, 2007). A proteaszóma-alegységek expressziójának vizsgálatára a *DmUsp5* mutáns és vad típusú lárvákból RNS-t izoláltunk és RT-PCR-rel meghatároztuk az *Rpn1*, *Rpn10* és *Rpn11* gének transzkriptumainak szintjét. Mindhárom gén expressziója jelentősen megemelkedett az *DmUsp5* mutánsokban a vad típusúhoz képest (11. ábra).

Az proteaszóma alegységek megemelkedett expressziója menekíthető volt a vad típusú *DmUsp5* mutáns háttéren történő mérsékelt túltermelésével. A kísérlet alapján megállapíthatjuk, hogy a *DmUsp5* hiánya a proteaszóma-alegységek koordinált túltermeléséhez vezet, amely a mutáns sejtekben indukálódó proteaszóma stresszre utal.

## 9. A *DmUsp5* mutánsok cikloheximid érzékenységet mutatnak

Ismert, hogy az ubikvitin hiány az éleszt sejtet érzékennyé teszi olyan különféle vegyületekkel szemben, mint például a transláció-gátló cikloheximid. A túlérzékenység az ubikvitin stressznek tulajdonítható (Chernova és mtsai, 2003; Hanna és mtsai, 2003). Annak a feltételezésünknek az alátámasztására, hogy a *DmUsp5* hiányában ubikvitin stressz lép fel, megvizsgáltuk az *DmUsp5* mutánsok cikloheximiddel szembeni érzékenységét. A tesztben azt számoltuk, hogy az első stádiumos lárvaként cikloheximiddel etetett muslicák közül hányan érik meg a felnőtt kort. Mivel a mutánsok homozigóta állapotban etetés nélkül is vándorló harmadik stádiumos lárvaként elpusztulnak, a kísérletben *DmUsp5*<sup>2</sup>/+ heterozigótákat használtunk, amelyek normál körülmények között életképesek. Amint a 12. ábrán látható, a *DmUsp5* dózisának csökkenése jelentősen cikloheximid érzékenységhez vezetett a vad típusúhoz képest.

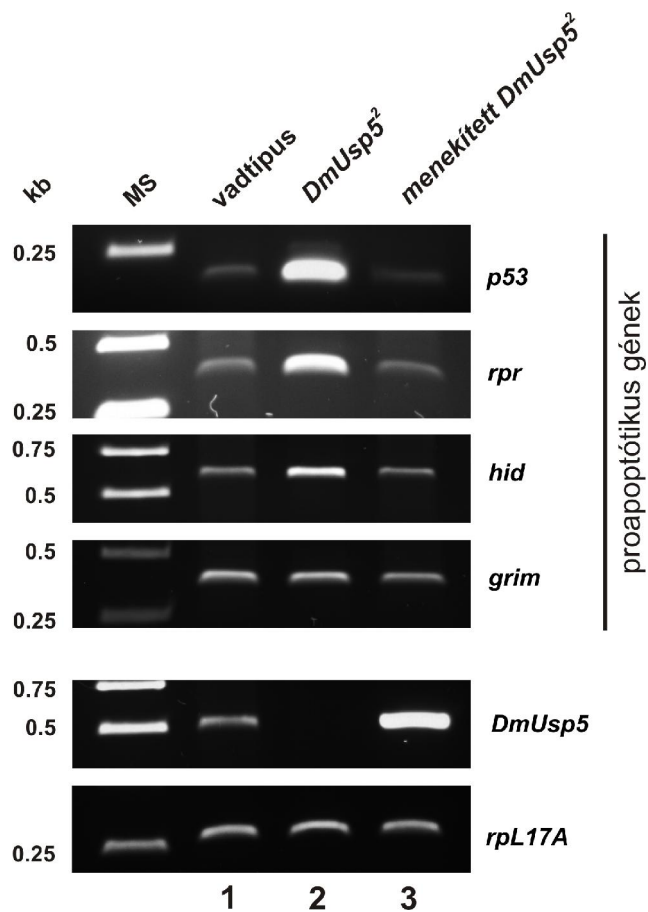
A domináns hatás is alátámasztja azt, hogy a *DmUsp5* mutánsokban jelentős az ubikvitin hiány, ami ubikvitin stresszt eredményez. A cikloheximid az ubikvitin gének translációjának gátlásán keresztül tovább fokozza az ubikvitin stresszt, mivel így nem csak az ubikvitin újrahasznosítás, hanem az ubikvitin szintézis is gátolt. A fokozott ubikvitin stressz olyan körülmény, amely fennállásakor megmutatkozik az *DmUsp5* mutáció haplo-elégtelen jellege.



**12. ábra** A *DmUsp5* heterozigóták érzékenyek cikloheximidre, egy transzlációt gátló szerre. Vadtípusú és *DmUsp5* mutáns heterozigóta (*DmUsp5*<sup>2/+</sup>) szinkronizált első stádiumos lárvák táptalajára cikloheximid alkoholos oldatát csepegtettük. Az abszcisszán feltüntetett értékek a táptalajban található cikloheximid végkoncentrációját jelölik. A kezelést követően a kikelt adultákat számoltuk meg. Az egyes oszlopok négy független kísérlet átlagát jelölik. Minden kísérletben genotípusonként 250 lárvát etettünk, 50-50-et koncentrációnként. A statisztikai összehasonlítást kétmintás T-próbával végeztük.

## 10. A *DmUsp5* mutánsokban aktiválódnak a proapoptotikus gének

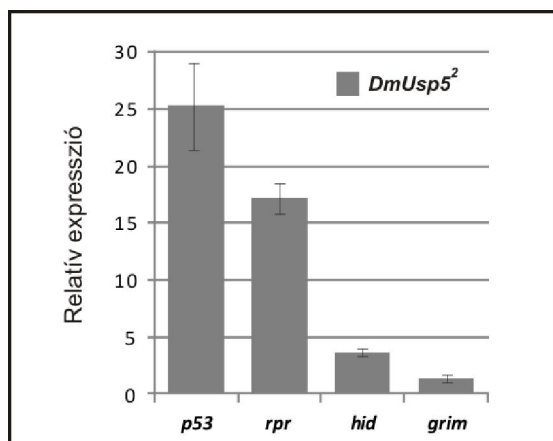
A *Drosophila* apoptotikus útvonal fő komponensei közé tartoznak az iniciátor és effektor kaszpázok, apoptózis gátló ubikvitin ligázok (inhibitor of apoptosis protein - IAP) és olyan proapoptotikus fehérjék, mint a p53, a Reaper, a Hid és a Grim (Xu és D és mtsai, 2009). Ha valamely citotoxikus hatás átlép egy küszöbértéket, a p53 és az RHG gének transzkripciósan aktiválódnak és indukálják az apoptózist. Az RHG fehérjék kötődnek a *Drosophila* IAP1 (DIAP1) BIR doménjéhez és kompetitíven blokkolják annak kaszpázgátló aktivitását. A kaszpázok így megmenekülnek a proteasomális lebontástól, aktiválódnak és indukálják az apoptózist (Broemer és Meier, 2009). Annak meghatározására, hogy a *DmUsp5* hiányában is ez az apoptotikus útvonal aktiválódik-e, szemikvantitatív RT-PCR-rel és valós idejű kvantitatív PCR-rel nyomon követtük a p53 és az RHG gének expresszióját mutáns és vadtípusú mintákban. Amint a 13. ábra mutatja, a vadtípushoz képest a *DmUsp5* mutánsban jelentősen megemelkedett a p53, a reaper és a hid gének expressziója. A legjelentősebben a p53 és a reaper fejeződött ki.



**13. ábra** A *DmUsp5* hiányában megemelkedik a proapoptotikus gének kifejezése. Vad típusú (1. oszlop), *DmUsp5* null mutáns (2. oszlop) és a *DmUsp5* mérsékelt túltermelésével menekített (3. oszlop) vándorló lárvákból össz-RNS-t izoláltunk és cDNS-t szintetizáltunk, majd a *p53*, *reaper* (*rpr*), *hid* és *grim* transzkriptumait felismer primerekkel PCR-t végeztünk telítési ciklusszám alatt. Mivel a kísérlet az 11. ábrán bemutatott kísérletben használt mintákkal készült, a *DmUsp5* és *rpL17A* bemérési kontroll expressziójára vonatkozó ábrarészlet megegyez. (MS – molekulásúly marker)

Ezeknek a proapoptotikus géneknek az expressziója a vad típusban látható mértékre szorult vissza, amikor a vad típusú *DmUsp5* szekvenciát mutáns háttéren mérsékeltén túltermeltük. A proapoptotikus *grim* expressziójának mértéke nem változott meg jelentősen a *DmUsp5* mutánsokban, ami arra utal, hogy az RHG családnak ez a képviselője nem vesz részt a mutánsok apoptotikus fenotípusának kialakításában.

A vizsgált proapoptotikus gének expressziós profiljának változását kvantitatív valós idejű PCR-rel is igazoltuk (14. ábra).



**14. ábra** A proapoptotikus gének expressziójának változása a *DmUsp5* mutánsban. Vad típusú és *DmUsp5* mutáns vándorló lárvákból össz-RNS-t izoláltunk és reverz transzkripcióval cDNS-t szintetizáltunk. Kvantitatív valós idejű PCR segítségével határoztuk meg a proapoptotikus gének expresszióját. A minták az *Actin42A* és *rpL17A* háztartási génekre voltak normalizálva. Az ábrán az egyes géneknek megfelelő mRNS szintek minden esetben a vad típushoz viszonyított relatív expresszióként szerepelnek. Az egyes oszlopok két független kísérlet átlagát és szórását mutatják.

A kísérletek eredményei arra utalnak, hogy a DmUsp5 hiánya a proapoptotikus útvonalnak legalább három szereplőt aktiválja, és az *RHG* géneket megel z en (upstream) fejt ki hatását.

## 11. A DIAP1 túltermeltetése részlegesen menekíti a DmUsp5 mutánsok letális és apoptotikus fenotípusát

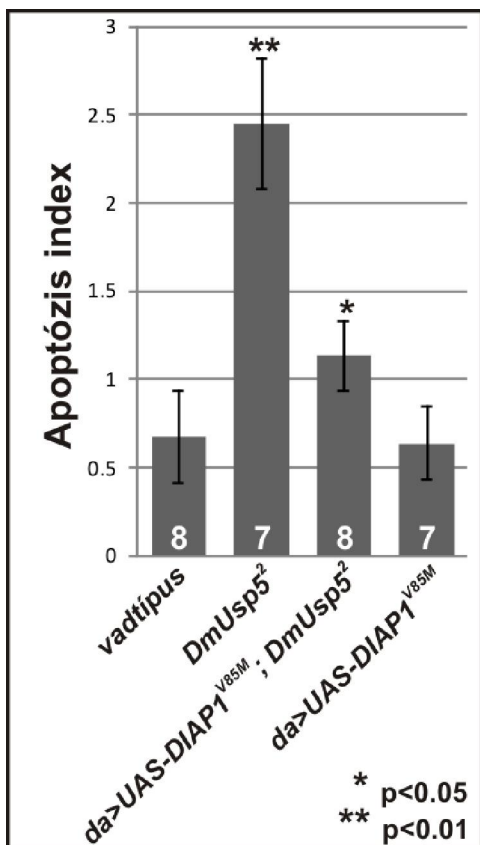
Az el z ekben említett eredmények alátámasztására meg kívántuk vizsgálni a DIAP1 szintjét a *DmUsp5* mutánsban. Ezt az indokolja, hogy ismert, a kaszpázok felszabadításán kívül a Reaper azáltal fokozza tovább az apoptózist, hogy kiváltja a DIAP1 auto-ubikvitilációját és lebontását, valamint gátolja a transzlációt (Holley és mtsai, 2002; Ryoo és mtsai, 2002). A DIAP1 szintjét közvetlenül nem tudtuk követni, viszont közvetve tudtuk vizsgálni azáltal, hogy a DIAP1-et túltermeltettük *DmUsp5* mutáns háttéren. A túltermeltetéshez itt is a *GAL4/ UAS* rendszert alkalmaztuk. Rendelkezésünkre állt egy olyan transzgénikus vonal, amely *DIAP1* szekvenciát a *GAL4* köt helye, az *UAS* szekvencia után tartalmazta, amiért a *da-GAL4* driverrel minden szövetben ki tudtuk fejeztetni. Ezenkívül a transzgén a DIAP1-nek egy olyan pontmutáns változatát kódolta, amelyben a 85. pozícióban lévő valin helyett metionin van. A V85M mutáció funkciónyeréses DIAP1-et eredményez, amely a vad típusnál egy kissé erősebben szupresszálja a Reaper-függő apoptózist (Lisi és mtsai, 2000).

A DIAP1 túltermeltetése jelentősen befolyásolta a mutánsok letális és apoptotikus fenotípusát. DIAP1 túltermelés hatására a *DmUsp5*<sup>2</sup> homozigóták vándorló lárva letális fenotípusa kitolódott bábstádiumig (6. táblázat). Evvel szemben a DIAP1 túltermelés vad típusú háttéren nem befolyásolta a muslicák életképességét, fertilitását (6. táblázat).

6. táblázat A DIAP1 túltermeltetés hatása a *DmUsp5* mutáns letálfázisára

Genotípus	Letálfázis			
	vándorló lárva	báb	farát adult	életképes
Oregon-R			5%	95%
<i>da&gt;UAS-DIAP1</i> <sup>V85M</sup>			6%	94%
<i>DmUsp5</i> <sup>2</sup> homozigóta	96%			
<i>da&gt;UAS-DIAP1</i> <sup>V85M</sup> ; <i>DmUsp5</i> <sup>2</sup> homozigóta	22%	78%		

A letálfázis meghatározással párhuzamosan a DIAP1 túltermel lárva agyából készített, orceinnel festett preparátumokon meghatároztuk az apoptózis indexet is. A DIAP1 túltermelés hatására a *DmUsp5* mutánsok agyában körülbelül 50%-al csökkent az apoptózis mértéke (15. ábra). A eredmény összhangban van azzal a feltételezéssel, hogy a *DmUsp5* hiánya gátlón hat a DIAP1 funkciójára.



**15. ábra** A DIAP1 túltermelése részlegesen menekíti a *DmUsp5* mutáns apoptotikus fenotípusát. Vadtípusú, *DmUsp5* mutáns (*DmUsp5*<sup>2</sup>), a DIAP1-et mutáns (*da>UAS-DIAP1*<sup>V85M</sup>; *DmUsp5*<sup>2</sup>) illetve vadtípusú (*da>UAS-DIAP1*<sup>V85M</sup>) háttéren túltermel lárva apoptotikus indexét határoztuk meg a 8.C ábránál ismertetett leírt módon. Az oszlopok tővéneél lévő számok azt mutatják, hogy hány független preparátum átlagát és szórását jelöli az oszlop. Preparátumonként 15-25 látómezőt számoltunk le. A statisztikai összehasonlítást kétmintás T-próbával végeztük.

Mivel a DIAP1 egy E3 ubikvitin-ligáz, melynek funkciója nagymértékben függ a rendelkezésre álló szabad ubikvitinektől, a *DmUsp5* hiánya minden bizonnyal az ubikvitin hiányon keresztül okoz zavart az apoptózis ubikvitin-függő szabályozásában.



## EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Az utóbbi évtizedek kutatásainak köszönhetően megállapítást nyert, hogy a sejtben belüli folyamatok jelentős részének szabályozásában az ubiquitiláció szerepet játszik. Az ubiquitin más fehérjékhez viszonyítva nagy koncentrációban van jelen a sejtekben szabad monomerek, szabad poliubiquitin láncok, valamint fehérjékhez konjugált mono- és poliubiquitinek formájában. Lassan kezd kirajzolódni egy kép, miszerint normális fiziológiai körülmények között a sejtben egy dinamikus egyensúlyi állapot áll fent a szabad és a kötött ubiquitin formák között (Dantuma és mtsai, 2006; Kimura és Tanaka, 2010). Ezt az egyensúlyi állapotot az egymással szemben ható ubiquitiláció és dezubiquitiláció tartja fent. A szövetek többségében egy adott időben az ubiquitineknek csak egy kisebb hányada létezik szabad monomerek formájában, a többségük fehérjékhez kötötten van jelen (Dantuma és mtsai, 2006; Kaiser és mtsai, 2011; Oh és mtsai, 2013). Számos intracelluláris folyamat verseng a limitált ubiquitin készletért, és ubiquitin-függőségükön keresztül befolyásolhatják egymás lefolyását. Ezért a sejt arra kényszerül, hogy folyamatosan biztosítsa az ubiquitin monomerek utánpótlását. Az aktív ubiquitinek a dezubiquitiláló enzimek állítják elő az újonnan szintetizált inaktív poliubiquitin fúziók processzálásával, vagy a már felhasznált ubiquitinek újrahasznosítása révén (Wilkinson, 1997; Larsen és mtsai, 1998).

Dolgozatomban, egy soksejtű modellorganizmusban, az *Drosophila melanogaster*-ben azonosítottam és vizsgáltam a dezubiquitiláló enzimeket. Megállapítottuk, hogy a *Drosophila* genomban 45 potenciális DUB-ot kódoló gén van. Úgy véljük, hogy a DUB-ok szerkezetéről rendelkezésre álló mai ismereteink alapján az összes *Drosophila* DUB-ot azonosítottuk. Megjegyzem, hogy egy 2012-ben megjelent közlemény 41 *Drosophila* DUB-ot (Tsou és mtsai, 2012), míg egy másik, amely a *Drosophila* DUB-oknak a Notch jelátviteli útban játszott szerepét vizsgálta, 45 *Drosophila* DUB-ot azonosított (Zhang és mtsai, 2012). Úgy gondoljuk, hogy a DUB enzimosztálynak 45-nél nincs több képviselője *Drosophilában*. Elképzelhető azonban, hogy ahogy a DUB-okról szóló ismereteink gyarapodnak, teljesen más szerkezetű enzimekről is bebizonyosodik, hogy képesek az ubiquitin-ubiquitin vagy ubiquitin-szubsztrátfehérje közötti kötéseket hasítani, és a *Drosophilában* is felül kell majd vizsgálnunk a DUB-ok számát.

A dezubiquitiláló enzimek egy evolúciósan konzervált fehérjecsaládot képeznek, az eukariota törzsféjlen és mindegyik pontján jelen vannak, az élesztőtől az emberig. Erre utal az eredményünk is, hogy a legtöbb élesztő DUB-nak van *Drosophila* ortológja és minden

Drosophila DUB-nak ismert a humán megfelelője. A DUB-ok funkcionális jelentőségére utal, hogy a Drosophila DUB-ok 60%-a esszenciális, hiányukban a muslicák életképtelenek.

Kíváncsiak voltunk a Drosophila DUB-ok szerepére olyan fiziológiai folyamatokban, amelyek elsősorban az ubiquitiláció révén szabályozódnak. Egyik ilyen folyamat az apoptózis. Korábban két Drosophila DUB, a DUBAI és az Usp8/Ubpy esetében már kimutatták, hogy szerepük van az DIAP1 függő apoptózis szabályozásában (Yang és mtsai, 2014), de az összes Drosophila DUB-ra kiterjedő vizsgálatot még nem végeztek. A DUB gének szemspecifikus csendesítésével további hat DUB-ról mutattuk ki, hogy hiányuk apoptózishoz vezet. A *DUBAI* gén csendesítése a mi rendszerünkben nem vezetett apoptotikus fenotípushoz. Ennek a különbségnek az az oka, hogy míg Yang és munkatársai a proapoptotikus gének túltermelésével érzékenyített háttéren vizsgálták ennek a génnek a funkcióját, mi nem érzékenyített, vad típusú háttéren dolgoztunk. Eredményeink arra utalnak, hogy az ubiquitilációhoz hasonlóan a dezubikvitiláció is részt vesz az apoptózis szabályozásában.

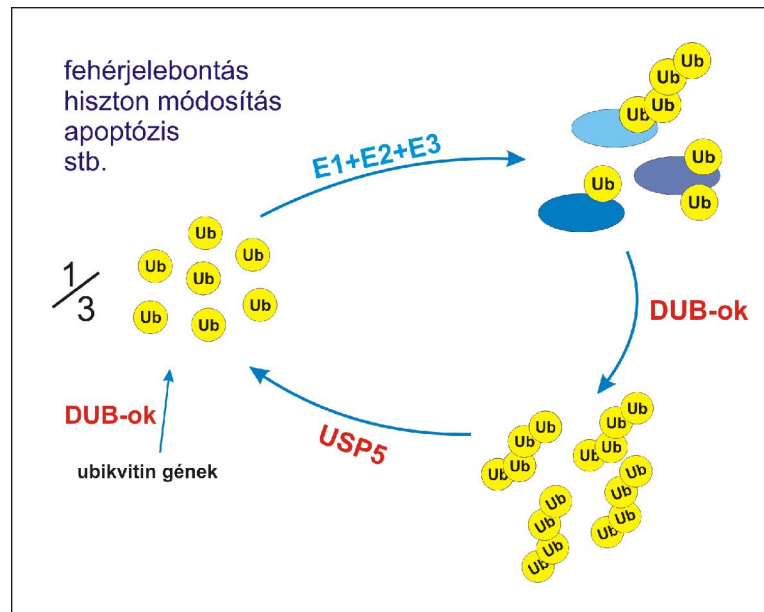
A továbbiakban az *CG12082* gén funkcióját vizsgáltam, mert az apoptotikus fenotípusa alapján ez a gén érdekesnek tűnt, viszont funkciója még ismeretlen volt. Heterológ komplementációs kísérlettel bizonyítottuk, hogy ez a gén az élesztő *Ubp14* és a humán *USP5*/Izopeptidáz-T dezubikvitiláló enzim Drosophila ortológját kódolja. Ezen túlmenően, *in vivo* kísérletekkel mutattuk be, hogy a *DmUsp5* fontos szerepet játszik az intracelluláris ubiquitin szint fenntartásában. A *DmUsp5* funkcióvesztéses mutánsaiban megnövekedett a szabad és kötött poliubikvitinek koncentrációja és ezzel párhuzamosan csökkent a szabad ubiquitin monomerek mennyisége. Az, hogy a szabad poliubikvitin láncok felhalmozódnak, egybevág azokkal a más organizmusokon végzett *in vitro* és *in vivo* biokémiai vizsgálatok eredményeivel, amelyek szerint az enzim fő funkciója a szabad ubiquitin láncok ubiquitin monomerekké hasítása (Wilkinson és mtsai, 1995; Falquet és mtsai, 1995; Amerik és mtsai, 1997; Dayal és mtsai, 2009). A nagy molekulású tartományban mozgó, poliubikvitilált fehérjék akkumulációja minden bizonnyal azzal a ténnyel magyarázható, hogy a szabad poliubikvitin láncok nagy affinitással képesek kötni azokhoz a poliubikvitin receptorokhoz, amelyek a poliubikvitilált szubsztrátokat a proteasómához szállítják (Deveraux és mtsai, 1994; Beal és mtsai, 1996). Ha tehát a szabad poliubikvitin láncok fölöslegben vannak, kompetitíven gátolják a poliubikvitilált fehérjék proteasomális degradációját. A lebontatlan poliubikvitilált fehérjék felhalmozódnak, és a Western blottal kimutathatóak. A proteasóma alegységek szintézisének koordinált megemelkedése a *DmUsp5* mutánsokban az úgynevezett

proteaszóma stressz jele (Hanna és mtsai, 2007), ami szintén a proteaszóma aktivitás gátlására utal.

A *DmUsp5* mutánsokban a szabad monoubikvitin mennyiségének csökkenését is tapasztaltuk. Felmerül a kérdés, hogy vajon egy kritikus fiziológiai küszöb alá csökken a monoubikvitinek koncentrációja? Az ubikvitin stresszválasz indukciója ezekben a mutánsokban arra utal, hogy a monoubikvitin szint csökkenése komoly fiziológiai következményekkel jár. Az élesztőben leírt ubikvitin stressz jellegzetességei kimutathatóak a *Drosophila DmUsp5* mutánsokban is: a *DmUsp5* hiánya domináns cikloheximid érzékenységet eredményez (12. ábra), ami mind a *DmUsp14*, mind a proteaszóma alegységeket kódoló gének fokozott expressziójával társul (11. ábra). Az eredmények együttesen arra utalnak, hogy a *DmUsp5* funkciója a szabad monoubikvitin-készlet, az ubikvitin egyensúly fenntartása *Drosophilában*. Abban az esetben, ha sérül a funkciója, ennek a limitált készletnek a kimerülése az ubikvitin homeosztázis felborulásához vezet.

A *DmUsp5* mutánsok másik szembeötlő tulajdonsága, hogy imaginális szöveteikben abnormálisan magas az apoptotikus sejtek száma. Menekítési kísérleteink eredményei arra utalnak, hogy a mutánsok későbbi lárva letalitásáért az apoptózis indukciója felelős, ami közvetlenül köthető a monoubikvitin-készlet kimerüléséhez. Az apoptózis egyike az ubikvitin-függő folyamatoknak, amely elsősorban a DIAP1 és az irányított fehérje lebontás negatív szabályozása alatt áll *Drosophilában*. A DIAP1 a sejtek túlélését biztosítja úgy, hogy az E3 ubikvitin-ligáz aktivitásával alacsony szinten tartja a kaspázok és a proapoptotikus IAP antagonisták mennyiségét, stabilitását. A fentiekből az következik, hogy az ubikvitináció szükséges a DIAP1 antiapoptotikus aktivitásához és valószínűleg az, hogy az ubikvitin hiány önmagában vagy az abnormálisan magas poliubikvitinnekkel és a gátolt fehérjelebontással együtt egy olyan szignált generál, amely a pro-apoptotikus mechanizmusokat aktiválja és a *DmUsp5* mutánsok apoptotikus fenotípusát eredményezi. Ezt a feltételezést támasztja alá a *p53* és az *RHG* gének egy részének megemelkedett expressziója. Habár az apoptózis aktivációjának pontos mechanizmusát nem tisztáztuk, azt gondoljuk, hogy *DmUsp5* mutánsokban az apoptotikus szignálnak időben az *RHG* gének transzkripciójának aktiválása előtt kell keletkeznie. Ismert, hogy a proteaszóma gátlása szintén a monoubikvitin készlet kimerülésével és apoptózissal jár. Megfigyelték, hogy a monoubikvitin készlet kimerülésekor a fenti sejtmagi lokalizációt mutató konjugált ubikvitinek a citoplazmába vándorolnak. A változás együtt jár az ubikvitilált H2A mennyiségének csökkenésével, amely kromatin átrendeződéseket is eredményez (Dantuma és mtsai, 2006). Azt feltételezik, hogy az ubikvitinek mobilizálása a hisztonokról és sejten belüli lokalizációjának megváltozása

annak a következménye, hogy az egyes folyamatok versengenek a limitált mennyiség monoubikvitinért (16. ábra). Vagyis a szabad ubikvitinek megfelelő koncentrációjának biztosítása elsődleges fontosságú a sejt számára.



**16. ábra. A sejt ubikvitin körforgásának modellje.** A teljes ubikvitin-készlet körülbelül egyharmada szabad ubikvitin monomer, kétharmada pedig kötött formában van. Az arány fenntartásában az ellentétes irányban ható ubikvitiláció (E1+E2+E3) és a dezubikvitiláció játszik szerepet. A limitált mennyiség monoubikvitin készletet a DUB-ok tartják fenn az ubikvitin szintézis és újrahasonosítás révén. A különböző ubikvitilációval szabályozott folyamatok (lilával) versengenek a korlátozott mennyiség ubikvitinért.

Ismert, hogy a hiszton ubikvitiláció jelentős hatással van a génexpresszióra (Mimnaugh és mtsai, 1997), illetve a H2A ubikvitiláció a Polycombok által szabályozott gének repressziójához vezet (Wang és mtsai, 2004). Feltételezhetjük, hogy az ubikvitin-készlet tartós kimerülése proteaszóma gátlás, vagy DmUsp5 hiány esetén olyan változásokat idéz el a kromatin szerkezetében, amely az *RHG* gének megemelkedett expressziójához vezet. A korlátozott mennyiség szabad ubikvitin az, ami a szabályozott fehérjelebontást összekapcsolja az egyedfejlődéssel és az apoptózissal, azáltal hogy ezeket az ubikvitilációval szabályozott folyamatokat egymástól kölcsönösen függvé teszi. A *DmUsp5* funkcióvesztéses mutációkban tapasztalt pleiotróp hatások összessége arra utal, hogy az *DmUsp5*-nek kitüntetett szerepe van a szabad monoubikvitin készlet szabályozásában.

Miközben dolgozatomat készítettem, megjelent egy közlemény Wang és munkatársainak munkájáról (Wang és mtsai, 2014). Wang és munkatársai szintén a *CG12082* gén szerepét vizsgálták a *Drosophila* egyedfejlődésében. Szerkezeti hasonlóság alapján kikísérletelték, hogy a *CG12082* az *USP5* *Drosophila* ortológját kódolja. A szerkezeti hasonlóságot mi is megállapítottuk, ráadásul heterológ menekítési kísérlettel a funkcionális homológiát is bizonyítottuk. Wang és munkatársai egy deléción és két aminosav

szubsztitúciós mutáns vizsgálatával bizonyították, hogy a *DmUsp5* funkciója szükséges az állatok egyedfejléséhez. Megállapították, hogy a *DmUsp5* null mutáns harmadik stádiumos lárvaként pusztul el. A *DmUsp5* génre mi is elállítottunk null mutánsokat a génbe inszertálódott P elemek remobilizációjával. A *DmUsp5* deléziós mutánsokról megállapítottuk, hogy vándorló harmadik stádiumos lárvaként pusztulnak el. Mivel Wang és munkatársai nem közölnek több részletet a *DmUsp5* null mutáns letálfázisáról, nem tudjuk, hogy az esetükben a harmadik stádiumos lárvák elérték-e vándorló stádiumot. Fölöttébb különös, hogy Wang és munkatársai egy olyan P elemet használtak a deléziós null allél elállításához, amely a szomszédos *BtbVII* génben található és a képződött deléció a *DmUsp5* start kódján kívül a *BtbVII* 5' nem kódoló régiójának csaknem felét is eltávolítja. Ugyanakkor a *DmUsp5* transzgenikus termeltetésével menekíteni tudták a *DmUsp5* deléziós mutáns fenotípusát, így bizonyították, hogy a mutáns fenotípust valóban a *DmUsp5* hiánya okozza. Wang és munkatársai western blottal kimutatták, hogy a *DmUsp5* mutánsban felhalmozódnak a szabad és a kötött poliubikvitin láncok. A mi kísérleteink is igazolták a szabad és kötött poliubikvitinek akkumulációját. Velünk ellentétben, Wang és munkatársai vizsgálták a felhalmozódó poliubikvitin láncok típusát is. Megállapították, hogy a *DmUsp5* hiányában a K48 típusú poliubikvitin láncok halmozódnak fel. A K48 poliubikvitinek jellemzően a proteasomális degradációban játszanak szerepet. Wang és munkatársai kimutatták, hogy a *DmUsp5* mutánsokban túlexpresszálódnak a proteasóma alegységei, és a proteasomális fehérjelebontás gátolt. A mi RT-PCR adataink is azt mutatták, hogy a *DmUsp5* hiányában megemelkedik egyes proteasóma alegységek génjeinek expressziója. A proteasomális lebontás gátását közvetlen módon mi nem vizsgáltuk. Velünk ellentétben Wang és munkatársai nem vizsgálták a *DmUsp5* hiányában fellépő ubikvitin stressz lehetőségét. Mi a *DmUsp5* mutánsokban kimutattuk a *DmUsp14* megemelkedett expresszióját és a fokozott cikloheximid érzékenységet, amelyek igazolják az ubikvitin stresszet. A cikloheximid etetési kísérlettel kiderítettük, hogy a fokozott ubikvitin hiány esetén a *DmUsp5* deléció haplo-elégtelen természetű. A *DmUsp5* mutációk haplo-elégtelen természetét Wang és munkatársai munkájából nem derül ki. Wang és munkatársai nem vizsgálták a *DmUsp5* mutánsok egyedfejlési defektusa mögött álló fiziológiai elváltozásokat. Fan és munkatársai közleményére (Fan X és mtsai, 2014) hivatkozva, Wang és munkatársai azt feltételezik, hogy a fejlési defektusok hátterében a fokozott apoptózis áll. Fan és munkatársai csak a lárvális szemdiszkuszra vonatkozóan közöltek adatokat, nem bizonyítják, hogy a többi lárvális imágókorongban is apoptózis történik. Mi a *DmUsp5* mutánsok láb imágókorongjában, illetve a lárvális agyban is kimutattuk a nagymértékű apoptózist. Eredményeink alapján biztosan

állítható, hogy a *DmUsp5* mutánsok vándorló harmadik stádiumos lárvaletalitásáért az imágókorongok apoptotikus pusztulása felelős. Összességében megállapíthatjuk, hogy Wang és munkatársainak közleménye, valamint a mi munkánk számos ponton alátámasztja, illetve kölcsönösen kiegészíti egymást. A két cikk együttesen hozzájárul ahhoz, hogy minél teljesebb képet kapjunk a *DmUsp5* gén kódolásáról *Drosophila*-ban.

Munkánk során meglepő eredményeket tapasztaltunk, hogy a vad típusú *DmUsp5* gén expressziójának túlzott mértékű növelése gátolta a proteasomális fehérjedegradációt és az egyedfejlődést. A túlzott mértékű fehérjetermelés mértéke függött a genomi környezettől és a nevelési hőmérséklettől (5. táblázat). Ha a túlzott mértékű fehérjetermelést *da-GAL4* driverrel indukáltuk különböző hőmérsékleteken, akkor a tömörítő fehérjékben rekedt ubiquitilált aggregátum mennyisége növekedett a hőmérséklet emelkedésével (IV. melléklet), ami fordítottan arányos volt a letálfázis eltolódásával: az erősebb expresszió korábbi letalitáshoz vezetett. A nagy molekulahúlyú ubiquitilált formáknak az elektroforetikus mobilitása hasonló volt ahhoz, amit a gyengén oldható fehérje aggregátumoknál, például az alfa-szinukleinnél vagy a Huntingtinnél tapasztaltak (Junn és mtsai, 2003; Hipp és mtsai, 2012). A jelenség egy lehetséges magyarázata, hogy a nagy mennyiségben, ektopikusan expresszált *DmUsp5* túlzottan a fehérjék megfelelő feltekeredését biztosító mechanizmusokat, ami hibás térszerkezetű fehérjéket eredményez. A rosszul tekeredett fehérjék hajlamosak az aggregációra (Ecroyd és Carver, 2008). A hibás szerkezetű fehérjék degradatív célból ubiquitilálódnak. Az azonban ismert, hogy az aggregációra hajlamos fehérjék veszélyes proteasóma szubsztrátok, mivel aggregálódott fehérjék gátolják a proteasóma aktivitását (Bence és mtsai, 2001; Snyder és mtsai, 2003). A gátlás pontos mechanizmusa nem ismert, de azt feltételezik, hogy a proteasómák ugyan megkötik az aggregálódott fehérjéket, de sem lebontani sem elengedni nem tudják, „eltömődnek” (Bence és mtsai, 2001). Más proteasómagátló hatáshoz hasonlóan, az „eltömődés” is az ubiquitin homeosztázis felborulásához vezet, amely magyarázza a *DmUsp5* gén túlzott mértékű expressziójának letális fenotípusát.

Számos humán neurodegeneratív betegség az ubiquitilációs folyamatok zavarásával és a poliubiquitilált aggregátumok felhalmozódásával jár (Atkin és Paulson, 2014). Egyik poliubiquitilált fehérjeaggregátumok felhalmozódásával járó neurodegeneratív betegség a Huntington kór. A Huntington kór az ún. triplett-expanziós betegségek egyike. A *huntingtin* génben a CAG (glutamin) kódok száma megnövekszik, és a Huntington fehérje poliglutamin doménjének hosszabbodásához vezet (Myers és mtsai, 1993). A kóros állapot kialakulásának feltétele az, hogy a glutamin ismétlődések száma 38 fölé emelkedjen (Chong és mtsai, 1997). Az ismétlődések magas száma a toxikus fehérje termeléséhez vezet. Mivel a gén egyetlen,

38 fölötti triplétt-expanziós példányáról is elegendő, betegséget okozó toxikus fehérje termelődik, a Huntington kór domináns örökletes betegség. A rendellenesen magas poliglutamin ismétlődéseket hordozó Huntingtin aggregátumokat képez, amely a neuronok pusztulását okozza, és a Huntington kór tüneteinek megjelenéséhez vezet. A Huntington kór tünetei a mentális hanyatlás, a hangulatingadozás, a mozgáskoordináció súlyos zavara, és a fékezhetetlen rohamokban bekövetkező rángatózás (Walker, 2007). A görcsös rángatózások miatt a Huntington kórt magyarul még vitustáncnak is nevezik. A betegséget hisztopatológiailag a striális és kortikális neuronok degenerációja jellemzi. Ezekben a neuronokban a Huntingtin-aggregátumok vannak (DiFiglia és mtsai, 1997). Kimutatták, hogy az aggregálódott Huntingtin nagymértékben poliubikvitilált. A nagymértékű poliubikvitiláció az ubikvitin-proteaszóma rendszer hibájára utal. Feltételezik, hogy a kiterjedt poliglutamin domént hordozó, ubikvitilált Huntingtint a proteaszóma nem képes lebontani, így az ubikvitilált Huntingtin akkumulálódik. Az akkumulálódott Huntingtin a proteaszómához kötötten marad. A poliglutamin-aggregátumokban az ubikvitin-proteaszóma rendszer számos komponense kimutatható, magukat a proteaszómákat is beleértve (Suhr és mtsai, 2001). A proteaszómák gátlása és kivonása a rendszerből proteaszóma stresszt okoz és további poliubikvitilált fehérjék akkumulálódásához vezet. Amint a mi munkánk is igazolta, a poliubikvitilált fehérjék akkumulálódása az ubikvitin készlet kimerüléséhez és az ubikvitin homeosztázis felborulásához vezet. Elképzelhető, hogy a Huntington kórban is az ubikvitin egyensúly megbomlása okozza a neuronok pusztulását. Ismert, hogy a neuronok pusztulása ebben a betegségben is az apoptózis indukciója miatt következik be (Hickey és Chesselet, 2003). A Huntington kórban a *Drosophila* modellt is elkészítették (Krench és Littleton, 2013). A *Drosophila* szemben termeltetett toxikus Huntingtin csökevényes szemfenotípushoz vezet. A csökevényes szemfenotípus az apoptózisra utal, és hasonló tapasztaltunk mi is a *DmUsp5* szemben történő csendesítésekor. Feltételezhetjük, hogy a Huntington kór és más triplétt-expanziós neurodegeneratív betegségek végső soron az ubikvitin homeosztázis zavara miatt vezetnek apoptózishoz. Az ubikvitin homeosztázis zavarának tanulmányozása például a *DmUsp5* mutánsokban vagy a *DmUsp5*-öt erősen túltermelő muslicákban közelebb vihet akár a Huntington kór alaposabb megértéséhez is. Felmerül a kérdés, hogy milyen szerepe lehet a dezubikvitiláló enzimeknek a Huntington kórban? Eddig csak egy DUB-ot, az UCHL1-et hozták kapcsolatba a Huntington kórral, de szerepe itt még nem tisztázott (Xu E és mtsai, 2009). Az *Drosophila* DUB-ok azonosításával és elzeteles jellemzésével egy olyan eszköztár került a kezünkbe, amelynek segítségével hatékonyan vizsgálhatjuk a DUB-ok szerepét a Huntington kórban, *Drosophila* modellen.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, dr. Deák Péternek, amiért lehetőséget adott, hogy kutatócsoportjában elsajátítsam a genetikai és molekuláris biológiai technikákat és ismereteket. Hálás vagyok, hogy tanácsaival precíz és önálló kutatómunkára tanított. Köszönöm állandó támogatását, a dolgozatom megírásához nélkülözhetetlen segítségét és türelmét. Hálás vagyok dr. Pál Margitnak, hogy rendkívüli türelemmel megtanított a genetika és molekuláris biológia gyakorlati alkalmazására. Köszönöm a kísérletekben nyújtott segítségét és barátságát. Köszönöm dr. Udvardy Andornak a biokémiai kísérletekkel kapcsolatos nélkülözhetetlen útmutatásait és állandó jó tanácsait. Köszönöm dr. Nagy Olgának a *Drosophila* technikák és az élesztő munka fortélyainak megtanítását, az agypreparátumok készítésében nyújtott segítségét és barátságát. Köszönöm a szüleimnek és kedvesemnek, Saroltának a támogatását és biztatását.



## IRODALOMJEGYZÉK

1. Ambroggio XI, Rees DC, Deshaies RJ (2004) JAMM: a metalloprotease-like zinc site in the proteasome and signalosome. *PLoS Biol.* 2, e2. 10.1371/journal.pbio.0020002.
2. Amerik AY, Li SJ, Hochstrasser M (2000) Analysis of the deubiquitinating enzymes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Chem.* 381(9-10):981-992.
3. Amerik AY, Swaminathan S, Krantz, BA, Wilkinson KD, Hochstrasser M (1997) In vivo disassembly of free polyubiquitin chains by yeast Ubp14 modulates rates of protein degradation by the proteasome. *EMBO J* 16: 4826-4838.
4. Atkin G, Paulson H (2014) Ubiquitin pathways in neurodegenerative disease. *Front Mol Neurosci.* 7:63.
5. Bader M, Steller H (2009) Regulation of cell death by the ubiquitin-proteasome system. *Curr Opin Cell Biol* 21: 878-884.
6. Bainbridge SP, Bownes M (1981) Staging the metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol* 66: 57-80.
7. Bateman JR, Lee AM, Wu CT (2006) Site-specific transformation of *Drosophila* via phiC31 integrase-mediated cassette exchange. *Genetics.* 173(2):769-777.
8. Beal R, Deveraux Q, Xia G, Rechsteiner M, Pickart C (1996) Surface hydrophobic residues of multiubiquitin chains essential for proteolytic targeting. *Proc Natl Acad Sci* 93: 861-866.
9. Bence NF, Sampat RM, Kopito RR (2001) Impairment of the Ubiquitin-Proteasome System by Protein Aggregation. *Science* 292: 1552-1555.
10. Braid LR, Verheyen EM (2008) *Drosophila nemo* promotes eye specification directed by the retinal determination gene network. *Genetics* 180:283-299.
11. Broemer M, Meier P (2009) Ubiquitin-mediated regulation of apoptosis. *Trends Cell Biol* 19: 130-140.
12. Chen PC, Bhattacharyya BJ, Hanna J, Minkel H, Wilson JA, Finley D, Miller RJ, Wilson SM (2011) Ubiquitin homeostasis is critical for synaptic development and function. *J Neurosci.* 31(48):17505-17513.
13. Chen X, Zhang B, Fischer JA (2002) A specific protein substrate for a deubiquitinating enzyme: liquid facets is the substrate of Fat facet. *Genes Dev.* 16: 289–294.
14. Chen ZJ, Parent L, Maniatis T (1996) Site-specific phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell.* 84(6):853-862.

15. Chernova TA, Allen KD, Wesoloski LM, Shanks JR, Chernoff YO et al. (2003) Pleiotropic effects of Ubp6 loss on drug sensitivities and yeast prion are due to depletion of the free ubiquitin pool. *J Biol Chem* 278: 52102-52115.
16. Chong SS, Almqvist E, Telenius H, LaTray L, Nichol K, Bourdelat-Parks B, Goldberg YP, Haddad BR, Richards F, Sillence D, Greenberg CR, Ives E, Van den Engh G, Hughes MR, Hayden MR (1997) Contribution of DNA sequence and CAG size to mutation frequencies of intermediate alleles for Huntington disease: evidence from single sperm analyses. *Hum Mol Genet.* 6(2):301-309.
17. Clague MJ, Barsukov I, Coulson JM, Liu H, Rigden DJ, Urbé S (2013) Deubiquitylases from genes to organism. *Physiol Rev.* 93(3):1289-1315.
18. Dantuma NP, Groothuis TA, Salomons FA, Neefjes J (2006) A dynamic ubiquitin equilibrium couples proteasomal activity to chromatin remodeling. *J Cell Biol* 173: 19-26.
19. Dayal S, Sparks A, Jacob J, Allende-Vega N, Lane DP, Saville MK (2009) Suppression of the deubiquitinating enzyme USP5 causes the accumulation of unanchored polyubiquitin and the activation of p53. *J Biol Chem.* 284(8):5030-5041.
20. Deveraux Q, Ustrell V, Pickart C, Rechsteiner M (1994) A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J Biol Chem* 269: 7059-7061.
21. Dietzl G, Chen D, Schnorrer F, Su KC, Barinova Y, Fellner M, Gasser B, Kinsey K, Oppel S, Scheiblaue S, Couto A, Marra V, Keleman K, Dickson BJ (2007) A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature.* 448(7150):151-156.
22. DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, Aronin N (1997) Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science.* 277(5334):1990-1993.
23. Ditzel M, Broemer M, Tenev T, Bolduc C, Lee TV, Rigbolt KT, Elliott R, Zvelebil M, Blagoev B, Bergmann A, Meier P (2008) Inactivation of effector caspases through nondegradative polyubiquitylation. *Mol Cell.*;32(4):540-553.
24. Dupré S, Haguenaer-Tsapis R (2001) Deubiquitination step in the endocytic pathway of yeast plasma membrane proteins: crucial role of Doa4p ubiquitin isopeptidase. *Mol Cell Biol.* 21(14):4482-4494.
25. Ecroyd H, Carver JA (2008) Unraveling the mysteries of protein folding and misfolding. *IUBMB Life.* 60: 769-774.

26. Falquet L, Paquet N, Frutiger S, Hughes GJ, Hoang-Van K et al. (1995) A human de-ubiquitinating enzyme with both isopeptidase and peptidase activities in vitro. *FEBS Lett* 359: 73-77.
27. Fan X, Huang Q, Ye X, Lin Y, Chen Y, Lin X et al. (2014) *Drosophila* USP5 controls the activation of apoptosis and the Jun N-terminal kinase pathway during eye development. *PLoS One*. 9:3.
28. Fan Y, Wang S, Hernandez J, Yenigun VB, Hertlein G, Fogarty CE et al. (2014) Genetic models of apoptosis-induced proliferation decipher activation of JNK and identify a requirement of EGFR signaling for tissue regenerative responses in *Drosophila*. *PLoS Genet*. 10:1.
29. Finley D, Ozkaynak E, Varshavsky A (1987) The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. *Cell* 48, 1035-1046.
30. Finley, D, Bartel, B, and Varshavsky, A (1989) The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. *Nature* 338, 394-401.
31. Fischer U, Jänicke RU, Schulze-Osthoff K (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*. 10(1):76-100.
32. Fowden L, Lewis D, Tristram H (1967) Toxic amino acids: their action as antimetabolites. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*.29:89-163.
33. Hadari T, Warms JV, Rose IA, Hershko A (1992) A ubiquitin C-terminal isopeptidase that acts on polyubiquitin chains. Role in protein degradation. *Biol Chem* 267: 719-727.
34. Hanna J, Hathaway NA, Tone Y, Crosas B, Elsasser S et al. (2006) Deubiquitinating enzyme Ubp6 functions noncatalytically to delay proteasomal degradation. *Cel*. 127: 99-111.
35. Hanna J, Leggett DS, Finley D (2003) Ubiquitin depletion as a key mediator of toxicity by translational inhibitors. *Mol Cell Biol* 23: 9251-9261.
36. Hanna J, Meides A, Zhang DP, Finley D (2007) A ubiquitin stress response induces altered proteasome composition. *Cell* 129: 747-759.
37. Hay BA (2000). Understanding IAP function and regulation: a view from *Drosophila*. *Cell Death Differ*. 7(11):1045-1056.
38. Hay BA, Guo M (2006) Caspase-dependent cell death in *Drosophila*. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 22: 623-650.
39. Hays R, Wickline L, Cagan R (2002) Morgue mediates apoptosis in the *Drosophila melanogaster* retina by promoting degradation of DIAP1. *Nat Cell Biol*. 4(6):425-431.

40. Hershko A, Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67: 425-479.
41. Hickey MA, Chesselet MF (2003) Apoptosis in Huntington's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 27(2):255-265.
42. Hipp MS, Patel CN, Bersuker K, Riley BE, Kaiser SE, Shaler TA, Brandeis M, Kopito RR (2012) Indirect inhibition of 26S proteasome activity in a cellular model of Huntington's disease. *J Cell Biol*. 196(5):573-587.
43. Hochstrasser M (1996) Protein degradation or regulation: Ub the judge. *Cell*. 84(6):813-815.
44. Holley CL, Olson MR, Colón-Ramos DA, Kornbluth S (2002) Reaper eliminates IAP proteins through stimulated IAP degradation and generalized translational inhibition. *Nat Cell Biol* 4:439-444.
45. Hu M, Li P, Song L, Jeffrey PD, Chenova TA, Wilkinson KD, Cohen RE, Shi Y (2005) Structure and mechanisms of the proteasome-associated deubiquitinating enzyme USP14. *EMBO J*. 24(21):3747-3756.
46. Hurley JH, Lee S, Prag G (2006) Ubiquitin-binding domains. *Biochem J*. 399(3):361-372.
47. Ju D, Wang L, Mao X, Xie Y (2004) Homeostatic regulation of the proteasome via an Rpn4-dependent feedback circuit. *Biochem Biophys Res Commun* 321: 51-57.
48. Junn E, Ronchetti RD, Quezado MM, Kim SY, Mouradian MM (2003) Tissue transglutaminase-induced aggregation of alpha-synuclein: Implications for Lewy body formation in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100: 2047-2052.
49. Kaiser SE, Riley BE, Shaler TA, Trevino RS, Becker CH, Schulman H, Kopito RR. (2011) Protein standard absolute quantification (PSAQ) method for the measurement of cellular ubiquitin pools. *Nat Methods*. 8(8):691-696.
50. Kimura Y, Tanaka K (2010) Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis. *J Biochem* 147: 793-798.
51. Kimura Y, Yashiroda H, Kudo T, Koitabashi S, Murata S, Kakizuka A, Tanaka K (2009) An inhibitor of a deubiquitinating enzyme regulates ubiquitin homeostasis. *Cell*. 137(3):549-559.
52. Komander D, Clague MJ, Urbé S (2009) Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10(8):550-563.
53. Komander D, Rape M (2012) The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem*. 81:203-229.

54. Koulich E, Li X, DeMartino GN (2008) Relative structural and functional roles of multiple deubiquitylating proteins associated with mammalian 26S proteasome. *Mol Biol Cell.* 19(3):1072-1082.
55. Krench M, Littleton JT (2013) Modeling Huntington disease in *Drosophila*: Insights into axonal transport defects and modifiers of toxicity. *Fly (Austin).* 7(4):229-236.
56. Larsen CN, Krantz BA, Wilkinson KD (1998) Substrate specificity of deubiquitinating enzymes: ubiquitin C-terminal hydrolases. *Biochemistry.* 37(10):3358-3368.
57. Li M, Chen D, Shiloh A, Luo J, Nikolaev AY, Qin J, Gu W (2002) Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature.* 416(6881):648-653.
58. Li Y, Wang Y (2013) Ras protein/cAMP-dependent protein kinase signaling is negatively regulated by a deubiquitinating enzyme, Ubp3, in yeast. *J Biol Chem.* 288(16):11358-65.
59. Lisi S, Mazzon I, White K (2000) Diverse domains of THREAD/DIAP1 are required to inhibit apoptosis induced by REAPER and HID in *Drosophila*. *Genetics.* 154(2):669-678.
60. Matsui S, Sandberg AA, Negoro S, Seon BK, Goldstein G (1982) Isopeptidase: a novel eukaryotic enzyme that cleaves isopeptide bonds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Mar;79(5):1535-1539.
61. Mayer AN, Wilkinson KD (1989) Detection, resolution, and nomenclature of multiple ubiquitin carboxyl-terminal esterases from bovine calf thymus. *Biochemistry.* 28(1):166-172.
62. Miller HI, Henzel WJ, Ridgway JB, Kuang WJ, Chisholm V, Liu CC (1989) Cloning and Expression of a Yeast Ubiquitin-Protein Cleaving Activity in *Escherichia Coli*. *Nature Biotechnology* 7: 698-704.
63. Mimnaugh EG, Chen HY, Davie JR, Celis JE, Neckers L (1997) Rapid deubiquitination of nucleosomal histones in human tumor cells caused by proteasome inhibitors and stress response inducers: effects on replication, transcription, translation, and the cellular stress response. *Biochemistry.* 36:14418-14429.
64. Mocciaro A, Rape M (2012) Emerging regulatory mechanisms in ubiquitin-dependent cell cycle control. *J Cell Sci.* 125: 255-263.
65. Mukai A, Yamamoto-Hino M, Awano W, Watanabe W, Komada M, Goto S (2010) Balanced ubiquitylation and deubiquitylation of Frizzled regulate cellular responsiveness to Wg/Wnt. *EMBO J.* 29(13):2114-2125.
66. Muratani M, Tansey WP (2003) How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(3):192-201.

67. Myers RH, MacDonald ME, Koroshetz WJ, Duyao MP, Ambrose CM, Taylor SA, Barnes G, Srinidhi J, Lin CS, Whaley WL, et al. (1993) De novo expansion of a (CAG)<sub>n</sub> repeat in sporadic Huntington's disease. *Nat Genet.* 5(2):168-173.
68. Nakajima S, Lan L, Wei L, Hsieh CL, Rapi-Otrin V, Yasui A et al. (2014) Ubiquitin-specific protease 5 is required for the efficient repair of DNA double-strand breaks. *PLoS One.* 9:1.
69. Nanao MH, Tcherniuk SO, Chroboczek J, Dideberg O, Dessen A, Balakirev MY (2004). Crystal structure of human otubain 2. *EMBO Rep.* 5, 783–788.
70. Neves-Carvalho A, Logarinho E, Freitas A, Duarte-Silva S, Costa Mdo C, Silva-Fernandes A, Martins M, Serra SC, Lopes AT, Paulson HL, Heutink P, Relvas JB, Maciel P (2015) Dominant negative effect of polyglutamine expansion perturbs normal function of ataxin-3 in neuronal cells. *Hum Mol Genet.* 24(1):100-117.
71. Nijman SM, Luna-Vargas MP, Velds A, Brummelkamp TR, Dirac AM, Sixma TK, Bernards R (2005) A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell.* 123(5):773-786.
72. Oh C, Yoon JH, Park S, Yoo YJ (2013) Simultaneous quantification of total and conjugated ubiquitin levels in a single immunoblot. *Anal Biochem* 443: 153-155.
73. Osley MA, Fleming AB, Kao CF (2006) Histone ubiquitylation and the regulation of transcription. *Results Probl Cell Differ.* 41:47-75.
74. Pál M, Nagy O, Ménesi D, Udvardy A, Deák P (2007) Structurally related TPR subunits contribute differently to the function of the anaphase-promoting complex in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Sci* 120: 3238-3248.
75. Pickart CM (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70: 503-533.
76. Pickart CM, Eddins MJ (2004) Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 1695(1-3):55-72.
77. Ramos PC, Höckendorff J, Johnson ES, Varshavsky A, Dohmen RJ (1998) Ump1p is required for proper maturation of the 20S proteasome and becomes its substrate upon completion of the assembly. *Cell.* 92(4):489-499.
78. Redman KL, Rechsteiner M (1989) Identification of the long ubiquitin extension as ribosomal protein S27a. *Nature* 338, 438-440.
79. Reed SI (2006) The ubiquitin-proteasome pathway in cell cycle control. *Results Probl Cell Differ.* 42:147-181.

80. Reyes-Turcu FE, Horton JR, Mullally JE, Heroux A, Cheng X et al. (2006) The ubiquitin binding domain ZnF UBP recognizes the C-terminal diglycine motif of unanchored ubiquitin. *Cell* 124: 1197-1208.
81. Riedl SJ, Renatus M, Schwarzenbacher R, Zhou Q, Sun C, Fesik SW, Liddington RC, Salvesen GS (2001) Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell*.104(5):791-800.
82. Ryoo HD, Bergmann A, Gonen H, Ciechanover A, Steller H (2002) Regulation of Drosophila IAP1 degradation and apoptosis by reaper and ubcd1. *Nat Cell Biol.* 4(6):432-438.
83. Scheuermann JC, de Ayala Alonso AG, Oktaba K, Ly-Hartig N, McGinty RK, Fraterman S, Wilm M, Muir TW, Müller J (2010) Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. *Nature.*;465(7295):243-247.
84. Schoenfeld AR, Apgar S, Dolios G, Wang R, Aaronson SA (2004) BRCA2 is ubiquitinated in vivo and interacts with USP11, a deubiquitinating enzyme that exhibits prosurvival function in the cellular response to DNA damage. *Mol Cell Biol.* 24(17):7444-7455.
85. Semple CA; RIKEN GER Group; GSL Members. (2003) The comparative proteomics of ubiquitination in mouse. *Genome Res.* 13(6B):1389-1394.
86. Seufert W, Jentsch S (1990) Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins. *EMBO J.* 9(2):543-550.
87. Shapiro PJ, Hsu HH, Jung H, Robbins ES, Ryoo HD (2008) Regulation of the Drosophila apoptosome through feedback inhibition. *Nat Cell Biol.* 10(12):1440-1446.
88. Skaug B, Jiang X, Chen ZJ (2009) The role of ubiquitin in NF-kappaB regulatory pathways. *Annu Rev Biochem.* 78:769-796.
89. Snyder H, Mensah K, Theisler C, Lee J, Matouschek A et al. (2003) Aggregated and monomeric alpha-synuclein bind to the S6' proteasomal protein and inhibit proteasomal function. *J Biol Chem* 278: 11753–11759.
90. Steller H (1995) Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267: 1445-1449.
91. Suhr ST, Senut MC, Whitelegge JP, Faull KF, Cuizon DB, Gage FH (2001) Identities of sequestered proteins in aggregates from cells with induced polyglutamine expression. *J Cell Biol.* 153(2):283-294.
92. Suzuki, Y. Nakabayashi Y, Nakata K, Reed JC, Takahashi R (2001) X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and - 7 in distinct modes. *J. Biol. Chem.* 276, 27058–27063

93. Szlanka T, Haracska L, Kiss I, Deák P, Kurucz E et al. (2003) Deletion of proteasomal subunit S5a/Rpn10/p54 causes lethality, multiple mitotic defects and overexpression of proteasomal genes in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Sci* 116: 1023-1033.
94. Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, Welsh K, Assa-Munt N, Salvesen GS, Reed JC (1998) A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem.* 273(14):7787-7790.
95. Thompson CB (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*; 267(5203):1456-1462.
96. Tijsterman M, Plasterk RH (2004) Dicers at RISC; the mechanism of RNAi. *Cell.* 117(1):1-3.
97. Tsou WL, Sheedlo MJ, Morrow ME, Blount JR, McGregor KM, Das C et al. (2012) Systematic analysis of the physiological importance of deubiquitinating enzymes. *PLoS One.* 7:8.
98. van Nocker S, Sadis S, Rubin DM, Glickman M, Fu H, Coux O, Wefes I, Finley D, Vierstra RD (1996) The multiubiquitin-chain-binding protein Mub1 is a component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a nonessential, substrate-specific role in protein turnover. *Mol Cell Biol.* 16(11):6020-6028.
99. Vaux DL, Silke J (2005) IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Apr;6(4):287-297.
100. Verma R, Aravind L, Oania R, McDonald WH, Yates JR et al. (2002) Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* 298: 611-615.
101. Walker FO (2007) Huntington's disease. *Lancet.* 369(9557):218-228.
102. Wang CH, Chen GC, Chien CT (2014) The deubiquitinase Leon/USP5 regulates ubiquitin homeostasis during *Drosophila* development. *Biochem Biophys Res Commun.* 452: 369-375.
103. Wang H, Wang L, Erdjument-Bromage H, Vidal M, Tempst P et al. (2004) Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature.* 431: 873-878.
104. Wilkinson KD (1997) Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *FASEB J* 11: 1245-1256.
105. Wilkinson KD, Lee KM, Deshpande S, Duerksen-Hughes P, Boss JM, Pohl J (1989) The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. *Science.* 246(4930):670-673.



106. Wilkinson KD, Tashayev VL, O'Connor LB, Larsen CN, Kasperek E et al. (1995) Metabolism of the polyubiquitin degradation signal: structure, mechanism, and role of isopeptidase T. *Biochemistry* 34: 14535-14546.
107. Wilson R, Goyal L, Ditzel M, Zachariou A, Baker DA, Agapite J, Steller H, Meier P (2002) The DIAP1 RING finger mediates ubiquitination of Dronc and is indispensable for regulating apoptosis. *Nat Cell Biol.* 4(6):445-450.
108. Xu D, Woodfield SE, Lee TV, Fan Y, Antonio C et al. (2009) Genetic control of programmed cell death (apoptosis) in *Drosophila*. *Fly(Austin)* 3: 78-90
109. Xu EH, Tang Y, Li D, Jia JP (2009) Polymorphism of HD and UCHL-1 genes in Huntington's disease. *J Clin Neurosci.* 16(11):1473-1477.
110. Yang CS, Sinenko SA, Thomenius MJ, Robeson AC, Freil CD et al. (2014) The deubiquitinating enzyme DUBAI stabilizes DIAP1 to suppress *Drosophila* apoptosis. *Cell Death Differ* 21: 604-611.
111. Yao T, Cohen RE. (2002). A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature.* 419(6905):403-407.
112. Zhang J, Liu M, Su Y, Du J, Zhu AJ. (2012) A targeted in vivo RNAi screen reveals deubiquitinases as new regulators of Notch signaling. *G3*, 2(12):1563-1575.
113. Zhao Y, Lang G, Ito S, Bonnet J, Metzger E, Sawatsubashi S, Suzuki E, Le Guezennec X, Stunnenberg HG, Krasnov A, Georgieva SG, Schüle R, Takeyama K, Kato S, Tora L, Devys D (2008) A TFTC/STAGA module mediates histone H2A and H2B deubiquitination, coactivates nuclear receptors, and counteracts heterochromatin silencing. *Mol Cell.* 29(1):92-101.
114. Zhu X, Ménard R, Sulea T (2007) High incidence of ubiquitin-like domains in human ubiquitin-specific proteases. *Proteins.* 69(1):1-7.

## ÖSSZEFOGLALÓ

Az ubikvitiláció során egy enzimeszkád ubikvitin molekulákat helyez a célfehérjékre. Ez a poszttranszlációs kovalens módosítás a szubsztrátfehérje lebontásához vezet, enzimek aktivitását befolyásolja, vagy fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakulását segíti. A folyamat jelentőségét mutatja, hogy több sejten belüli mechanizmus is szigorúan szabályozott az ubikvitiláció által. Ilyen folyamatok például a transzkripció szabályozása a hisztonok ubikvitilációján keresztül, az irányított fehérjelebontás, a sejtosztódás és a programozott sejthalál, vagy apoptózis szabályozása.

Több más fehérjemódosítási folyamathoz hasonlóan az ubikvitilációnak is van ellentétes irányba ható párja, a dezubikvitiláció. Ezt a folyamatot az proteázok osztályába tartozó dezubikvitiláló enzimek, vagy DUB-ok katalizálják. A DUB-ok eltávolítják az ubikvitint a szubsztrátfehérjéről, részt vesznek a fehérjelebontás után visszamaradó ubikvitin újrahasznosításában, illetve nélkülözhetetlenek az ubikvitin szintézishez, az újonnan keletkező fuzionált ubikvitint szabdalják monomerekre. Annak ellenére, hogy biokémiai szempontból DUB-okról sok minden ismert, konkrét fiziológiai folyamatokban játszott szerepük kevésbé tisztázott. Munkánk során célul tűztük ki, hogy egy soksejtű, intakt eukarióta modellorganizmusban, a *Drosophila melanogaster*-ben azonosítsuk és genetikailag jellemezzük a DUB-okat. Dolgozatomban erről a munkáról számolok be, valamint egy olyan DUB-ról, amelynek részletes jellemzését genetikai, citológiai és módszerekkel is elvégeztem.

Munkánk a *Drosophila* dezubikvitiláló enzimek bioinformatikai módszerekkel történő azonosításával kezdődött. Ehhez ismert élesztő és humán DUB-ok aminosav szekvenciáit használtuk fel. A *Drosophila* ortológok azonosítását megkönnyítette, hogy a konzervált katalitikus doméneken kívül egyes DUB-ok más funkcionális doméneket is tartalmaznak. A bioinformatikai elemzés során 58 ismert humán és 21 ismert élesztő DUB szekvenciája alapján 45 potenciális *Drosophila* dezubikvitiláló enzimet azonosítottunk. Úgy véljük, hogy a DUB-ok szerkezetéről rendelkező álló mai ismereteink alapján az összes *Drosophila* DUB-ot azonosítottuk.

A *Drosophila* DUB gének azonosítását követően azok elzáróját genetikai jellemzését végeztük el. Ehhez a munkához 87 transzgenikus RNS interferencia és 45 P elem illetve deléciós mutánszt szereztünk be törzsközpontokból, vagy állítottunk elő laborunkban. A géncsendesített és null mutáns állatok egyedfejlődését nyomon követve megállapítottuk, hogy a dezubikvitiláló enzimek közül 27 esszenciális, hiányukban az állatok elpusztulnak, vagy

sterilek lesznek. Ezt követően arra voltunk kíváncsiak, hogy a DUB-ok hogyan hatnak olyan fiziológiai folyamatokra, amelyekről ismert, hogy az ubiquitiláció szabályozza. Az egyik ilyen folyamat a programozott sejthalál, vagy apoptózis. Az apoptózis vizsgálatának egyik népszerű eszköze a *Drosophila* szem, mivel hiányában az állat életképes és a morfológiai elváltozások a szemben jól megfigyelhetők. A *Drosophila* genetika eszköztára lehetővé teszi, hogy a géncsendesítést szervspecifikusan, csak a szemben indukáljuk. Transzgenikus RNS interferenciás törzsek segítségével az összes DUB génre kiterjedő szemspecifikus csendesítést végeztünk. Hét esetben tapasztaltunk különböző mértékű csökevényes elváltozást a szem morfológiájában. Egy esetben enyhe, egy esetben közepes és öt esetben drasztikus, szemhiányos fenotípust kaptunk. Ezek a fenotípusok arra utalnak, hogy az adott DUB-ok hiánya apoptózishoz vezet. Az apoptotikus fenotípusra történő részletes követést, a *CG12082* gént választottuk ki részletesebb jellemzésre, mivel mutációja érdekes apoptotikus fenotípust eredményezett, de a gén fiziológiai szerepe még ismeretlen volt.

A *CG12082* gén részletes genetikai analíziséhez P elemek nem precíz kiugratásával két deléciós mutánst állítottunk elő. Mindkét mutáció teljes mértékben megszüntette a gén funkcióját, és későbbi lárvaletalitást okozott. A vad típusú *CG12082* szekvencia mérsékelt túltermeltetése menekítette a mutánsok letális fenotípusát, igazolva, hogy valóban ennek a génnek a hiánya vezet az állatok pusztulásához. A mutáns lárvák agyából készül orceinnel festett mikroszkópi preparátumokon a kis, lekerekített, pyknotikus sejtek számának közel ötszörös megemelkedését tapasztaltuk. Ezek a morfológiai jelleg az apoptotikus sejtekre jellemző. A mutánsokban tapasztalható nagymértékű sejthalált akridin-narancs festéssel és kaszpáz-3 elleni immunfestéssel is igazoltuk. Génexpressziós vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy a mutánsokban nagymértékben megemelkedik a *p53*, a *rpr* és a *hid* proapoptotikus szabályozófehérjék expressziója. Ezeknek a géneknek az aktiválódása arra utal, hogy a DIAP1 apoptózist gátló fehérje inaktiválódik, ami kaszpázok felszabadulását, az apoptózis indukcióját eredményezi. A DIAP1 inaktiválódására közvetve utal az is, hogy a mutánsainkban transzgenikusan túltermeltetett a DIAP1 részlegesen menekítette a mutánsok letális és apoptotikus fenotípusát.

Annak megállapítására, hogy ez az apoptózisban érintett gén milyen DUB-ot kódol, a bioinformatika eszköztárát vetettünk be. Élesztő, *Drosophila* és humán DUB-ok aminosav sorrendjeinek összehasonlításával megállapítottuk, hogy a *CG12082* gén az élesztő Ubp14 és a humán USP5 fehérjék *Drosophila* ortológját kódolja. A szerkezeti hasonlóságon túlmenően heterológ menekítési kísérletet végeztünk. Azt tapasztaltuk, hogy a *CG12082* szekvencia képes menekíteni az élesztő *usp14* mutáns kanavanin érzékeny fenotípusát, amely a

strukturális hasonlóságon túl a funkcionális homológiát is igazolta. Ismert, hogy a humán USP5 is menekíti ezt az élesztő mutánst, ami a fehérje evolúciós konzerváltságát bizonyítja. Ezeknek az eredményeknek az ismeretében a vizsgált gént és termékét DmUsp5-nek neveztük el.

Az általunk vizsgált fehérje élesztő és humán ortológjairól ismert, hogy a proteaszómális fehérjelebontás után visszamaradt szabad poliubikvitin láncokat monomerekre hasítják, ezáltal az ubikvitin újrahasznosításban játszanak szerepet. Munkánk során kimutattuk, hogy DmUsp5 mutánsokban akkumulálódnak a szabad és kötött poliubikvitinek. Ez a fenotípus arra utal, hogy a DmUsp5-nek az ubikvitinek újrahasznosításában van szerepe Drosophilában. Poliubikvitinek akkumulációjával párhuzamosan a szabad monoubikvitinek mennyiségének csökkenését mértük. Ennek az lehet a magyarázata, hogy az ubikvitin monomerek konjugált formában lekötve maradnak, és a hozzáférhető ubikvitin-készlet pótlása nehezebb a DmUsp5 mutánsokban.

Élesztőben ismert, hogy az ubikvitin-készlet kimerülése ubikvitin stresszhez vezet, amelyre egy másik DUB gén, az Usp14 megemelkedett expressziója jellemző. Munkánk során szekvencia-hasonlóság alapján azonosítottuk az Usp14 Drosophila ortológját és DmUsp14-nek neveztük el. Génexpressziós vizsgálattal megállapítottuk, hogy a *DmUsp14* expressziója nagymértékben megemelkedik a DmUsp5 hiányában. Ezzel először szolgáltatunk bizonyítékot arra, hogy az ubikvitin stressz soksejtes szervezetekben is előfordul és a DmUsp5 hiánya ennek a folyamatnak az aktiválásához vezet. Ismert, hogy a monoubikvitin-készlet kimerülése különösen érzékennyé teszi a sejteket különböző vegyületekkel, például a cikloheximid transzlációt gátló szerrel szemben. A *DmUsp5* mutánsok esetében kimutattuk, hogy a gén egyik kópiájának hiánya már jelentősen érzékennyé teszi az állatokat a cikloheximiddel szemben. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az DmUsp5 nélkülözhetetlen az ubikvitin homeosztázis fenntartásában, funkciójának kiesése ubikvitin hiányhoz vezet. A proteaszóma alegységek expressziójának megemelkedését is kimutattuk, amely az ubikvitin háztartás felborulásából fakadó proteaszóma stresszt jelzi.

Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy munkánk kezdetén 45 DUB gént azonosítottunk Drosophilában, amelyeknek több mint fele nélkülözhetetlen az állatok egyedfejléséhez. Az esszenciális gének közül hétnek a hiánya abnormálisan magas apoptózishoz vezet. Ezek közül az egyik az evolúciósan konzerválódott DmUsp5, amely az ubikvitinek újrahasznosítása révén nélkülözhetetlen a sejt szabad ubikvitin készletének a fenntartásához. Hiányában a sejt ubikvitin egyensúlya felborul és jelentősen mértékű ubikvitin stressz lép fel. A sejt szabad monoubikvitin-készlete normál körülmények között is limitált, a

különböz ubikvitilációval szabályozott folyamatok versengenek érte. A korlátozott mennyiség szabad ubikvitin az, ami a szabályozott fehérjelebontást összekapcsolja az egyedfejl déssel és az apoptózissal, azáltal, hogy egymástól kölcsönösen függ vé teszi. A *DmUsp5* funkcióvesztéses mutánsokban tapasztalt pleiotróp hatások összessége arra utal, hogy az apoptótikus folyamatok indukciója az ubikvitin egyensúly felborulásának következménye.

## SUMMARY

Ubiquitin is a small regulatory protein which is used for posttranslational modification of proteins in a reversible process called ubiquitylation. An enzyme cascade catalyzes the attachment of ubiquitins to target proteins. This covalent modification targets proteins to proteasomal degradation, changes enzymatic activities, or facilitates protein-protein interactions. The importance of this process is highlighted by the fact that many intracellular physiological mechanisms are ubiquitin-dependent. These mechanisms include regulation of transcription by histone ubiquitylation, targeted protein degradation, regulation of cell cycle and programmed cell death.

Similarly to other processes in the cell, ubiquitylation also has its opposite reaction, called deubiquitylation. This process is mediated by certain proteases which are named deubiquitylating enzymes, or shortly DUBs. Many DUBs remove ubiquitins from ubiquitylated substrates and some of them are involved in recycling ubiquitins after proteasomal protein degradation. DUBs are also indispensable for ubiquitin synthesis, since some of them process newly synthesized ubiquitin fusions into ubiquitin monomers. Although DUBs are widely characterized from biochemical aspects in yeast and human cell lines, their physiological importance especially in multicellular organisms is poorly understood. The aim of our work was to identify and genetically characterize DUBs in an intact multicellular model organism, *Drosophila melanogaster*. My thesis is based on the results of this work, and in addition, it presents a detailed genetic, cytological and biochemical characterization of one of DUB genes which showed an interesting phenotype.

At the beginning of our work, we identified potential *Drosophila* DUB genes by using bioinformatic approaches. We used known yeast and human DUB sequences for homology searches and comparisons. The identification of *Drosophila* orthologues was facilitated by the fact that in addition to conserved catalytic domains, many DUBs contain other characteristic functional domains as well. Based on 95 human and 21 yeast DUB sequences we identified 45 potential DUB encoding genes in *Drosophila*. According to our knowledge on DUB enzyme families, we presume that this number corresponds to the total number of DUBs in *Drosophila*.

The identification of *Drosophila* DUBs was followed by their preliminary genetic characterization using 87 transgenic RNA interference lines and 45 P element insertion or deletion mutants, to investigate the loss of function phenotypes. When silenced or knocked

out, 27 DUB mutations resulted in lethality or sterility indicating that these DUBs are essential for *Drosophila* development. Furthermore, we were curious how these genes affect those physiological processes which were implicated as being ubiquitin-mediated. One of these processes is programmed cell death or apoptosis, which can be easily studied in the developing *Drosophila* eye. The *Drosophila* genetics toolbox provides opportunities to induce eye specific gene silencing. In seven cases we found rough and abnormally reduced eye morphology with different severities. These phenotypes indicated that loss of these DUBs led to apoptosis. Following the screen for apoptotic phenotypes, we undertook a detailed characterization of one of the DUB genes with an interesting apoptotic phenotype. This gene was previously uncharacterized, and denoted only as *CG12082*.

In order to make a detailed genetic characterization, we generated two deletion mutants for *CG12082* by P element remobilization. Both mutations eliminated gene function and led to late larval lethality. The lethal phenotype could be rescued by moderate overexpression of wild type *CG12082*. Orcein stained microscopic preparations of larval neuroblasts revealed high incidence of small, rounded, pycnotic cells in *CG12082* mutants. These cells correspond to apoptotic cells and their number increased fivefold in mutants compared to wild type brains. The apoptotic phenotype was further supported by acridine orange staining and anti-caspase-3 immunostaining of larval brain and imaginal discs. Gene expression studies revealed an increased expression of the proapoptotic *p53*, *rpr* and *hid* genes. Although we could not detect DIAP1 level directly, we observed a partial rescue of the apoptotic phenotype in *CG12082* mutants upon transgenic overexpression of DIAP1. This indirectly proves that DIAP1 downregulation may stand behind the observed apoptosis.

We used bioinformatic approaches to identify which type of DUB is encoded by *CG12082*. Sequence comparisons of yeast, *Drosophila* and human proteins revealed that *CG12082* encodes a protein similar to yeast Ubp14 and human USP5. In addition to structural homology, we performed a heterologous complementation assay to investigate functional homology. It turned out that expression of the *CG12082* gene product could rescue the canavanine sensitive phenotype of the yeast *ubp14* mutant. It was previously reported that human USP5 also rescues this yeast mutant. These results suggest that the gene product of *CG12082* is a functional ortholog of the deubiquitylating enzyme Ubp14/USP5 in *Drosophila*, we therefore renamed it DmUsp5.

Earlier studies have shown that the main substrates of the human USP5 are free polyubiquitin chains liberated from proteasome-bound polyubiquitylated proteins. In line with this, the loss of USP5 in yeast and in a human cell lines led to the accumulation of free

polyubiquitin chains. We used Western blot analysis to detect possible changes of polyubiquitin level in *DmUsp5* mutant. Null alleles of *DmUsp5* caused accumulation of free and protein bound polyubiquitin chains demonstrating the role of DmUsp5 in ubiquitin recycling. In line with polyubiquitin accumulation we measured a reduction of free monoubiquitin level. The reason of this might be that a significant proportion of the ubiquitin trapped in free polyubiquitins and polyubiquitylated proteins and the replenishment of the free ubiquitin pool is hampered in *DmUsp5* mutants.

Yeast studies revealed a phenomenon called ubiquitin stress which is activated upon monoubiquitin depletion and it is accompanied by overexpression of a DUB called Usp14. In our studies we identified the *Drosophila* ortholog of this protein by sequence similarity and we named it DmUsp14. Gene expression studies demonstrated an increased expression of this DUB in *DmUsp5* mutants. This was the first evidence for the presence of ubiquitin stress in a multicellular organism and suggested the activation of this mechanism when DmUsp5 function is abolished. Another distinctive feature of ubiquitin stress is an increased sensitivity to different chemicals, including translational inhibitors such as cycloheximide. Cycloheximide treatments indicated that even the loss of one copy of the *DmUsp5* gene dramatically sensitized animals to cycloheximide. These results demonstrate an indispensable role of DmUsp5 in the maintenance of ubiquitin homeostasis. In addition to this, we found an increased expression of proteasome subunits in *DmUsp5* mutants indicating the induction of the proteasome stress as well, caused by the disturbed ubiquitin homeostasis.

Summarizing my thesis, I described the identification of *Drosophila* genes encoding deubiquitylating enzymes. A preliminary characterization of these genes revealed that more than half of them are essential for *Drosophila* development. Loss of seven of these essential DUBs led to increased incidence of apoptosis. One of them is the evolutionary conserved DmUsp5 which is implicated in ubiquitin recycling thus contributes to the maintenance of free ubiquitin pool. In the absence of this protein, the ubiquitin equilibrium of the cell is disturbed and an ubiquitin stress occurs. The free monoubiquitin level is limited even at normal cellular conditions and different ubiquitin-dependent processes are competing for that. This limited pool of free monoubiquitins links protein degradation to apoptosis and to development by making these ubiquitin-dependent processes mutually interdependent. The different pleiotropic effects observed in DmUsp5 loss-of-function mutants indicate that apoptosis induction in these animals is caused by disturbance in ubiquitin equilibrium.

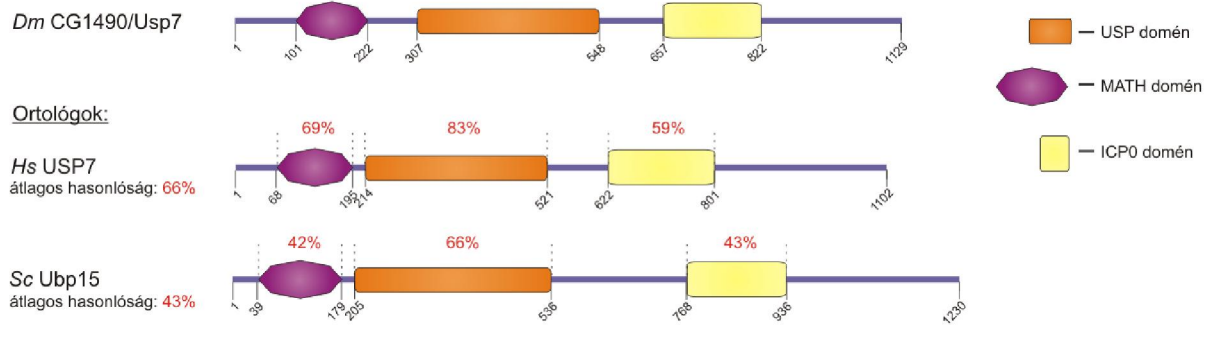
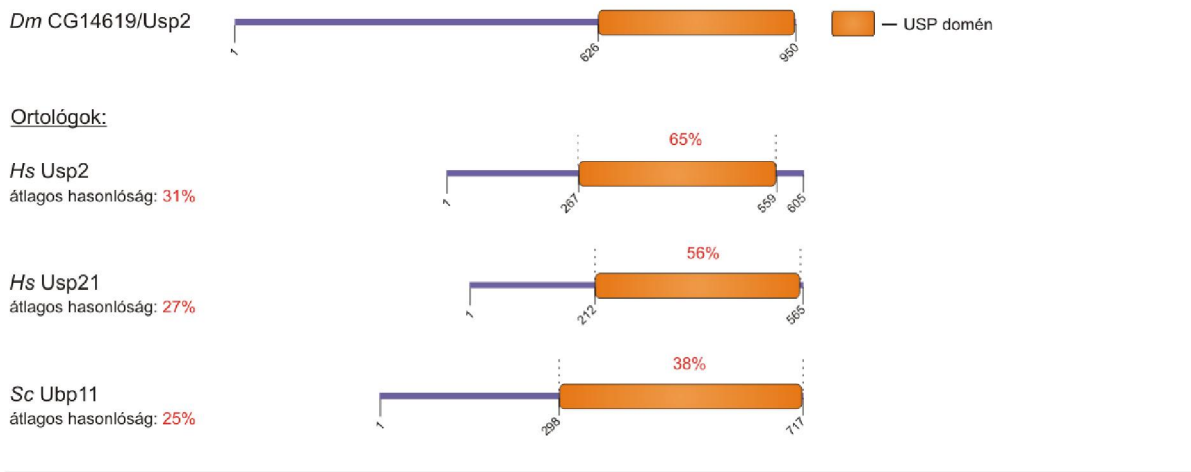
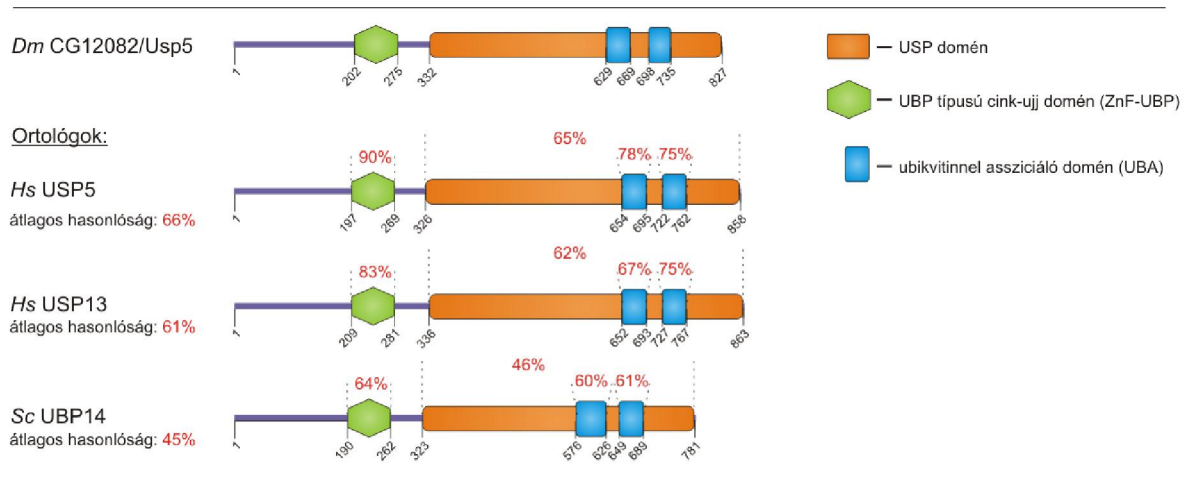


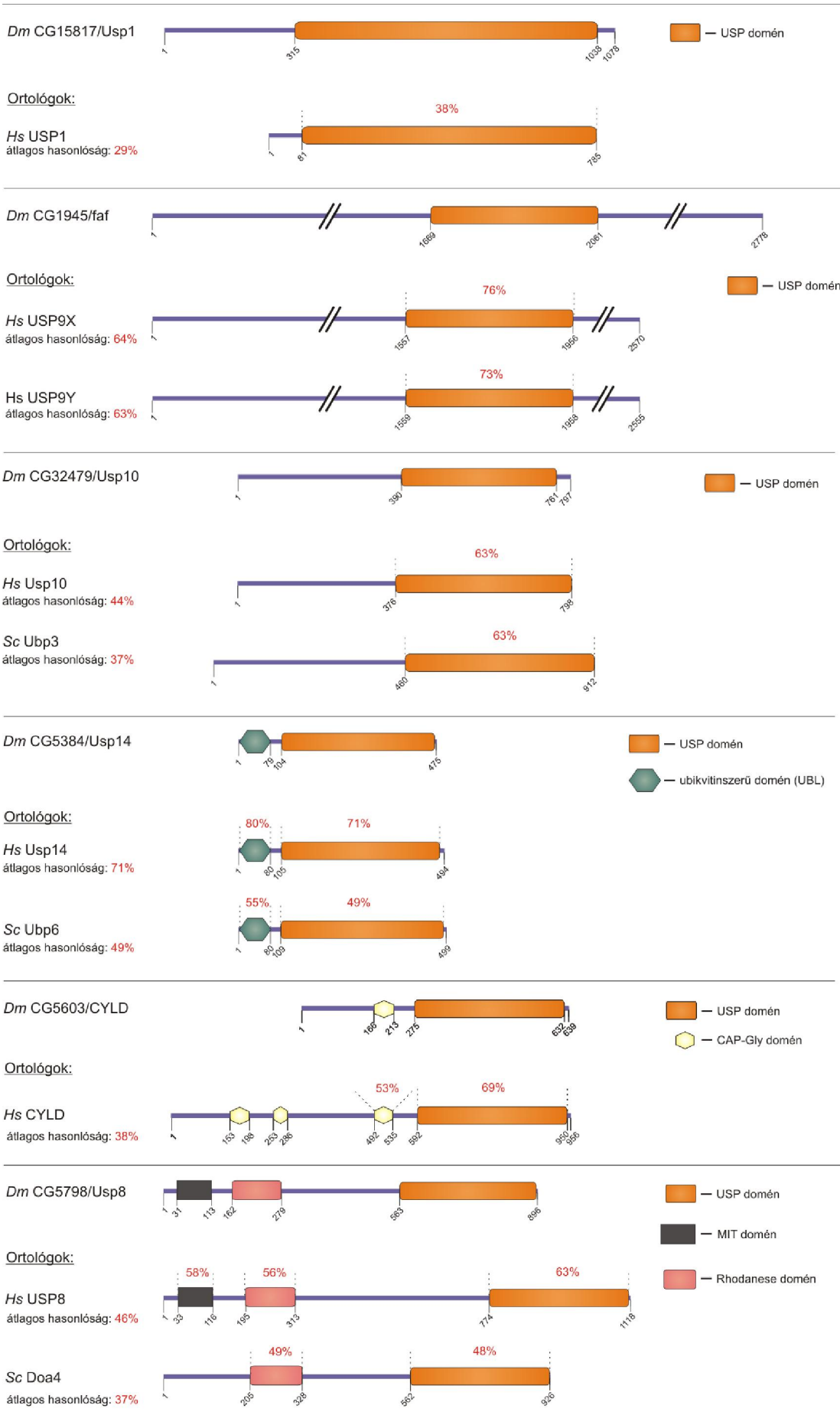
# MELLÉKLETEK

## I. melléklet A *Drosophila* dezubikvitiláló enzimek és ortológjaik doménszerkezete

A felső sorban a *Drosophila* fehérje (*Dm*) szerkezete, alatta pedig a humán (*Hs*), illetve, ha van, az élesztő (*Sc*) ortológ doménszerkezete. A piros számok azt jelölik, hogy a humán és élesztő fehérjék adott doménjei hány százalékban hasonlítanak a *Drosophila* fehérje doménjeihez. Az átlagos hasonlóság a fehérjék teljes hosszában mért hasonlóságra vonatkozik.

### USP alosztály:





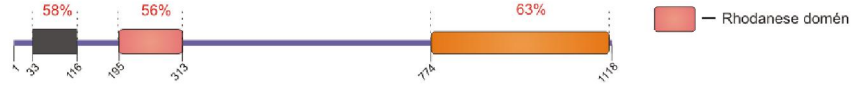
*Dm* CG5798/Usp8



Ortológok:

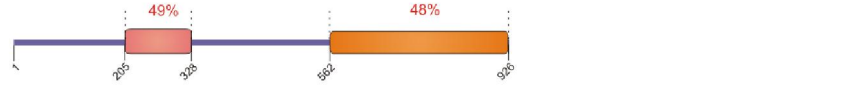
*Hs* USP8

átlagos hasonlóság: 46%



*Sc* Doa4

átlagos hasonlóság: 37%



*Dm* CG7023/Usp12-46



Ortológok:

*Hs* Usp12

átlagos hasonlóság: 69%



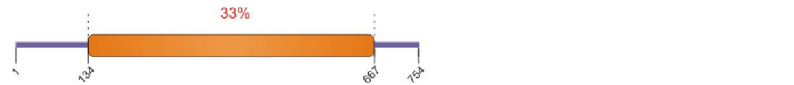
*Hs* Usp46

átlagos hasonlóság: 70%

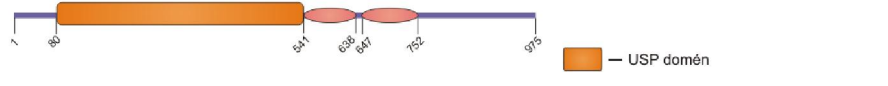


*Sc* Ubp9

átlagos hasonlóság: 23%



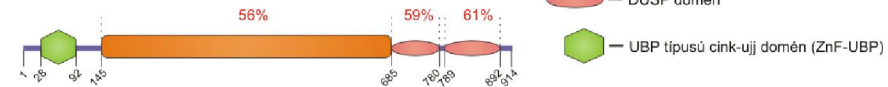
*Dm* CG8494/Usp20-33



Ortológok:

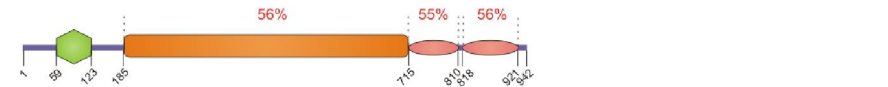
*Hs* Usp20

átlagos hasonlóság: 42%



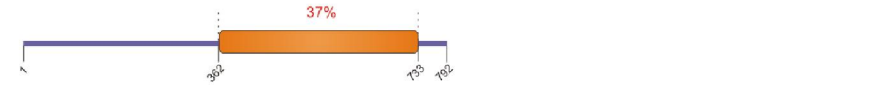
*Hs* Usp33

átlagos hasonlóság: 39%



*Sc* Ubp10

átlagos hasonlóság: 18%



*Dm* CG4166/non-stop



Ortológok:

*Hs* USP22

átlagos hasonlóság: 64%

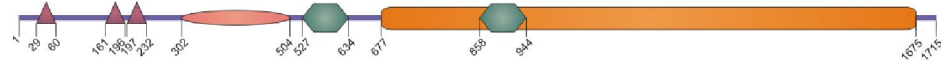


*Sc* UBP8

átlagos hasonlóság: 47%



*Dm* CG8334/Usp32



Ortológok:

*Hs* USP32

átlagos hasonlóság: 49%



— USP domén ▲ — EF hand domén — DUSP domén

*Dm* CG3016/Usp30

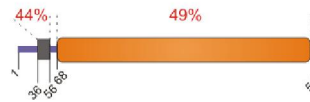


— USP domén  
— transzmembrán domén

Ortológok:

*Hs* USP30

átlagos hasonlóság: 36%



*Sc* UBP1

átlagos hasonlóság: 23%



*Dm* CG30421/Usp15-31



Ortológok:

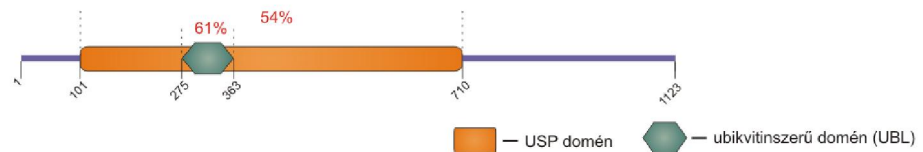
*Hs* USP31

átlagos hasonlóság: 37%



*Hs* USP43

átlagos hasonlóság: 36%



— USP domén — ubikvitinszerű domén (UBL)

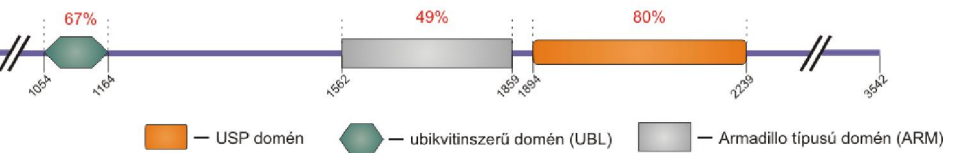
*Dm* CG5794/puf



Ortológok:

*Hs* USP34

átlagos hasonlóság: 52%



— USP domén — ubikvitinszerű domén (UBL) — Armadillo típusú domén (ARM)

*Dm* CG5505/scny



Ortológok:

*Hs* USP36

átlagos hasonlóság: 38%

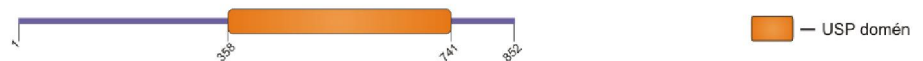


*Hs* USP42

átlagos hasonlóság: 30%



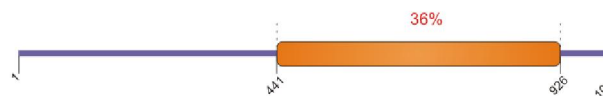
*Dm* CG8830/DUBAI



Ortológok:

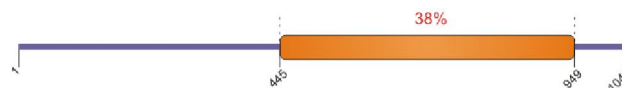
*Hs* USP35

átlagos hasonlóság: 36%



*Hs* USP38

átlagos hasonlóság: 37%



*Dm* CG7288/Usp39



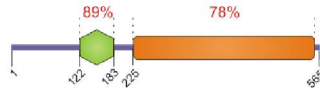
— USP domén

— UBP típusú cink-ujj domén (ZnF-UBP)

Ortológok:

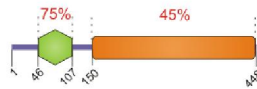
*Hs* USP39

átlagos hasonlóság: 67%



*Sc* SAD1

átlagos hasonlóság: 46%



*Dm* CG4165/Usp16-45



Ortológok:

*Hs* USP16

átlagos hasonlóság: 38%



— USP domén

— UBP típusú cink-ujj domén (ZnF-UBP)

*Hs* USP45

átlagos hasonlóság: 39%



*Dm* CG8232/PAN2



— USP domén

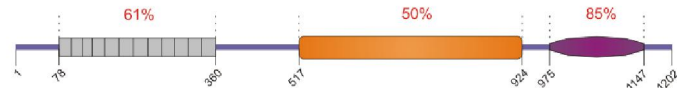
— exonukleáz domén

— WD40 domén

Ortológok:

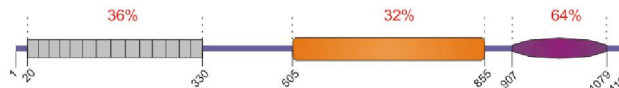
*Hs* USP52/PAN2

átlagos hasonlóság: 56%



*Sc* PAN2

átlagos hasonlóság: 38%



*Dm* CG2904/Echinus



— USP domén

Ortológok:

*Hs* USP54

átlagos hasonlóság: 32%



## MJD alosztály

*Dm* CG3781

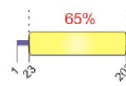


— Josephin domén

Ortológok:

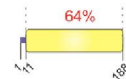
*Hs* Josephin 1

átlagos hasonlóság: 64%



*Hs* Josephin 2

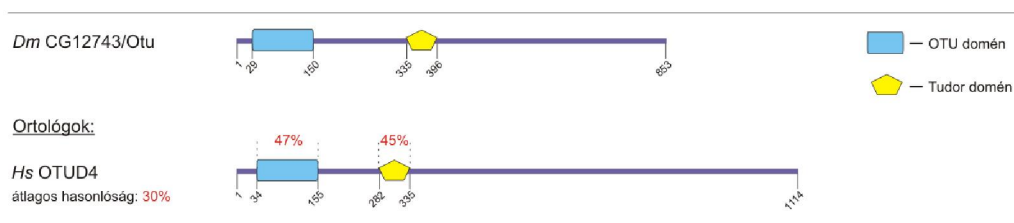
átlagos hasonlóság: 64%



## UCH alosztály



## OTU alosztály



*Dm* CG3251

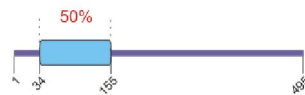


— OTU domén

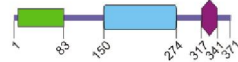
Ortológok:

*Hs* HIN1-Like

átlagos hasonlóság: 38%



*Dm* CG4603



— OTU domén

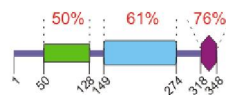
— UBX domén

— C2H2 típusú cin- ujj domén (ZnF-C2H2)

Ortológok:

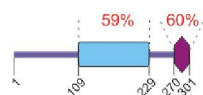
*Hs* YOD1

átlagos hasonlóság: 49%

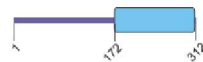


*Sc* OTU1

átlagos hasonlóság: 43%



*Dm* CG7857

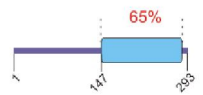


— OTU domén

Ortológok:

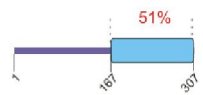
*Hs* OTUD6B

átlagos hasonlóság: 55%

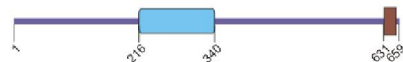


*Sc* OTU2

átlagos hasonlóság: 49%



*Dm* CG6091



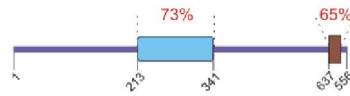
— OTU domén

— ubiquitinnel kölcsönható motívum (UIM)

Ortológok:

*Hs* OTUD5

átlagos hasonlóság: 39%



*Dm* CG4968

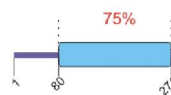


— OTU domén

Ortológok:

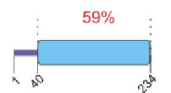
*Hs* OTUB1

átlagos hasonlóság: 69%

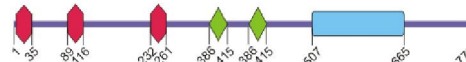


*Hs* OTUB2

átlagos hasonlóság: 53%



*Dm* CG9448/Trabid



— OTU domén

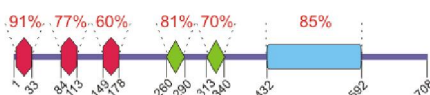
— RANBP2 típusú cink-ujj domén (ZnF-RANBP2)

— ANK domén

Ortológok:

*Hs* TRABID

átlagos hasonlóság: 56%



## JAMM alosztály

*Dm* CG2224

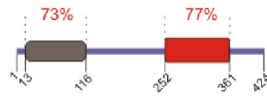


■ — JAMM domén  
■ — MIT domén

Ortológok:

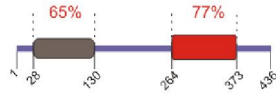
*Hs* AMSH

átlagos hasonlóság: 61%



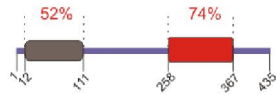
*Hs* AMSH-like

átlagos hasonlóság: 57%

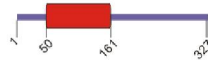


*Sp* AMSH

átlagos hasonlóság: 52%



*Dm* CG14884/Csn5

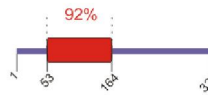


■ — JAMM domén

Ortológok:

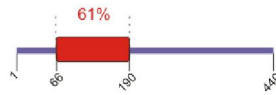
*Hs* CSN5

átlagos hasonlóság: 85%

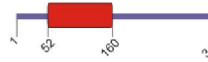


*Sc* CSN5

átlagos hasonlóság: 34%



*Dm* CG6932/Csn6

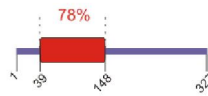


■ — JAMM domén

Ortológok:

*Hs* CSN6

átlagos hasonlóság: 75%



*Dm* CG4751

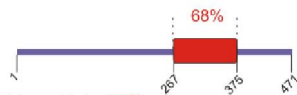


■ — JAMM domén

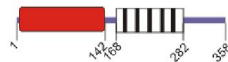
Ortológok:

*Hs* MPND

átlagos hasonlóság: 17%  
az N-terminális 470 aminosav közti hasonlóság: 54%



*Dm* CG3416/Rpn8

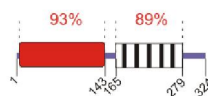


■ — JAMM domén  
▨ — Mit-Mem domén

Ortológok:

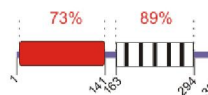
*Hs* PSMD7

átlagos hasonlóság: 83%



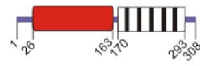
*Sc* RPN8

átlagos hasonlóság: 73%



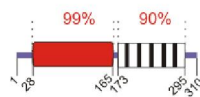


*Dm* CG18174/Rpn11

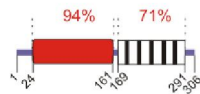


Ortológok:

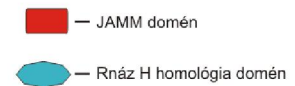
*Hs* POH1  
átlagos hasonlóság: 93%



*Sc* RPN11  
átlagos hasonlóság: 77%

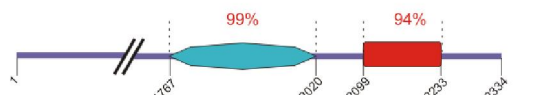


*Dm* CG8877/Prp8

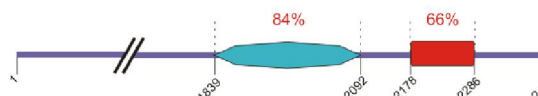


Ortológok:

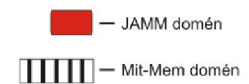
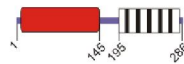
*Hs* PRPF8  
átlagos hasonlóság: 94%



*Sc* PRP8  
átlagos hasonlóság: 75%

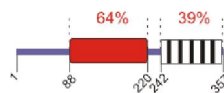


*Dm* CG8335

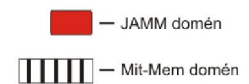
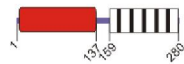


Ortológok:

*Hs* EIF3F  
átlagos hasonlóság: 45%

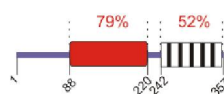


*Dm* CG9769

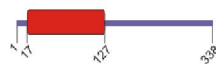


Ortológok:

*Hs* EIF3F  
átlagos hasonlóság: 52%

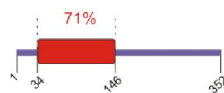


*Dm* CG9124/eIF-3p40



Ortológok:

*Hs* EIF3H  
átlagos hasonlóság: 61%



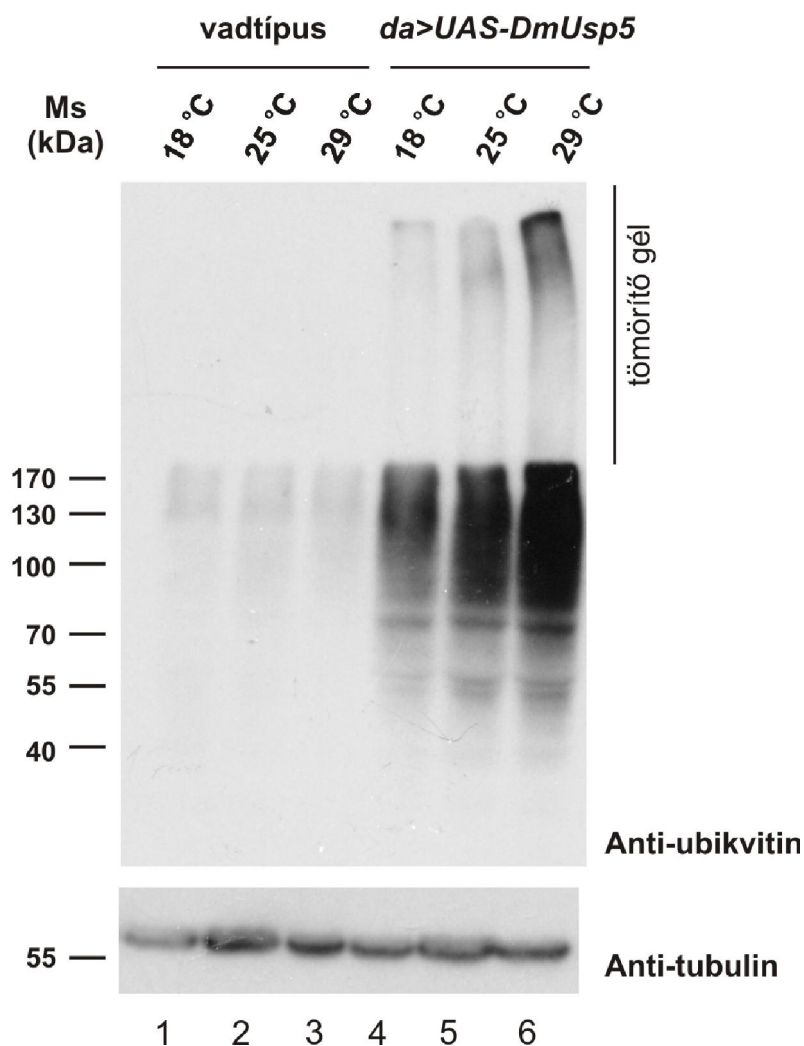
**II. melléklet A DmUsp5 aminosavszekvenciájának összehasonlítása a humán USP5 és az élesztő Ubp14 szekvenciájával.** Pirossal az azonos, sárgával a hasonló jelleg aminosavak vannak jelölve. Zöld kerettel az Ubp típusú cink-ujj domén (ZnF-UBP), kék kerettel pedig az ubikvitinnel asszociáló domének (UBA) vannak kiemelve. Csillagok jelölik a katalitikus cisztein és hisztidin pozícióját.

Dm Usp5	(1)	-M <b>E</b> LRKH <b>I</b> SK <b>V</b> NVP <b>C</b> ASGAGSPPIY <b>K</b> DE <b>C</b> VSYDN <b>P</b> ETP-----T <b>G</b> LY <b>V</b> ILH <b>S</b> FL
Sc Ubp14	(1)	---MA <b>E</b> AVL <b>E</b> N <b>V</b> N <b>V</b> PA <b>V</b> SK-----DE <b>C</b> IYCF <b>E</b> SP <b>Y</b> NE <b>P</b> LAL <b>N</b> ASPK <b>H</b> S <b>I</b> N <b>I</b> CL <b>N</b> C <b>F</b> Q
Hs USP5	(1)	MA <b>E</b> LS <b>E</b> EA <b>L</b> LS <b>L</b> PT <b>I</b> RV <b>P</b> K <b>A</b> GR <b>V</b> H <b>K</b> DE <b>C</b> A <b>F</b> S <b>F</b> DT <b>P</b> ES <b>E</b> -----G <b>L</b> Y <b>I</b> C <b>M</b> NT <b>L</b> E
Dm Usp5	(51)	<b>G</b> F <b>G</b> -----E <b>A</b> Y <b>V</b> RE <b>Y</b> AD <b>K</b> T <b>G</b> NR <b>V</b> FL <b>H</b> I <b>Q</b> RV <b>K</b> TT <b>K</b> EG <b>A</b> DM <b>E</b> A <b>E</b> CA <b>E</b> SE <b>A</b> G <b>P</b> ER <b>I</b> TR <b>L</b> AI
Sc USP5	(51)	<b>A</b> T <b>C</b> NR <b>H</b> V <b>P</b> L <b>H</b> IR <b>V</b> TE <b>Y</b> AC <b>D</b> T <b>I</b> HS <b>N</b> Y <b>I</b> T <b>I</b> AK <b>V</b> E <b>K</b> PK <b>Q</b> -----EN <b>V</b> E <b>E</b> NN <b>N</b> KK <b>I</b> KL <b>Q</b> V <b>I</b> ET
Hs USP5	(52)	<b>G</b> F <b>G</b> -----K <b>Q</b> Y <b>V</b> ER <b>H</b> FN <b>K</b> T <b>G</b> Q <b>R</b> V <b>Y</b> L <b>H</b> LR <b>R</b> TR <b>R</b> PK <b>E</b> -----E <b>D</b> PA <b>T</b> GT <b>G</b> DP <b>P</b> R <b>K</b> PT <b>R</b> L <b>A</b> I
Dm Usp5	(105)	<b>G</b> VE <b>G</b> GY <b>N</b> E <b>S</b> DM <b>A</b> KK <b>Y</b> E <b>I</b> K <b>D</b> T <b>Y</b> S <b>I</b> V <b>A</b> P <b>H</b> L <b>D</b> KK <b>L</b> P <b>Y</b> DP <b>E</b> LP----MR <b>V</b> T <b>Q</b> S <b>V</b> E <b>A</b> IL <b>A</b> AD <b>S</b>
Sc Ubp14	(106)	<b>S</b> ED <b>D</b> TH <b>N</b> T <b>I</b> W <b>S</b> L <b>Q</b> R <b>F</b> NG <b>E</b> N <b>V</b> PR <b>T</b> V <b>L</b> S-----K- <b>S</b> T <b>D</b> S <b>D</b> I <b>S</b> ----S <b>T</b> A <b>L</b> E <b>K</b> I <b>K</b> IL <b>L</b> KA <b>K</b> S
Hs USP5	(102)	<b>G</b> VE <b>G</b> GF <b>D</b> LS--E <b>E</b> K <b>F</b> E <b>L</b> DE <b>D</b> V <b>K</b> I <b>V</b> IL <b>P</b> D <b>Y</b> LE <b>I</b> AR <b>D</b> GL <b>G</b> LP <b>D</b> I <b>V</b> R <b>D</b> RV <b>T</b> SA <b>V</b> E <b>A</b> LL <b>S</b> AD <b>S</b>
Dm Usp5	(161)	<b>A</b> IA <b>K</b> LE <b>K</b> AT <b>L</b> M <b>G</b> T <b>D</b> GE <b>V</b> R <b>Q</b> AS <b>K</b> Y <b>A</b> DN <b>L</b> Q <b>L</b> DN <b>G</b> K <b>R</b> IP <b>P</b> SG <b>W</b> Q <b>E</b> K <b>C</b> DL <b>T</b> NN <b>L</b> W <b>L</b> N <b>L</b> T <b>D</b> C
Sc Ubp14	(155)	<b>Q</b> DF <b>E</b> DK----K <b>N</b> S <b>W</b> LE <b>I</b> ST <b>C</b> PH <b>T</b> EN--F <b>Q</b> IP <b>S</b> K <b>P</b> EN <b>T</b> V <b>N</b> L <b>Q</b> Q <b>S</b> SC <b>D</b> LT <b>Q</b> N <b>L</b> W <b>L</b> C <b>H</b> CG
Hs USP5	(160)	<b>A</b> SR <b>K</b> QE----V <b>Q</b> A <b>D</b> GE <b>V</b> R <b>Q</b> V <b>S</b> KA <b>F</b> SL <b>K</b> Q <b>L</b> DN <b>P</b> AR <b>I</b> PP <b>C</b> G <b>K</b> Q <b>S</b> K <b>C</b> DM <b>R</b> EN <b>L</b> W <b>L</b> N <b>L</b> T <b>D</b> C
Dm Usp5	(221)	<b>S</b> LM <b>C</b> GR <b>K</b> FF <b>D</b> GS <b>G</b> GN <b>D</b> HA <b>V</b> E <b>H</b> Y <b>R</b> VT <b>G</b> -F <b>L</b> AV <b>L</b> KL <b>G</b> T <b>I</b> T <b>A</b> D <b>G</b> KS <b>V</b> FS <b>P</b> E <b>D</b> EM <b>V</b> LD <b>P</b> H--
Sc Ubp14	(209)	<b>N</b> IG <b>C</b> GR <b>E</b> Q <b>I</b> G- <b>I</b> D <b>G</b> HS <b>H</b> AL <b>D</b> HY <b>R</b> S <b>N</b> NN <b>H</b> PL <b>A</b> IK <b>L</b> GS <b>L</b> S <b>S</b> ST-Y <b>L</b> Y <b>C</b> Y <b>A</b> CD <b>E</b> T <b>R</b> FD <b>N</b> V
Hs USP5	(216)	<b>S</b> IL <b>C</b> GR <b>R</b> Y <b>F</b> DGS <b>G</b> GN <b>N</b> HA <b>V</b> E <b>H</b> Y <b>R</b> ET <b>G</b> -Y <b>L</b> AV <b>L</b> KL <b>G</b> T <b>I</b> T <b>P</b> D <b>G</b> -A <b>D</b> V <b>S</b> Y <b>D</b> ED <b>D</b> M <b>V</b> LD <b>P</b> S--
Dm Usp5	(278)	--ER <b>H</b> LS <b>H</b> FG <b>I</b> N <b>M</b> AAM <b>K</b> SE <b>K</b> S <b>M</b> VE <b>L</b> EL <b>D</b> I <b>N</b> Q <b>R</b> IG <b>E</b> WT <b>A</b> LT <b>E</b> SE <b>S</b> E <b>L</b> Q <b>P</b> V <b>A</b> GP <b>G</b> --Y <b>T</b> GI
Sc Ubp14	(267)	<b>N</b> LG <b>S</b> AL <b>Q</b> I <b>Y</b> G <b>I</b> N <b>I</b> Q <b>E</b> K <b>I</b> AD <b>E</b> KT <b>L</b> V <b>Q</b> L <b>V</b> EQ <b>N</b> E-N <b>W</b> Q <b>F</b> R <b>M</b> V <b>D</b> SS <b>G</b> KE <b>F</b> E <b>K</b> LS <b>A</b> S <b>K</b> NY <b>G</b> CC <b>L</b>
Hs USP5	(272)	--EA <b>E</b> HL <b>S</b> H <b>F</b> GI <b>D</b> ML <b>K</b> M <b>Q</b> K <b>T</b> DK <b>T</b> M <b>T</b> E <b>L</b> E <b>I</b> DM <b>N</b> Q <b>R</b> IG <b>E</b> W <b>E</b> L <b>I</b> Q <b>E</b> SG <b>V</b> PL <b>K</b> PL <b>F</b> GP <b>G</b> --Y <b>T</b> GI
Dm Usp5	(335)	<b>R</b> N <b>L</b> GN <b>S</b> C <b>Y</b> I <b>N</b> S <b>V</b> M <b>Q</b> V <b>L</b> FV-- <b>I</b> PD <b>F</b> Q <b>R</b> F <b>V</b> GT <b>G</b> A <b>E</b> RY <b>E</b> KE <b>F</b> PS <b>D</b> EA <b>N</b> DF <b>N</b> I <b>Q</b> MA <b>K</b> L <b>G</b> T <b>G</b> L <b>Q</b>
Sc Ubp14	(326)	<b>I</b> N <b>L</b> GN <b>S</b> C <b>Y</b> L <b>N</b> S <b>V</b> I <b>Q</b> SL <b>V</b> NG <b>G</b> V <b>E</b> N <b>W</b> SL <b>D</b> FL <b>G</b> S----K <b>F</b> PL <b>D</b> V <b>V</b> Y <b>D</b> NN <b>L</b> K <b>C</b> OW <b>I</b> K <b>L</b> L <b>N</b> AM <b>K</b>
Hs USP5	(329)	<b>R</b> N <b>L</b> GN <b>S</b> C <b>Y</b> L <b>N</b> S <b>V</b> V <b>Q</b> V <b>L</b> F <b>S</b> -- <b>I</b> PD <b>F</b> Q <b>R</b> K <b>Y</b> V <b>D</b> K-- <b>L</b> E <b>K</b> I <b>F</b> Q <b>N</b> AP <b>T</b> D <b>T</b> Q <b>D</b> F <b>S</b> T <b>Q</b> V <b>A</b> K <b>L</b> GH <b>L</b> L
		*
Dm Usp5	(393)	<b>S</b> G <b>K</b> Y <b>S</b> IA <b>E</b> NT <b>L</b> D <b>T</b> D <b>H</b> S-----T <b>G</b> I <b>S</b> E <b>A</b> M <b>F</b> K <b>N</b> I <b>V</b> G <b>K</b> N <b>H</b> PD <b>F</b> ST <b>K</b> Q <b>Q</b> OD <b>A</b> ND <b>I</b> Y <b>L</b> H <b>L</b> L <b>T</b>
Sc Ubp14	(382)	<b>C</b> --E <b>P</b> E <b>L</b> Y <b>P</b> N-----G <b>I</b> K <b>E</b> TT <b>F</b> K <b>C</b> I <b>G</b> Q <b>N</b> H <b>Q</b> E <b>F</b> S <b>S</b> NR <b>Q</b> Q <b>A</b> ME <b>L</b> T <b>F</b> L <b>L</b> D
Hs USP5	(386)	<b>S</b> GE <b>Y</b> SK <b>P</b> V <b>P</b> ES <b>G</b> D <b>G</b> ER <b>V</b> PE <b>Q</b> KE <b>V</b> Q <b>D</b> GI <b>A</b> ER <b>M</b> F <b>K</b> AL <b>I</b> GR <b>G</b> H <b>P</b> E <b>F</b> ST <b>N</b> R <b>Q</b> Q <b>A</b> Q <b>E</b> FL <b>H</b> L <b>I</b> N
Dm Usp5	(446)	<b>L</b> LD <b>R</b> NS <b>R</b> N <b>Q</b> T----N <b>P</b> AD <b>A</b> L <b>K</b> FL <b>L</b> ED <b>R</b> VE <b>C</b> LA <b>S</b> H <b>K</b> V <b>K</b> Y <b>N</b> T <b>R</b> E <b>E</b> Y <b>S</b> F <b>R</b> LE <b>V</b> PL <b>D</b> K <b>A</b> T <b>N</b> LD
Sc Ubp14	(425)	<b>L</b> LD <b>K</b> K <b>F</b> F <b>S</b> SS <b>S</b> G <b>I</b> P <b>N</b> EN <b>D</b> L <b>V</b> R <b>M</b> ED <b>R</b> L <b>Q</b> C <b>N</b> I <b>C</b> G <b>K</b> V <b>K</b> Y <b>S</b> E <b>P</b> T <b>E</b> A <b>I</b> Q <b>I</b> PLE <b>E</b> N-----D
Hs USP5	(446)	<b>M</b> VER <b>N</b> CR <b>S</b> SE----N <b>P</b> NE <b>V</b> FR <b>L</b> VE <b>E</b> K <b>I</b> K <b>L</b> A <b>T</b> E <b>K</b> V <b>K</b> Y <b>T</b> Q <b>R</b> V <b>D</b> Y <b>I</b> M <b>Q</b> L <b>F</b> V <b>P</b> MD <b>A</b> AL <b>N</b> KE
Dm Usp5	(501)	<b>E</b> V <b>R</b> E <b>F</b> Q <b>E</b> R <b>K</b> KA <b>R</b> E <b>T</b> G <b>Q</b> R <b>L</b> PR <b>D</b> RI <b>V</b> R <b>H</b> K <b>V</b> PL <b>Q</b> AC <b>L</b> ER <b>F</b> FG <b>P</b> EL <b>I</b> E <b>Q</b> F <b>Y</b> ST <b>A</b> IG <b>S</b> KT <b>N</b> AR <b>K</b>
Sc Ubp14	(480)	<b>E</b> P <b>Q</b> D <b>M</b> LER----- <b>I</b> K <b>A</b> Y <b>F</b> E <b>G</b> ----- <b>Q</b> T <b>E</b> FK <b>C</b> AN <b>C</b> KE <b>K</b> VT <b>A</b> N <b>K</b>
Hs USP5	(501)	<b>E</b> LL <b>E</b> Y <b>E</b> E <b>K</b> K <b>R</b> Q <b>A</b> E <b>E</b> E <b>K</b> MA <b>L</b> P--E <b>L</b> V <b>R</b> A <b>Q</b> V <b>P</b> F <b>S</b> S <b>C</b> LE <b>A</b> Y <b>G</b> A <b>P</b> E <b>Q</b> V <b>D</b> D <b>F</b> W <b>S</b> T <b>A</b> L <b>Q</b> A <b>K</b> SV <b>A</b> V <b>K</b>
Dm Usp5	(561)	<b>I</b> TR <b>L</b> AT <b>M</b> ED <b>C</b> IM <b>H</b> V <b>G</b> K <b>F</b> T <b>L</b> G <b>D</b> D <b>V</b> PK <b>L</b> D <b>V</b> S <b>V</b> D <b>M</b> P-----D <b>E</b> LD <b>L</b> SN <b>W</b> RS <b>A</b> GL <b>Q</b> PG <b>E</b>
Sc Ubp14	(513)	<b>K</b> PG <b>F</b> K <b>S</b> L <b>Q</b> T <b>L</b> IL <b>N</b> PI <b>R</b> IR <b>L</b> Q <b>N</b> - <b>N</b> IP <b>V</b> K <b>T</b> S <b>N</b> EL <b>S</b> LP <b>L</b> GL <b>I</b> DR <b>D</b> ML <b>D</b> V <b>S</b> Y <b>L</b> S <b>Q</b> Q <b>F</b> DP <b>Q</b> T <b>E</b>
Hs USP5	(559)	<b>T</b> TR <b>F</b> AS <b>F</b> ED <b>Y</b> L <b>V</b> I <b>Q</b> IK <b>K</b> F <b>T</b> F <b>L</b> GW <b>V</b> PK <b>L</b> D <b>V</b> S <b>I</b> EM <b>P</b> -----E <b>E</b> LD <b>I</b> S <b>Q</b> LR <b>G</b> T <b>E</b> - <b>L</b> Q <b>P</b> G <b>E</b>
Dm Usp5	(615)	<b>E</b> AL <b>P</b> E <b>P</b> AT <b>E</b> EV <b>K</b> FA-----F <b>D</b> E <b>A</b> V <b>M</b> S <b>E</b> LL <b>T</b> M <b>G</b> F <b>P</b> PE
Sc Ubp14	(572)	<b>N</b> LL <b>P</b> DE <b>D</b> EN <b>R</b> SS <b>F</b> T-P-----N <b>Q</b> CS- <b>I</b> S <b>Q</b> L <b>I</b> E <b>M</b> GF <b>T</b> Q <b>N</b>
Hs USP5	(612)	<b>E</b> EL <b>P</b> DI <b>A</b> P <b>L</b> V <b>T</b> P <b>D</b> E <b>P</b> K <b>G</b> SL <b>G</b> F <b>Y</b> GN <b>E</b> DE <b>D</b> S <b>F</b> CS <b>P</b> H <b>F</b> SS <b>P</b> TS <b>P</b> ML <b>D</b> ES <b>V</b> I <b>Q</b> L <b>V</b> E <b>M</b> GF <b>P</b> MD
Dm Usp5	(646)	<b>A</b> CK <b>R</b> AC <b>Y</b> H <b>I</b> K <b>N</b> S <b>G</b> LE <b>A</b> SN <b>W</b> LM <b>E</b> H <b>I</b> A <b>D</b> E <b>I</b> SE <b>F</b> V <b>V</b> EN <b>S</b> - <b>I</b> G <b>D</b> CA <b>A</b> N <b>Q</b> F <b>V</b> AN <b>P</b> E <b>S</b> L <b>A</b> ML
Sc Ubp14	(603)	<b>A</b> SV <b>R</b> AL <b>F</b> N <b>T</b> GN <b>Q</b> DA <b>E</b> SA <b>M</b> N <b>W</b> LF <b>Q</b> MD <b>D</b> PL <b>N</b> D <b>F</b> V <b>P</b> E----P <b>N</b> V <b>P</b> K <b>K</b> D <b>K</b> R <b>E</b> V <b>D</b> EV <b>S</b> L <b>T</b> SM
Hs USP5	(672)	<b>A</b> CR <b>K</b> AV <b>Y</b> Y <b>T</b> GN <b>S</b> GA <b>E</b> AA <b>M</b> N <b>W</b> MS <b>H</b> MD <b>D</b> PF <b>A</b> N <b>L</b> IL <b>E</b> GS <b>G</b> PG <b>S</b> T <b>S</b> AA <b>A</b> D <b>P</b> PE <b>D</b> CV <b>T</b> TI
Dm Usp5	(705)	<b>M</b> SM <b>G</b> F <b>D</b> ER <b>Q</b> AV <b>A</b> AL <b>K</b> AT <b>D</b> GN <b>V</b> ER <b>A</b> T <b>D</b> W <b>I</b> NS <b>H</b> AD <b>S</b> I <b>G</b> V <b>E</b> DA <b>A</b> PA <b>A</b> N---SS <b>A</b> AA <b>S</b> ST <b>P</b> N <b>K</b>
Sc Ubp14	(659)	<b>L</b> SM <b>G</b> L <b>N</b> P <b>N</b> L <b>C</b> R <b>K</b> AL <b>I</b> L <b>N</b> NG <b>D</b> V <b>N</b> R <b>S</b> VE <b>W</b> V <b>F</b> NN <b>M</b> DD <b>G</b> T <b>F</b> PE <b>P</b> EV <b>P</b> N-----E- <b>E</b> Q <b>Q</b> Q <b>K</b>
Hs USP5	(732)	<b>V</b> SM <b>G</b> F <b>S</b> RD <b>Q</b> AL <b>K</b> AL <b>R</b> AT <b>N</b> NS <b>L</b> E <b>A</b> VD <b>W</b> I <b>N</b> SH <b>I</b> DD <b>L</b> DA <b>E</b> AA <b>M</b> D <b>I</b> SE <b>G</b> RS <b>A</b> AD <b>S</b> I <b>S</b> ES <b>V</b> P <b>V</b> G
Dm Usp5	(762)	<b>T</b> NY <b>R</b> D <b>G</b> R <b>G</b> K <b>Y</b> RL <b>V</b> A <b>F</b> I <b>S</b> H <b>M</b> CT <b>S</b> A <b>Q</b> V <b>G</b> H <b>Y</b> V <b>C</b> H <b>I</b> R <b>K</b> ----K <b>G</b> E <b>W</b> V <b>I</b> F <b>N</b> D <b>S</b> K <b>V</b> A <b>K</b> S <b>Q</b> -- <b>N</b> PP <b>K</b>
Sc Ubp14	(711)	<b>D</b> LG <b>Y</b> ST <b>A</b> K <b>P</b> AL <b>T</b> AV <b>L</b> CH <b>K</b> NS <b>V</b> HS <b>G</b> H <b>Y</b> V <b>F</b> IR <b>K</b> LV <b>A</b> D <b>K</b> W <b>K</b> W <b>V</b> LY <b>N</b> DE <b>K</b> LV <b>A</b> AD <b>S</b> I <b>E</b> DM <b>K</b>
Hs USP5	(792)	<b>P</b> K <b>V</b> R <b>D</b> GP <b>G</b> K <b>Y</b> QL <b>F</b> A <b>F</b> I <b>S</b> H <b>M</b> CT <b>S</b> T <b>M</b> CG <b>H</b> Y <b>V</b> CH <b>I</b> KK----E <b>G</b> R <b>W</b> V <b>I</b> Y <b>N</b> D <b>Q</b> K <b>V</b> C <b>A</b> SE-- <b>K</b> PP <b>K</b>
		*
Dm Usp5	(816)	<b>D</b> LG <b>Y</b> LY <b>L</b> M <b>R</b> EQ-
Sc Ubp14	(771)	<b>K</b> NG <b>Y</b> I <b>V</b> F <b>I</b> R <b>C</b> --
Hs USP5	(846)	<b>D</b> LG <b>Y</b> I <b>V</b> F <b>Q</b> R <b>V</b> AS

**III. melléklet A DmUsp14 aminosavszekvenciájának összehasonlítása a humán USP14 és az élesztő Ubp6 szekvenciájával.** Pirossal az azonos, sárgával a hasonló jelleg aminosavak vannak jelölve. Lila kerettel az ubikvitin szer domén (UBL) van kiemelve. Csillagok jelölik a katalitikus cisztein és hisztidin pozícióját.

<i>Dm</i> Usp14 (1)	--MPA <b>FKVKVKG</b> RELYTD <b>I</b> VVNTDEEP <b>IILFKAQLFALTGVQ</b> PD <b>RQKVMCKGGI</b> LKDDQW
<i>Hs</i> USP14 (1)	--MPL <b>YSVTVKWG</b> KEK <b>FE</b> GV <b>EL</b> NTDEPP <b>VMFKAQLFALTGVQ</b> PAR <b>QKVMVKG</b> GT <b>LKDD</b> DW
<i>Sc</i> Ubp6 (1)	MSGET <b>FEFNIRHSGK</b> -VYP <b>ITL</b> ST <b>DATSADL</b> K <b>SKAEELTQ</b> PSAR <b>QKYMVK</b> G <b>GLS</b> GEESI
<i>Dm</i> Usp14 (59)	N--LQ <b>IKDCA</b> VV <b>LL</b> GS <b>KES</b> -V <b>PE</b> V <b>PATPVK</b> <b>F</b> IED <b>MNEAE</b> -A <b>AT</b> AM <b>R</b> L <b>FAG</b> L <b>TN</b> L <b>G</b> NT <b>CTC</b> <b>Y</b>
<i>Hs</i> USP14 (59)	GN- <b>IK</b> IK <b>NG</b> MT <b>LL</b> MM <b>GS</b> ADA-L <b>PE</b> E <b>PSAK</b> T <b>VE</b> VED <b>M</b> T <b>EEQ</b> -L <b>AS</b> AME <b>L</b> PC <b>GL</b> T <b>N</b> L <b>G</b> NT <b>CTC</b> <b>Y</b>
<i>Sc</i> Ubp6 (60)	K <b>IY</b> PL <b>IK</b> PC <b>ST</b> V <b>M</b> LL <b>GT</b> PDAN <b>L</b> ISK <b>PA</b> K <b>KN</b> NE <b>I</b> ED <b>L</b> A <b>PE</b> Q <b>Q</b> V <b>Q</b> FA <b>Q</b> L <b>EV</b> GF <b>K</b> N <b>M</b> GT <b>CTC</b> <b>Y</b>
	*
<i>Dm</i> Usp14 (115)	M <b>N</b> AT <b>V</b> Q <b>CL</b> NA <b>VP</b> EL <b>R</b> TAL <b>ST</b> F <b>S</b> ND <b>G</b> --T <b>D</b> T <b>M</b> ST <b>---</b> AF <b>S</b> <b>SS</b> AM <b>K</b> S <b>I</b> FA <b>Q</b> M <b>-</b> E <b>K</b> G <b>-</b> TT <b>V</b>
<i>Hs</i> USP14 (116)	M <b>N</b> AT <b>V</b> Q <b>C</b> IR <b>SV</b> PE <b>L</b> KD <b>AL</b> K <b>R</b> Y <b>AG</b> AL <b>R</b> AS <b>G</b> EM <b>AS</b> ----A <b>Q</b> Y <b>T</b> TA <b>AL</b> R <b>D</b> L <b>F</b> DS <b>M</b> -D <b>K</b> T <b>S</b> SS <b>I</b>
<i>Sc</i> Ubp6 (120)	L <b>N</b> AT <b>L</b> Q <b>AL</b> Y <b>R</b> ND <b>L</b> R <b>D</b> M <b>IL</b> NY <b>N</b> PS <b>Q</b> GV <b>S</b> NS <b>G</b> A <b>Q</b> DE <b>E</b> I <b>H</b> K <b>Q</b> <b>VI</b> EM <b>K</b> R <b>CF</b> EN <b>L</b> Q <b>N</b> K <b>S</b> F <b>K</b> SV
<i>Dm</i> Usp14 (167)	T <b>P</b> I <b>V</b> LL <b>Q</b> AL <b>H</b> RAS <b>P</b> Q <b>F</b> A <b>Q</b> T <b>G</b> ENG <b>-</b> TY <b>R</b> Q <b>D</b> AN <b>E</b> C <b>WA</b> E <b>I</b> L <b>K</b> M <b>L</b> Q <b>Q</b> K <b>L</b> R <b>P</b> K <b>N</b> Q <b>E</b> P <b>-----</b>
<i>Hs</i> USP14 (171)	P <b>P</b> I <b>I</b> LL <b>Q</b> F <b>L</b> H <b>M</b> A <b>F</b> P <b>Q</b> F <b>A</b> E <b>K</b> G <b>E</b> Q <b>G</b> -Q <b>Y</b> L <b>Q</b> D <b>A</b> N <b>E</b> C <b>W</b> I <b>Q</b> M <b>M</b> R <b>V</b> L <b>Q</b> Q <b>K</b> L <b>E</b> A <b>I</b> E <b>D</b> D <b>S</b> V <b>K</b> E <b>T</b> D <b>S</b>
<i>Sc</i> Ubp6 (169)	L <b>P</b> I <b>V</b> LL <b>I</b> NT <b>L</b> R <b>K</b> C <b>Y</b> P <b>Q</b> F <b>A</b> ER <b>D</b> S <b>Q</b> G <b>F</b> Y <b>K</b> Q <b>D</b> A <b>E</b> E <b>L</b> F <b>T</b> Q <b>L</b> F <b>H</b> S <b>M</b> S <b>I</b> V <b>F</b> G <b>D</b> K <b>-----</b>
<i>Dm</i> Usp14 (219)	--S <b>N</b> T <b>V</b> Q <b>K</b> R <b>H</b> SS <b>F</b> I <b>D</b> Q <b>F</b> <b>F</b> GG <b>T</b> F <b>EV</b> K <b>MS</b> SE <b>ED</b> P <b>DE</b> P <b>ST</b> V <b>T</b> S <b>EN</b> F <b>L</b> Q <b>L</b> S <b>CF</b> <b>I</b> S <b>M</b> D <b>V</b> K <b>Y</b> M <b>Q</b> S <b>G</b>
<i>Hs</i> USP14 (230)	S <b>A</b> S <b>A</b> AT <b>P</b> S <b>K</b> K <b>K</b> S <b>L</b> I <b>D</b> Q <b>F</b> <b>F</b> GV <b>EF</b> ET <b>TM</b> K <b>CTE</b> S <b>EEEE</b> V <b>T</b> K <b>G</b> EN <b>Q</b> L <b>Q</b> L <b>S</b> CF <b>I</b> N <b>Q</b> E <b>V</b> K <b>Y</b> L <b>F</b> T <b>G</b>
<i>Sc</i> Ubp6 (218)	----- <b>F</b> S <b>E</b> D <b>E</b> R <b>I</b> Q <b>E</b> K <b>T</b> T <b>I</b> K <b>D</b> T <b>A</b> N <b>D</b> N <b>D</b> I <b>T</b> V <b>K</b> E <b>N</b> E <b>S</b> D <b>S</b> K <b>L</b> Q <b>C</b> H <b>I</b> S <b>G</b> T <b>I</b> N <b>F</b> M <b>R</b> N <b>G</b>
<i>Dm</i> Usp14 (277)	<b>L</b> K <b>S</b> K <b>M</b> K <b>E</b> Q <b>L</b> V <b>K</b> K <b>S</b> E <b>T</b> L <b>G</b> R <b>D</b> A <b>K</b> Y <b>I</b> R <b>T</b> Y <b>L</b> V <b>S</b> R <b>L</b> P <b>A</b> Y <b>L</b> T <b>V</b> Q <b>F</b> V <b>R</b> F <b>Q</b> Y <b>K</b> G <b>K</b> E <b>G</b> I <b>N</b> A <b>K</b> V <b>L</b> K <b>D</b> I <b>K</b> F
<i>Hs</i> USP14 (290)	<b>L</b> K <b>L</b> R <b>L</b> Q <b>E</b> E <b>I</b> T <b>K</b> Q <b>S</b> P <b>T</b> L <b>Q</b> R <b>N</b> A <b>L</b> Y <b>I</b> K <b>S</b> S <b>K</b> I <b>S</b> R <b>L</b> P <b>A</b> Y <b>L</b> T <b>I</b> Q <b>M</b> V <b>R</b> F <b>F</b> Y <b>K</b> E <b>K</b> E <b>S</b> V <b>N</b> A <b>K</b> V <b>L</b> K <b>D</b> V <b>K</b> F
<i>Sc</i> Ubp6 (265)	<b>L</b> L <b>E</b> GL <b>N</b> E <b>K</b> I <b>E</b> K <b>R</b> S <b>D</b> L <b>T</b> G <b>A</b> N <b>S</b> I <b>Y</b> S <b>V</b> E <b>K</b> K <b>I</b> S <b>R</b> L <b>E</b> K <b>F</b> L <b>T</b> V <b>Q</b> Y <b>V</b> R <b>F</b> W <b>K</b> R <b>S</b> T <b>N</b> K <b>K</b> S <b>K</b> I <b>L</b> R <b>K</b> V <b>V</b> F
<i>Dm</i> Usp14 (337)	<b>F</b> I <b>D</b> F <b>D</b> A <b>F</b> E <b>L</b> C <b>T</b> P <b>E</b> L <b>Q</b> N <b>K</b> L <b>C</b> P <b>M</b> R <b>S</b> K <b>F</b> K <b>D</b> L <b>E</b> D <b>K</b> <b>M</b> E <b>V</b> D <b>V</b> V <b>K</b> R <b>N</b> E <b>P</b> N <b>-----</b> EE <b>-----</b>
<i>Hs</i> USP14 (350)	<b>E</b> L <b>M</b> L <b>D</b> M <b>Y</b> E <b>L</b> C <b>T</b> P <b>E</b> L <b>Q</b> E <b>K</b> M <b>V</b> S <b>F</b> R <b>S</b> K <b>F</b> K <b>D</b> L <b>E</b> D <b>K</b> <b>V</b> N <b>Q</b> P <b>N</b> T <b>S</b> D <b>K</b> K <b>S</b> ----- <b>S</b> P <b>-----</b>
<i>Sc</i> Ubp6 (325)	<b>P</b> F <b>Q</b> L <b>D</b> V <b>A</b> D <b>M</b> L <b>T</b> P <b>E</b> Y <b>A</b> A <b>E</b> K <b>V</b> K <b>V</b> R <b>D</b> E <b>L</b> R <b>K</b> V <b>E</b> K <b>E</b> K <b>NE</b> K <b>E</b> R <b>E</b> I <b>K</b> R <b>R</b> K <b>F</b> D <b>P</b> S <b>S</b> S <b>E</b> N <b>V</b> M <b>T</b> P <b>R</b> E <b>Q</b> Y <b>E</b>
<i>Dm</i> Usp14 (383)	----- <b>K</b> K <b>D</b> V <b>---</b> <b>K</b> Y <b>E</b> Q <b>E</b> <b>W</b> F <b>D</b> D <b>D</b> L <b>G</b> S <b>N</b> N <b>S</b> G <b>Y</b> T <b>L</b> Q <b>A</b> V <b>L</b> T <b>H</b> K <b>R</b> S <b>S</b> S <b>S</b> G <b>H</b> V <b>A</b> V <b>V</b> R <b>S</b> S
<i>Hs</i> USP14 (396)	----- <b>Q</b> K <b>E</b> V <b>---</b> <b>K</b> Y <b>E</b> P <b>E</b> <b>S</b> F <b>A</b> D <b>D</b> I <b>G</b> S <b>N</b> N <b>C</b> G <b>Y</b> D <b>L</b> Q <b>A</b> V <b>L</b> T <b>H</b> Q <b>R</b> S <b>S</b> S <b>S</b> G <b>H</b> V <b>S</b> V <b>V</b> K <b>R</b> K
<i>Sc</i> Ubp6 (385)	T <b>Q</b> V <b>A</b> L <b>N</b> E <b>S</b> E <b>K</b> D <b>Q</b> W <b>L</b> E <b>E</b> Y <b>K</b> K <b>H</b> E <b>P</b> P <b>N</b> L <b>E</b> K <b>G</b> E <b>N</b> P <b>S</b> C <b>V</b> Y <b>N</b> L <b>I</b> G <b>V</b> I <b>T</b> H <b>Q</b> A <b>N</b> S <b>E</b> S <b>G</b> H <b>Y</b> Q <b>A</b> F <b>I</b> R <b>D</b> E
	*
<i>Dm</i> Usp14 (431)	--G <b>D</b> V <b>W</b> F <b>K</b> E <b>D</b> D <b>E</b> V <b>S</b> A <b>V</b> A <b>T</b> D <b>E</b> <b>I</b> L <b>R</b> L <b>S</b> G <b>G</b> D <b>W</b> H <b>C</b> A <b>Y</b> V <b>L</b> L <b>Y</b> A <b>P</b> R <b>R</b> L <b>E</b> K <b>L</b> -----
<i>Hs</i> USP14 (444)	--Q <b>D</b> E <b>W</b> I <b>K</b> F <b>D</b> D <b>D</b> K <b>V</b> S <b>I</b> V <b>T</b> P <b>E</b> D <b>I</b> L <b>R</b> L <b>S</b> G <b>G</b> D <b>W</b> H <b>I</b> A <b>Y</b> V <b>L</b> L <b>Y</b> G <b>P</b> R <b>R</b> V <b>E</b> I <b>M</b> E <b>E</b> E <b>S</b> E <b>Q</b>
<i>Sc</i> Ubp6 (445)	L <b>D</b> E <b>N</b> K <b>W</b> Y <b>K</b> F <b>N</b> D <b>D</b> K <b>V</b> S <b>V</b> E <b>K</b> E <b>K</b> <b>E</b> S <b>L</b> A <b>G</b> G <b>G</b> E <b>S</b> D <b>S</b> A <b>L</b> I <b>L</b> M <b>Y</b> K <b>G</b> F <b>L</b> -----

**IV. melléklet A DmUsp5 transzgénikus túltermeltetése nagymolekulasúlyú ubikvitilált formák h mérsékletfügg felhalmozódásához vezet.** A jelzett h mérsékleteken nevelt DmUsp5 túltermel vándorló lárvákból fehérjeextraktumot készítettünk. A mintákat 8% SDS-PAGE gélen futattuk és PVDF membránra blottoltuk. Ezt követ en poliklonális anti-ubikvitin ellenanyaggal immunfestést végeztünk.



## V. melléklet A *DmUsp5* jellemzéséhez felhasznált *Drosophila* törzsek és genetikai markerek jellemzői, egyszerű sített genotípusa

- Act5C-GAL4***: olyan muslica drivertözs, amelyben az élesztőből származó GAL4 transzkripció iniciátor fehérje termelését a *Drosophila Actin5C* gén szabályozó régiója irányítja. Az ivarvonal kivételével minden sejtben lehetővé teszi az UAS enhanszerrel rendelkező transzgének kifejezését.
- CG12082<sup>1</sup>***: a *P{EPgy2}EY20760* elem remobilizációjával előállított deléciós mutáns allél. A deléció funkcionális null allélt eredményez. Ezt az allélt a dolgozat Eredmények fejezetének 6. alfejezete után *DmUsp5<sup>1</sup>*-ként jelölöm.
- CG12082<sup>2</sup>***: a *P{EPgy2}EY23569* elem remobilizációjával előállított deléciós mutáns allél. A deléció funkcionális null allélt eredményez. Ezt az allélt a dolgozat Eredmények fejezetének 6. alfejezete után *DmUsp5<sup>2</sup>*-ként jelölöm.
- CG12082<sup>EY20760</sup>***: a bloomingtoni törzsközponból származó P elem inszerciós mutáns. A *P{EPgy2}EY20760* elem a *CG12082* gén 3' kódoló régiójába van beépülve.
- CG12082<sup>EY23569</sup>***: a bloomingtoni törzsközponból származó P elem inszerciós mutáns. A *P{EPgy2}EY23569* elem a *CG12082* gén 5' nem kódoló régiójába van beépülve.
- CG12082<sup>JF02163</sup>***: a bloomingtoni törzsközponból származó transzgénikus RNS interferencia vonal, amelynek indukciójával a *CG12082* gén csendesíthető.
- CG12082<sup>NIG.12082R-2</sup>***: a japán Nemzeti Genetikai Intézet törzsközponjából (NIG-Fly) származó származó transzgénikus RNS interferencia vonal, amelynek indukciójával csendesíthető a *CG12082* gén.
- CG12082<sup>v17567</sup>***: a bécsi törzsközponból (VDRC) származó transzgénikus RNS interferencia vonal, amelynek indukciójával csendesíthető a *CG12082* gén.
- CyO, actGFP***: balanszer kromoszóma, a 2. kromoszómát balanszírozza. Több inverzió található benne, ezáltal gátolja a rekombinációt. *Cy* (Curly – kunkori szárny) domináns markermutációt hordoz, illetve GFP-t expresszál, ezáltal lehetővé teszi, hogy fluoreszcens mikroszkóppal bármelyik fejlődési stádiumban azonosíthassuk a balanszert hordozó állatokat.
- CyO***: balanszer kromoszóma, a 2. kromoszómát balanszírozza. Több inverzió található benne, ezáltal gátolja a rekombinációt. *Cy* (Curly – kunkori szárny) domináns markermutációt hordoz.
- da-GAL4***: olyan muslica drivertözs, amelyben az élesztőből származó GAL4 transzkripció iniciátor fehérje termelését a *Drosophila daughterless* gén szabályozó régiója

irányítja. Az ivarvonal kivételével minden sejtben lehet vé teszi az *UAS* enhanszerrel rendelkező transzsgének kifejezését. *da*> jellel jelölöm, hogyha egy transzsgén (RNS interferencia- vagy túltermelés konstrukció) a *da-GAL4* driverrel van indukálva.

***Df(3R)C4***: a 3. kromoszóma jobb karját érint recesszív letális deficiencia.

***DmUsp14*<sup>00779</sup>**: a bloomingtoni törzsközpontról származó, piggyBac transzpozon inszerciót hordozó törzs. A *PBac{WH}* elem a *DmUsp14* gén 1. intronja és 2. exonja közé épült be, és hipomorf mutáns allélt eredményezett.

***DmUsp14*<sup>110227</sup>**: a bécsi törzsközpontról (VDRC) származó transzsgénikus RNS interferencia vonal, amelynek indukciójával csendesíthető a *DmUsp14* gén.

***ey-GAL4***: olyan muslica drivertörzs, amelyben az élesztőből származó GAL4 transzkripciósi iniciátor fehérje termelését a *Drosophila eyeless* gén szabályozó régiója irányítja. A szemkezdeményekben teszi lehetővé az *UAS* enhanszerrel rendelkező transzsgének kifejezését. *ey*> jellel jelölöm, hogyha egy transzsgén (RNS interferencia- vagy túltermelés konstrukció) az *ey-GAL4* driverrel van indukálva.

***FLAG-CG12082***: olyan transzsgénikus konstrukció, amely a *CG12082* mérsékelt túltermelését teszi lehetővé (részleteket lásd az Anyagok és módszerek fejezetben). A konstrukcióról képződött vad típusú fehérje N-terminálisa FLAG-gel van jelölve. Ezt a transzsgént a dolgozat Eredmények fejezetének 6. alfejezete után ***FLAG-DmUsp5***-ként jelölöm.

***GFP-CG12082***: olyan transzsgénikus konstrukció, amely a *CG12082* mérsékelt túltermelését teszi lehetővé (részleteket lásd az Anyagok és módszerek fejezetben). A konstrukcióról képződött vad típusú fehérje N-terminálisa GFP-vel van jelölve. Ezt a transzsgént a dolgozat Eredmények fejezetének 6. alfejezete után ***GFP-DmUsp5***-ként jelölöm.

***TM3, Sb P( 2-3)***: a 2-3 transzpozáz enzimet termelő kromoszóma. A 2-3 transzpozáz mobilizálja a saját transzpozáz génjét és megfosztott, mutagenézisre használható P elemet. A transzpozáz termelő módosított P elem a ***TM3, Sb*** balanszer kromoszómán található.

***TM3, Sb Ser***: balanszer kromoszóma, a 3. kromoszómát balanszírozza. Több inverzió található benne, ezáltal gátolja a rekombinációt. *Sb* (Stubble - rövid szár) és *Ser* (Serrate - recés szárny) marker mutációt hordozza.

***TM6B, Tb Hu actGFP***: balanszer kromoszóma, a 2. kromoszómát balanszírozza. Több inverzió található benne, ezáltal gátolja a rekombinációt. *Tb* (Tubby – tömzsi test) és *Hu* (Humeral – szárnyvállszőrzet) domináns marker mutációt hordoz, illetve GFP-t expresszál, ezáltal lehetővé teszi, hogy fluoreszcens mikroszkóppal bármelyik fejlődési stádiumban azonosíthassuk a balanszert hordozó állatokat.

***UAS-CG12082***: olyan transzgénikus konstrukció, amely a *CG12082* er s túltermelését teszi lehetővé (részleteket lásd az Anyagok és módszerek fejezetben). A transzgénr l vad típusú fehérje képz dik. Ezt a transzgént a dolgozat Eredmények fejezetének 6. alfejezete után ***UAS-DmUsp5***-ként jelölöm.

***UAS-DIAP1<sup>V85M</sup>***: olyan transzgénikus konstrukció, amely a DIAP1 funkcionyeréses mutáns változatának túltermelését teszi lehetővé. A V85M mutáció a 85. pozícióban lévő valin metioninra történ cseréjéhez vezet. Err l a mutációról ismert, hogy a vad típusú DIAP1-nél er sebben képes szupresszálni az apoptózist.

RESEARCH ARTICLE

# Role of the Deubiquitylating Enzyme DmUsp5 in Coupling Ubiquitin Equilibrium to Development and Apoptosis in *Drosophila melanogaster*

Levente Kovács<sup>1,2</sup>, Olga Nagy<sup>2</sup>, Margit Pál<sup>1,2</sup>, Andor Udvardy<sup>2</sup>, Octavian Popescu<sup>3a</sup>, Péter Deák<sup>1,2\*</sup>

**1** Department of Genetics, University of Szeged, Szeged, Hungary, **2** Institute of Biochemistry, Biological Research Centre, Hungarian Academy of Sciences, Szeged, Hungary, **3** Molecular Biology Center, Interdisciplinary Research Institute on Bio-Nano-Sciences, Babes-Bolyai University, Cluj-Napoca, Romania

✉ Current address: Department of Microbiology, Institute of Biology Bucharest, Romanian Academy, Bucharest, Romania

\* [deakp@bio.u-szeged.hu](mailto:deakp@bio.u-szeged.hu)



OPEN ACCESS

**Citation:** Kovács L, Nagy O, Pál M, Udvardy A, Popescu O, 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. doi:10.1371/journal.pone.0120875

**Academic Editor:** Sue Cotterill, St. Georges University of London, UNITED KINGDOM

**Received:** November 7, 2014

**Accepted:** January 27, 2015

**Published:** March 25, 2015

**Copyright:** © 2015 Kovács et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by the European Union and co-financed by the European Social Fund, project numbers TÁMOP4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0035 and TÁMOP-4.1.1.C-13/1/KONV-2014-0001 together with the European Union Hungary-Romania Cross-Border Co-operation Programme grant, grant number HURO/1101/173/2.2 and a Hungarian Scientific Research Fund (OTKA) grant awarded to PD (K 68784). The funders had no role in study

## Abstract

Protein ubiquitylation is a dynamic process that affects the function and stability of proteins and controls essential cellular processes ranging from cell proliferation to cell death. This process is regulated through the balanced action of E3 ubiquitin ligases and deubiquitylating enzymes (DUB) which conjugate ubiquitins to, and remove them from target proteins, respectively. Our genetic analysis has revealed that the deubiquitylating enzyme DmUsp5 is required for maintenance of the ubiquitin equilibrium, cell survival and normal development in *Drosophila*. Loss of the *DmUsp5* function leads to late larval lethality accompanied by the induction of apoptosis. Detailed analyses at a cellular level demonstrated that *DmUsp5* mutants carry multiple abnormalities, including a drop in the free monoubiquitin level, the excessive accumulation of free polyubiquitins, polyubiquitylated proteins and subunits of the 26S proteasome. A shortage in free ubiquitins results in the induction of a ubiquitin stress response previously described only in the unicellular budding yeast. It is characterized by the induction of the proteasome-associated deubiquitylase DmUsp14 and sensitivity to cycloheximide. Removal of *DmUsp5* also activates the pro-apoptotic machinery thereby resulting in widespread apoptosis, indicative of an anti-apoptotic role of DmUsp5. Collectively, the pleiotropic effects of a loss of DmUsp5 function can be explained in terms of the existence of a limited pool of free monoubiquitins which makes the ubiquitin-dependent processes mutually interdependent.



design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Introduction

Ubiquitylation is the posttranslational modification of target proteins with an ubiquitin monomer or a polyubiquitin chain [1]. It directly affects protein turnover and basic intracellular processes, including cell cycle regulation and programmed cell death [2, 3]. Ubiquitin can be linked to proteins via an isopeptide bond between an internal lysine of the target protein and the terminal glycine residue of ubiquitin. Polyubiquitin chains are generated by ubiquitin polymerization through isopeptide bonds, most frequently between an internal lysine residue of the target protein and the terminal glycine of an incoming ubiquitin monomer [4]. Ubiquitylation is catalyzed by an enzyme cascade involving at least three different enzymes, with ubiquitin-activating (E1), ubiquitin-conjugating (E2), and ubiquitin ligase (E3) activities [5, 6]. Polyubiquitylation most frequently targets proteins for proteasomal degradation, but other, nondegradative roles are also well known [7, 8].

Apoptosis or programmed cell death is a key physiological process that is involved in shaping the development of multicellular organisms [9]. It is initiated by different death stimuli and culminates in the activation of a cascade of cysteine proteases, called caspases, which execute destruction. Since nearly all eukaryotic cells constitutively express all components of the apoptotic machinery, caspase activation must be regulated by a very precise and sensitive mechanism, if untimely cell death is to be prevented. In the course of the past decade, it has become firmly established that ubiquitylation has a major role in regulating apoptosis. Key apoptotic regulators, the inhibitor of apoptosis proteins (IAPs), are themselves E3 ubiquitin ligases, and the availability and abundance of the main pro- and anti-apoptotic proteins, including caspases, IAPs and IAP antagonists, are regulated by ubiquitin-mediated protein degradation [10]. More recently, nondegradative ubiquitylation, other E3 ligases and certain deubiquitylating enzymes have been reported to have roles in apoptosis [11, 12, 13], and it is conceivable that more ubiquitin pathway components will be linked to apoptosis.

Like other posttranslational modifications, ubiquitylation is a dynamic and reversible process in which deubiquitylating enzymes or DUBs counteract ubiquitin ligases by removing covalently linked ubiquitins from substrate proteins [14]. The DUBs are structurally diverse isopeptidases that specifically cleave ubiquitin conjugates at the ubiquitin carboxyl end. The activities of DUBs include the removal of intact ubiquitin monomers and polyubiquitin chains from conjugates, the disassembly of unanchored polyubiquitin chains to give intact monomers, and the processing of inactive ubiquitin precursor fusion proteins [15]. It has been well established that protein ubiquitylation is regulated by the coordinated action of ubiquitin ligases and deubiquitylating enzymes. This and the quite large number of known DUBs suggest the importance of deubiquitylation, perhaps because it permits a further layer of regulation in the ubiquitin-mediated biological processes, such as apoptosis.

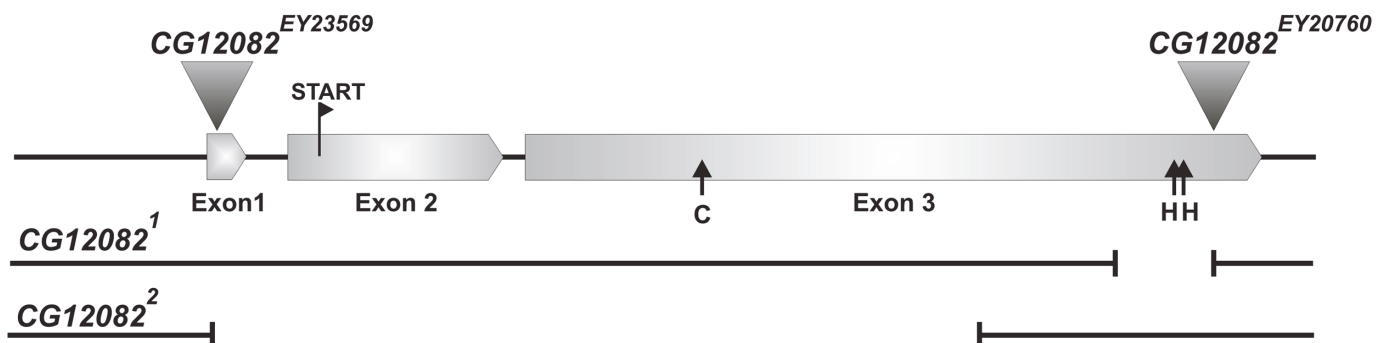
In general, more is known about the biochemical and structural properties of DUBs than about their biological function. Reports relating to their physiological significance have mostly involved unicellular organisms and cell lines, although systematic functional analyses of DUBs in genetically tractable, intact multicellular organisms have also started to emerge [16, 17]. The biochemically best known DUB is Ubp14 from budding yeast and its USP5 or isopeptidase T ortholog from human cell lines [18, 19]. *In vitro* studies have revealed that this enzyme disassembles free polyubiquitin chains, most frequently liberated from ubiquitylated proteins just before proteasomal degradation [5, 20]. Deletion of the *UBP14* gene has been found to result in an accumulation of free polyubiquitin chains and the inhibition of proteasomal degradation [19]. Suppression of the human *USP5* gene also causes the accumulation of unanchored polyubiquitins and enhances the intracellular level of p53 [21]. Another study has demonstrated that USP5 is required for the efficient repair of DNA double-strand breaks in HeLa cells [22].

Annotation of the *Drosophila* genome sequence revealed that the *CG12082* gene encodes a protein with a similar aminoacid sequence to Ubp14/USP5 and it was later confirmed that it is an essential gene [23]. To date, only roles in activating apoptosis and the JNK pathway in the developing eye have been described for the *Drosophila* Ubp14/USP5 protein [24]. The heterologous complementation experiments reported here demonstrated that the protein encoded by the *CG12082* gene is a functional ortholog of the yeast/human Ubp14/USP5 protein, and a detailed phenotypic analysis of the partial and complete loss of function mutants is presented. Multiple abnormalities are revealed that lead to the induction of a phenomenon previously described only in the unicellular budding yeast: the ubiquitin stress response. The removal of *DmUsp5* additionally activates the pro-apoptotic machinery that results in widespread apoptosis in imaginal discs and the larval brain, pointing to a general anti-apoptotic role of DmUsp5. Apoptosis probably occurs through the downregulation of DIAP1, overexpression of which partially rescues both the lethal and apoptotic phenotypes of *DmUsp5* mutants. In summary, the phenotypic analysis presented here clearly indicates the importance of DmUsp5 in the normal progression of the ubiquitin cycle, and how this links ubiquitin-dependent processes such as protein degradation, apoptosis and development.

## Results

### Disruption of *CG12082* results in late larval and pupal lethality and widespread apoptosis

In a screen of transgenic RNA interference (RNAi) lines specific for genes coding for putative deubiquitylating enzymes, we used the Act5C-Gal4 and da-Gal4 general drivers for gene silencing and determined the resulting phenotypes. We identified several lines with a late lethal phenotype accompanied by widespread apoptosis in imaginal discs. Since silencing of the *CG12082* gene resulted in one of the most outstanding apoptotic phenotypes, we decided to further characterize this. For this purpose, we obtained independent transgenic RNAi lines (*CG12082*<sup>v17567</sup>, *CG12082*<sup>F02163</sup> and *CG12082*<sup>NIG.12082R-2</sup>) and P element insertion alleles (*CG12082*<sup>EY20760</sup> and *CG12082*<sup>EY23569</sup>), and isolated new alleles of *CG12082* (*CG12082*<sup>1</sup> and *CG12082*<sup>2</sup>) by P element remobilization (Fig. 1). These lines form an allelic series with expression phenotypes ranging from basically wild type (*CG12082*<sup>EY23569</sup>) through different hypomorphs to functional (*CG12082*<sup>1</sup>) and true null (*CG12082*<sup>2</sup>) alleles (Table 1). They influence development to extents depending on their degree of expression/loss of function, leading to viable, pupal or third-stage larval (L3) lethality (Table 1 and S1 Fig.). The lethal phenotype of the



**Fig 1. Schematic representation of *CG12082* P element insertion and deletion alleles.** Triangles indicate the sites of P element insertions, while broken lines mark deleted segments in newly isolated mutants. Black arrows indicate positions of catalytic cysteine (C) and histidine (H) codons.

doi:10.1371/journal.pone.0120875.g001

**Table 1. Lethality of *CG12082* and *DmUsp14* alleles.**

Genotype	Gene dose	Lethal phase			
		L3 larva	Pupa	Pharate adult	Viable
Oregon-R	Wild type			5%	95%
<i>da&gt;CG12082<sup>v17567</sup></i>	Weak hypomorph	20%	80%		
<i>da&gt;CG12082<sup>NIG.12082R-2</sup></i>	Hypomorph	30%	70%		
<i>da&gt;CG12082<sup>JF02163</sup></i>	Strong hypomorph	70%	30%		
<i>CG12082<sup>EY23569</sup></i>	Wild type			3%	97%
<i>CG12082<sup>EY20760</sup></i>	Functional null	91%			
<i>CG12082<sup>1</sup></i>	Functional null	93%			
<i>CG12082<sup>2</sup></i>	True null	96%			
<i>da&gt;DmUsp14<sup>v110227</sup></i>	Hypomorph			6%	94%
<i>DmUsp14<sup>f00779</sup></i>	Strong hypomorph			7%	93% <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Sterile males

doi:10.1371/journal.pone.0120875.t001

null mutants could be rescued by moderate expression of the wild type *CG12082* sequence (Table 2).

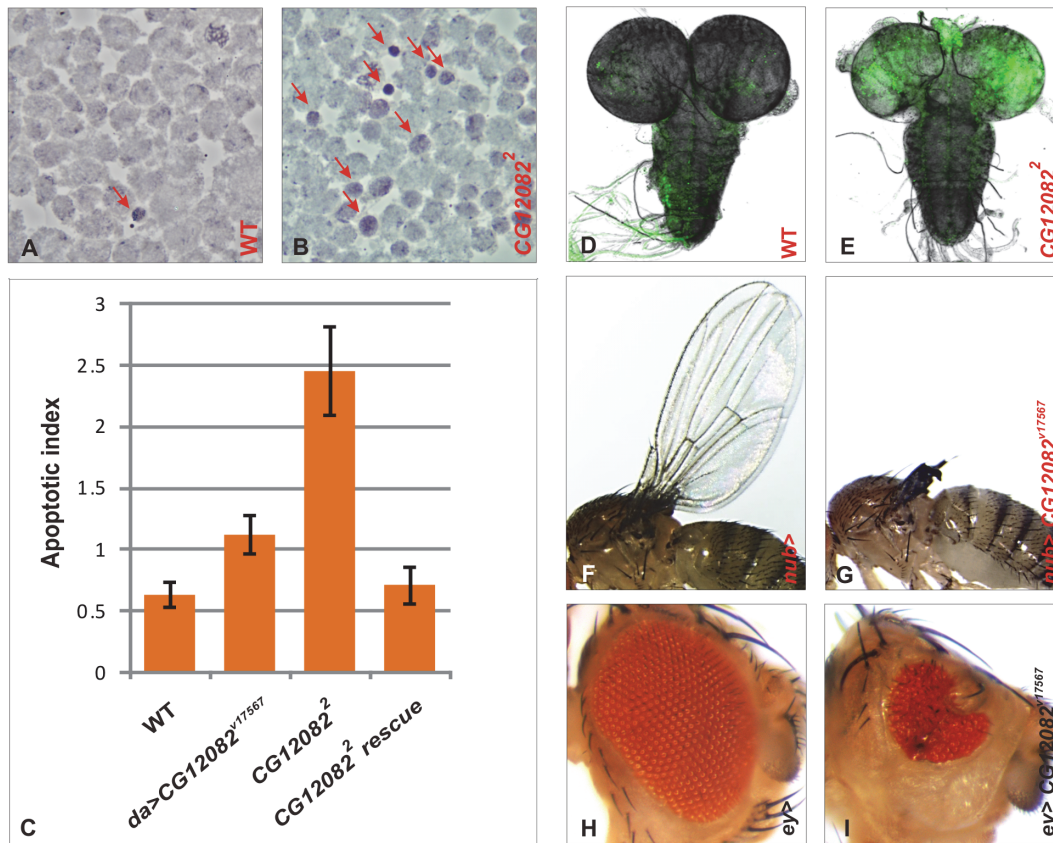
To elucidate the cause of the lethality observed, these mutants were examined for developmental and tissue defects. Orcein, acridine orange, and anti-activated caspase-3 immunostaining of larval brains and imaginal discs from strong hypomorph and null alleles revealed widespread apoptosis. Squash preparations of *CG12082* mutants (Fig. 2B) proved to contain many more small rounded and pyknotic cells as compared with the wild types (Fig. 2A). Similarly, the *CG12082* mutants exhibited a much higher level of apoptosis, as indicated by larger numbers of acridine orange- and activated caspase-3 positive cells (Fig. 2E and S2 Fig.) than in the wild type controls (Fig. 2D and S2 Fig.). All of the small pyknotic cells showed high expression of activated caspase-3 (S2 Fig. inset). Similarly to the lethal phenotype, the apoptotic phenotype could also be rescued by moderate expression of the wild type *CG12082* sequence (Fig. 2C).

Loss of *CG12082* function was further examined at a tissue-specific level in the developing eye and wing by using *ey-GAL4* and *nub-GAL4* drivers, respectively. The eye and wing-specific silencing of *CG12082* RNAi lines led to severely disrupted eyes and wings. The *ey-GAL4*-driven silencing resulted in rough and small (occasionally missing) eyes (Fig. 2I), while the *nub-GAL4*-specific silencing produced uninflated vestigial or missing wings (Fig. 2G). Since these phenotypes are very similar to those induced by apoptosis [25, 26, 27], we conclude that they are likely to result from cell death.

**Table 2. Transgenic rescue of *DmUsp5* mutants.**

Genotype	Lethal phase			
	L3 larva	Pupa	Pharate adult	Viable
Oregon-R			5%	95%
<i>DmUsp5<sup>1</sup></i>	93%			
<i>DmUsp5<sup>2</sup></i>	96%			
<i>da&gt;GFP-DmUsp5; DmUsp5<sup>1</sup></i>			24%	76%
<i>da&gt;FLAG-DmUsp5; DmUsp5<sup>2</sup></i>			14%	86%
<i>da&gt;UAS-DmUsp5; DmUsp5<sup>2</sup></i>		51%	49%	

doi:10.1371/journal.pone.0120875.t002

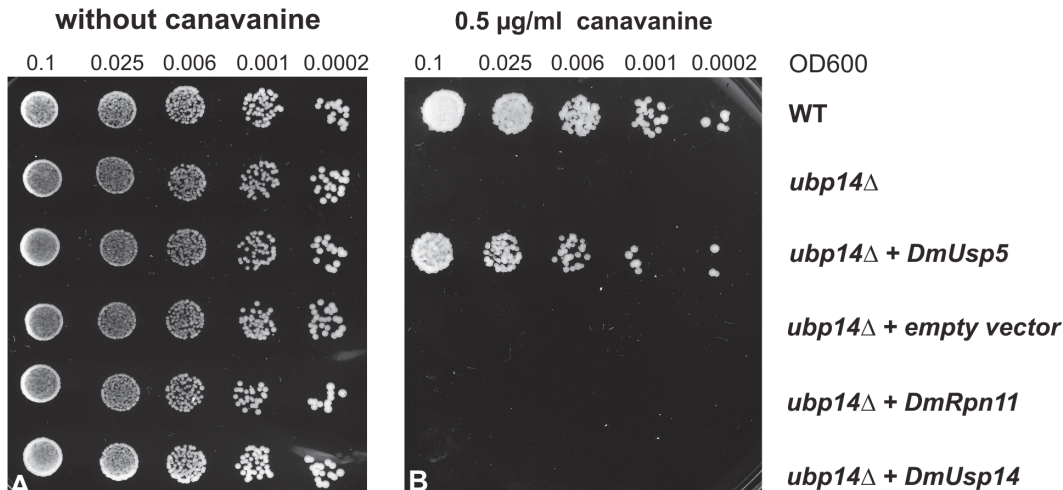


**Fig 2. Loss of *CG12082* function leads to elevated apoptosis in larval brain and imaginal discs.** Wild type (A) and *CG12082*<sup>2</sup> (B) larval brain squashes were stained with orcein and investigated under a phase contrast microscope. Red arrows indicate small, rounded and pyknotic cells. Apoptotic index (C) was defined as the mean number of these cells in an optical field. Apoptotic indexes of wild type (WT), *CG12082* knock down (*da>CG12082*<sup>v17567</sup>), *CG12082* null mutant (*CG12082*<sup>2</sup>) and *CG12082*<sup>2</sup> rescue (*da>FLAG-CG12082*, *CG12082*<sup>2</sup>) were defined. Each column represents the mean of 7–9 preparations. On average, 15–25 optical fields per preparations were scored. Acridine orange staining also marked dying cells in wild type (D) and *CG12082* null mutant (E) larval brains. Wing specific knock down of *CG12082* (G) resulted in reduced wings, while eye specific *CG12082* silencing (I) led to rough eye phenotype. Animals expressing the wing specific *nub-GAL4* (F) or *ey-GAL4* (H) driver alone, served as controls.

doi:10.1371/journal.pone.0120875.g002

### The *CG12082* gene codes for a functional ortholog of the deubiquitylating enzyme Ubp14/USP5 in *Drosophila*

On the use of FlyBase prediction data and BLAST analysis, the predicted protein encoded by the *CG12082* gene exhibited 43.8% and 65.1% overall similarity to yeast deubiquitylase Ubp14 and human deubiquitylase USP5, respectively. Further, the topology of its conserved domains, including UBP-type ZnF, USP, UBA1 and UBA2, corresponded closely to that found in the yeast Ubp14 and human USP5 proteins [24]. For experimental confirmation of their functional relatedness, heterologous complementation experiments were performed in which the protein encoded by *CG12082* could function as an Ubp14 substitute in budding yeast cells lacking their endogenous Ubp14 function. In these experiments, we introduced a *CG12082* expression construct (*pVT102U-DmUsp5*) under the control of a constitutively active alcohol dehydrogenase promoter into *ubp14Δ* cells and tested for complementation of their canavanine-sensitive proliferation defect [19]. As illustrated in Fig. 3A, *ubp14Δ* cells grow as well as wild type cells on normal medium, but are unable to do so on a medium supplemented with 0.5 μg/ml canavanine (Fig. 3B). The ability of *ubp14Δ* cells to grow in the presence of canavanine was induced by the expression of the *CG12082* gene product (Fig. 3B). In similar experiments, the



**Fig 3. Expression of CG12082 rescues the canavanine-sensitive phenotype of budding yeast *ubp14Δ* mutant cells.** Wild type, *ubp14Δ* mutant and transformed *ubp14Δ* mutant cells carrying the indicated constructs were plated and grown on SD-dropout plates (A) or on SD-dropout plates supplemented with 0.5 µg/ml canavanine (B). Cells were plated in linear dilution series, each drop containing a quarter of the number of cells relative to the previous one. The plates were incubated at 30°C for 5 days.

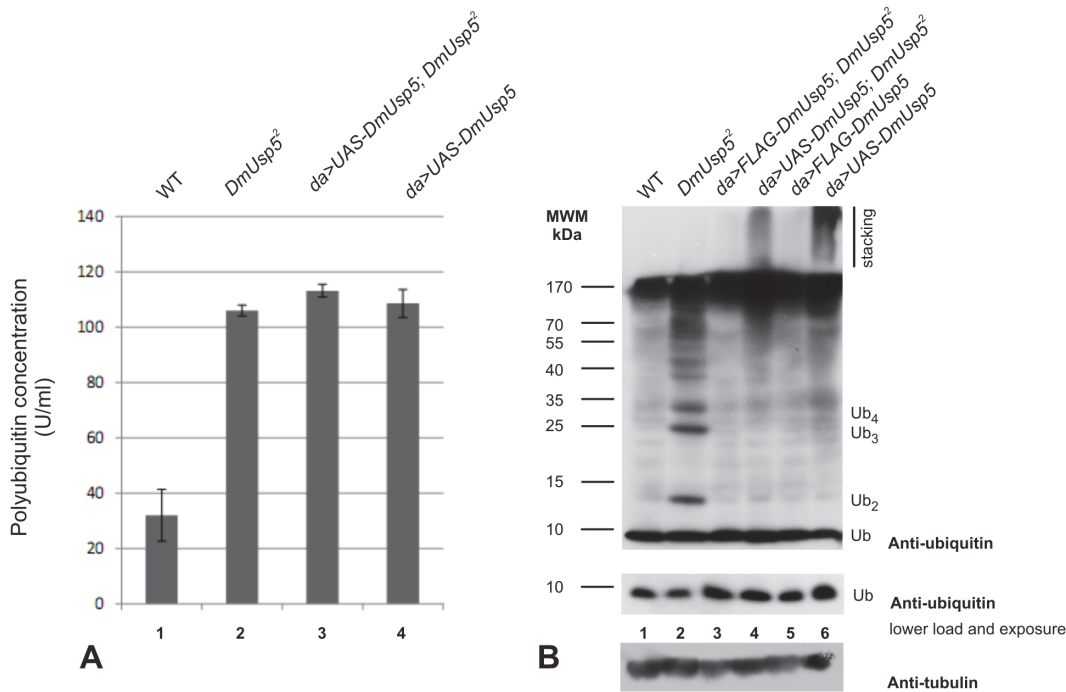
doi:10.1371/journal.pone.0120875.g003

canavanine sensitivity of *ubp14Δ* cells could not be suppressed by the introduction of either the empty vector (*pVT102U*) or other DUBs (*pVT102U-DmRpn11* and *pVT102U-DmUsp14*). Since the human USP5/isoT also functioned as a Ubp14 substitute in yeast cells [19], these results suggest that the gene product of *CG12082* is a functional ortholog of the deubiquitylating enzyme Ubp14/USP5/isoT in *Drosophila*; we therefore renamed it DmUsp5.

### Loss of *DmUsp5* leads to the accumulation of free and conjugated polyubiquitin chains and a reduced level of free monoubiquitins

Several *in vitro* studies have shown that the main substrate of human USP5 is free polyubiquitin chains liberated from proteasome-bound polyubiquitylated proteins by proteasome-associated DUB, Rpn11 [18, 28, 29]. In line with this, the loss of USP5 in yeast and in a human melanoma cell line led to the accumulation of free polyubiquitin chains [19, 21]. To investigate the molecular changes behind the observed phenotypes, a polyubiquitin-specific ELISA kit was used to determine possible changes in polyubiquitin level. Null alleles of *DmUsp5* caused an increase of ~ 6-fold in the concentration of polyubiquitins as compared with the wild type control (Fig. 4A). Further Western blot analysis revealed that the polyubiquitin level elevation was due mainly to the accumulation of low and high molecular weight ubiquitin derivatives (Fig. 4B). The first group appeared as a ladder of 4–5 bands with molecular weights corresponding to those of free ubiquitin di-, tri-, tetra-, penta- and hexamers. The second group formed a dense smear of high molecular weight bands, most probably reflecting polyubiquitylated proteins.

Normally only a small proportion of the intracellular ubiquitin is in monomeric form [30, 31], and this monoubiquitin pool therefore has to be refilled constantly by DUBs [32, 33]. As shown above, in the *DmUsp5* mutants a significant proportion of the ubiquitin is trapped in conjugated form in free polyubiquitins and polyubiquitylated proteins, and it was therefore conceivable that the monoubiquitin pool becomes depleted. Repetition of the Western blot analysis under nonsaturating conditions revealed a lower free monoubiquitin concentration in the *DmUsp5* mutants relative to the wild type control (Fig. 4B, lanes 1 and 2). The abnormal accumulation of free polyubiquitins and polyubiquitylated proteins and the drop in free



**Fig 4. Accumulation of polyubiquitin species and reduction of monoubiquitin level in *DmUsp5* mutant.** (A) Cyclex polyubiquitin-specific ELISA kit was used to measure the polyubiquitin concentration in third-stage larval protein extracts. Polyubiquitin levels were determined in wild type (column 1), *DmUsp5* null mutant (column 2) and animals strongly overexpressing *DmUsp5* either in mutant (column 3) or in wild type (column 4) background. (B) Third-instar larval protein extracts were separated on a 12% SDS-PAGE gel, blotted onto a PVDF membrane and immunostained with a polyclonal anti-ubiquitin primary antibody. Samples were prepared from wild type (lane 1), *DmUsp5* mutant (lane 2), animals moderately overexpressing *DmUsp5* either in mutant (lane 3) or in wild type (lane 5) background and animals strongly overexpressing *DmUsp5* either in mutant (lane 4) or in wild type (lane 6) background. Immunoblotting with anti-tubulin monoclonal antibody served as a loading control.

doi:10.1371/journal.pone.0120875.g004

monoubiquitins were not seen when the wild type *DmUsp5* sequence was moderately expressed in the same mutant background (Fig 4B, lane 3). These results demonstrate that, similarly as for yeast and human cell lines, DmUsp5 is required for the disassembly of free polyubiquitins and for the uninterrupted degradation of polyubiquitylated proteins in *Drosophila*. Moreover, the ubiquitin-recycling activity of DmUsp5 must reflect a major monoubiquitin supply route.

Interestingly, the UAS/GAL4-driven strong overexpression of the wild type DmUsp5 appeared to be detrimental to the animals and caused temperature-sensitive lethality in late development (Table 3). A polyubiquitin-specific ELISA experiment (Fig 4A) and Western blot analysis of protein extracts revealed a significant accumulation of polyubiquitylated proteins in the cells of DmUsp5-overexpressing flies (Fig 4B). Even more unusually, a well-detectable

**Table 3. Temperature-dependent lethality of DmUsp5 overexpression.**

Genotype	Lethal phase			
	L3 larva	Pupa	Pharate adult	Viable
Oregon-R at 25°C			5%	95%
<i>da&gt;UAS-DmUsp5</i> at 18°C		34%	62%	4%
<i>da&gt;UAS-DmUsp5</i> at 25°C		89%	11%	
<i>da&gt;UAS-DmUsp5</i> at 29°C	10%	90%		

doi:10.1371/journal.pone.0120875.t003

fraction of this ubiquitylated species could not enter the separating gel, but remained trapped and displayed smeary staining in the stacking gel (Fig. 4B). This species behaves similarly to protein aggregates with low solubility [34]. These observations indicate that the overexpression of DmUsp5 also interferes with proteasomal degradation. The possible mechanism will be discussed below.

### Loss of *DmUsp5* leads to the induction of the proteasome-associated DUB DmUsp14 and the upregulation of proteasome subunits

Physiological consequences of a low ubiquitin level have been studied only in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. A decline in free monoubiquitin levels was demonstrated to lead to induction of the ubiquitin stress response [35, 36]. A hallmark of this ubiquitin stress is the induction of the proteasome-associated DUB Ubp6 [36]. It is thought that Ubp6 associates with the proteasome, inhibits its proteolytic activity and catalyzes the gradual removal of monoubiquitins from the distal end of protein-conjugated polyubiquitin chains [35, 37], thereby contributing to replenishment of the free monoubiquitin pool. Since the loss of the DmUsp5 function generates a low ubiquitin state, it provides an opportunity to demonstrate the existence of a similar phenomenon in *Drosophila*. We therefore looked at the expression level of the *Drosophila* ortholog of *Ubp6* in our mutants.

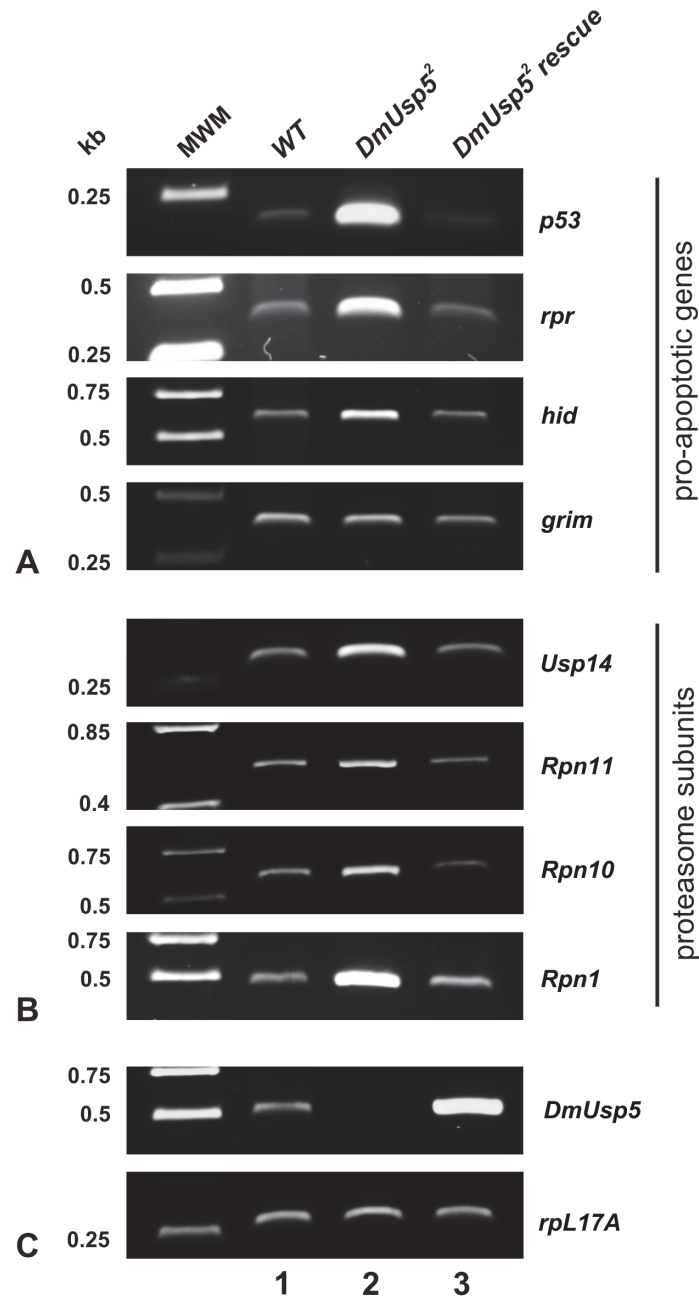
In FlyBase, the *CG5384* gene codes for a putative DUB. Comparison of its amino acid sequence with those of known yeast and human DUBs revealed a high sequence similarity and an identical domain topology to those of yeast UBP6 and the human USP14 proteins (S3 Fig). The protein coded by the *CG5384* gene is therefore regarded as the *Drosophila* ortholog of these proteins and we renamed it DmUsp14. Silencing the *DmUsp14* gene by RNA interference did not produce any visible phenotype, but a PBac insertion allele showed male sterility (Table 1).

Semiquantitative RT-PCR was used to determine the *DmUsp14* expression levels in loss of function *DmUsp5* mutants and in wild type flies. As the expression of *DmUsp14* was upregulated in the absence of DmUsp5 (Fig. 5B), we propose that the accumulation of free polyubiquitin chains eventually leads to a free monoubiquitin deficiency and to the induction of ubiquitin stress in *Drosophila*.

The accumulation of polyubiquitylated proteins in *DmUsp5* mutants is reminiscent of the phenotype of essential proteasome subunit mutants. It was earlier reported that deletion of the essential Rpn10 proteasomal subunit resulted in a substantial accumulation of all the proteasomal subunits [38, 39], a phenomenon similar to that described in yeast as a proteasome stress response [36]. To detect the expression of proteasome subunits, total RNA was isolated from *DmUsp5* mutant and wild type animals and the expressions of *Rpn1-*, *Rpn10-* and *Rpn11-* specific transcripts were monitored by semiquantitative RT-PCR. Each of these genes revealed an elevated expression in the null mutant as compared with the wild type (Fig. 5B). The detected overexpression of these genes was cured by moderate expression of the wild type *DmUsp5* sequence in the mutant background. These results demonstrate a coordinated upregulation of proteasome subunits in the absence of DmUsp5, and hence the induction of proteasome stress.

### *DmUsp5* mutants show cycloheximide sensitivity

Ubiquitin depletion in yeast sensitizes cells to different chemicals, including translational inhibitors such as cycloheximide [40, 41], and is regarded as a distinctive feature of ubiquitin stress. To support our assumption that loss of the Usp5 function gives rise to ubiquitin stress, the sensitivity of *DmUsp5* mutants to cycloheximide was analyzed. Since the loss of *DmUsp5* leads to lethality, we used *DmUsp5*<sup>2/+</sup> heterozygotes for this test. The data presented in Fig. 6



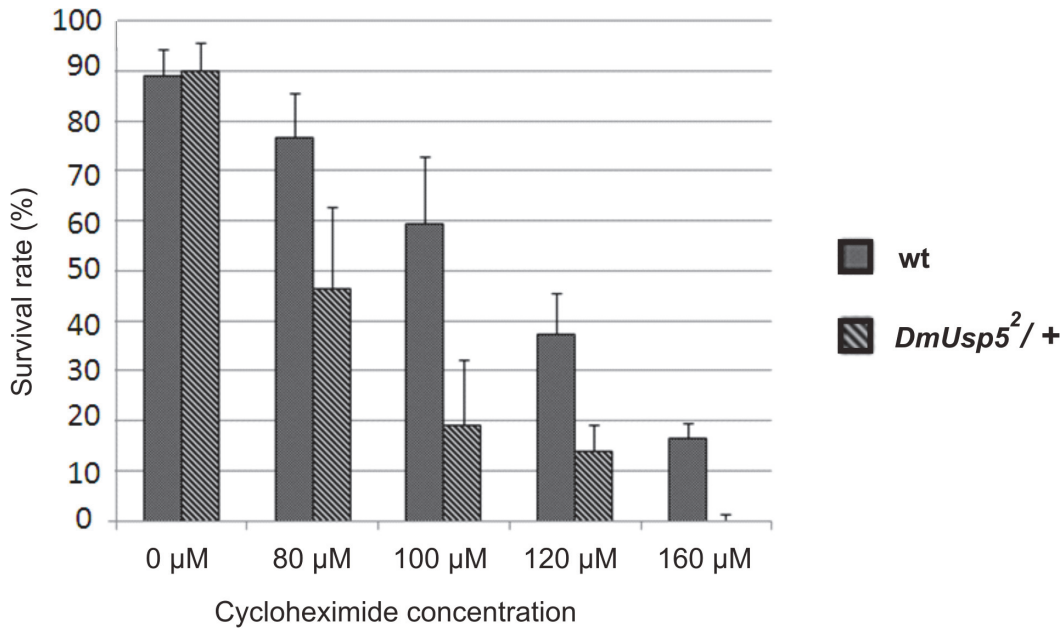
**Fig 5. Overexpression of pro-apoptotic genes and proteasome subunits in the *DmUsp5* mutant.** Total cDNA samples were prepared from wild type (lane 1), *DmUsp5* null mutant (lane 2) and *DmUsp5*<sup>2</sup> rescue (lane 3) third-stage larvae. Semiquantitative PCRs were performed using primers specific to mRNAs of pro-apoptotic (panel A) and proteasome subunit (panel B) genes. *DmUsp5* transcript specific primers were used to determine *DmUsp5* expression, while *rpL17* served as a loading control (panel C).

doi:10.1371/journal.pone.0120875.g005

demonstrate that even the partial reduction of *DmUsp5* in the heterozygotes creates a marked dose-dependent sensitivity to cycloheximide relative to the wild type (Fig. 6).

This is therefore a dominant phenotype, which further underlines the ubiquitin deficiency and the ubiquitin stress in the cells of *DmUsp5* mutants.





**Fig 6. *DmUsp5* mutant heterozygotes are sensitive to cycloheximide.** Synchronized first-instar larvae were collected from wild type (wt) and *DmUsp5* mutant heterozygotes (*DmUsp5*<sup>2/+</sup>). Larvae were treated with the indicated concentrations of cycloheximide solution. The number of survival adults were counted. Each column represents the mean of four independent treatments.

doi:10.1371/journal.pone.0120875.g006

### Pro-apoptotic genes are activated in *DmUsp5* mutants

The core of the apoptotic machinery in *Drosophila* contains initiator and effector caspases, inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) and pro-apoptotic proteins such as p53, Reaper, Hid and Grim (the last three frequently mentioned as the RHG proteins) [42]. Following a cytotoxic stimulus, apoptosis is induced by the transcriptional activation of P53 and the RHG coding genes. The RHG proteins competitively bind to *Drosophila* IAP1 (DIAP1) and, by antagonizing its caspase inhibitory function, promote caspase-dependent cell killing [10]. To determine whether *DmUsp5* loss leads to apoptosis through this pathway, we followed the expression of the RHG genes by semiquantitative RT-PCR and quantitative real time PCR. Fig. 5A demonstrates that the expression of p53, Reaper and Hid is elevated in the *DmUsp5* mutant as compared with the wild type control. The highest induction in expression level was observed with p53 and Reaper. This higher expression returned close to the wild type level when *DmUsp5* was moderately expressed in the mutant background. We did not detect a significant change in the expression of Grim (Fig. 5A). The expression profiles of these genes were confirmed by quantitative real time PCR measurements (S4 Fig.). These results suggest that the loss of *DmUsp5* activates at least three members of the pro-apoptotic machinery and it must therefore act upstream of them.

### Overexpression of DIAP1 partially rescues both the lethal and the apoptotic phenotypes of *DmUsp5* mutants

Besides liberating caspases, Reaper can further augment apoptosis by downregulating DIAP1 through promoting its auto-ubiquitylation and through a general inhibitory effect on translation [43, 44]. We did not follow DIAP1 levels directly, but instead, overexpressed DIAP1 in the *DmUsp5*<sup>2</sup> null mutant and monitored its phenotypic effects. DIAP1 overexpression exhibited significant effects on both the lethal and the apoptotic phenotypes. DIAP1 overexpression

**Table 4. Effects of DIAP1 overexpression on *DmUsp5*<sup>2</sup> lethal phase.**

Genotype	Lethal Phase			
	L3 larva	Pupa	Pharate adult	Viable
Oregon-R			5%	95%
<i>da&gt;UAS-DIAP1</i> <sup>V85M</sup>			6%	94%
<i>DmUsp5</i> <sup>2</sup>	96%			
<i>da&gt;UAS-DIAP1</i> <sup>V85M</sup> ; <i>DmUsp5</i> <sup>2</sup>	22%	78%		

doi:10.1371/journal.pone.0120875.t004

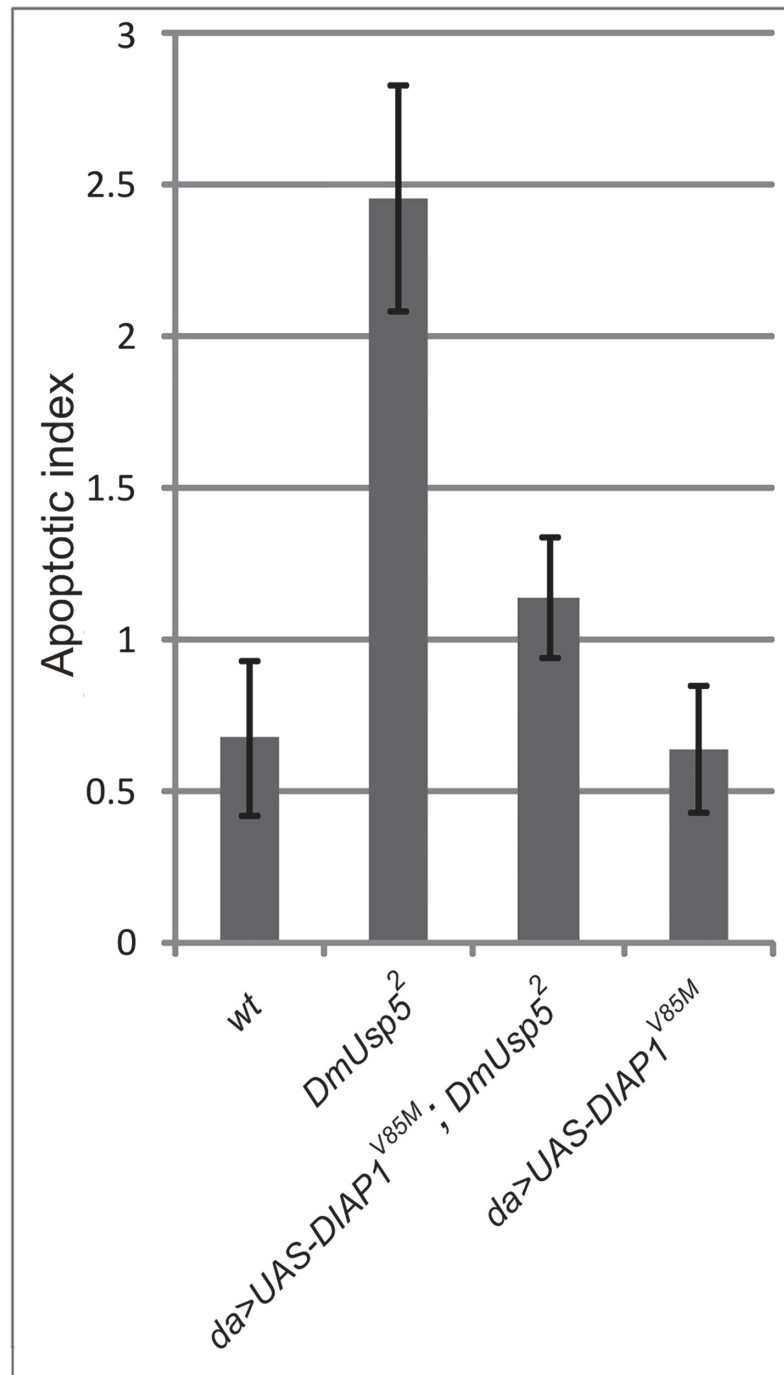
shifted the late larval (L3) lethality of the *DmUsp5*<sup>2</sup> mutant to the pupal stage, while the overexpression itself had no effect on the survival and fertility of the control flies (Table 4). This experiment was followed up by determining the frequency of apoptotic cells on orcein-stained larval brain and imaginal disk preparations. DIAP1 overexpression proved to reduce the apoptotic index of *DmUsp5*<sup>2</sup> by about 50% (Fig. 7). These findings are consistent with the notion that DIAP1 is downregulated in *DmUsp5* mutants.

## Discussion

It has become firmly established that a large variety of essential intracellular processes are regulated by ubiquitylation. Ubiquitin is a rather abundant polypeptide that exists in eukaryotic cells as free monomer, free polymer and protein-conjugated mono- or polyubiquitin. For the normal cell physiology, these forms are maintained in dynamic equilibrium, in which ubiquitin cycles between the free and conjugated states [45, 46], mediated by the opposing processes of ubiquitylation and deubiquitylation. It has been demonstrated that, at any given time, in most tissues only a small proportion of the total cellular ubiquitin content is available as free monomer, while the majority is anchored to proteins [30, 31, 45]. Because of the high demand for a limited pool of free ubiquitins, normal cell functioning requires a continuous production of an adequate amount of free monoubiquitins. Active free monoubiquitins are generated by the deubiquitylating enzymes from inactive precursor fusion products and by the recycling of previously used ubiquitins [32, 33].

In this study, we have demonstrated in a heterologous complementation experiment that the *Drosophila CG12082* gene encodes the functional ortholog of the yeast Ubp14 and the human USP5/isopeptidase T deubiquitylases. Moreover, *in vivo* experimental data are presented that reveal an important role of this DUB in the regulation of intracellular ubiquitin levels in *Drosophila melanogaster*. Loss of function *DmUsp5* mutants display huge increases in the unconjugated and conjugated polyubiquitin levels and, simultaneously, a significant reduction in the free monoubiquitin concentration. The accumulation of free polyubiquitins in the mutant is consistent with *in vitro* and *in vivo* data pointing to the main function of this enzyme as being the disassembly of free polyubiquitin chains [5, 19, 20, 21]. The accumulation of polyubiquitylated proteins can be explained by the fact that free polyubiquitins bind to proteasome-associated polyubiquitin receptors with high affinity [47, 48]. In excess, they competitively inhibit the targeting of polyubiquitylated substrates to the proteasome, resulting in the observed accumulation of polyubiquitylated proteins. The coordinated upregulation of proteasome subunits in *DmUsp5* mutants, the hallmark of the proteasome stress response [36], supports the inhibition of proteasome activity.

Although we detected a reduction of the level of free monoubiquitin in *DmUsp5* mutants, the question arises as to whether this drop is significant enough to be below the critical physiological threshold. The induction of the ubiquitin stress response in *DmUsp5* mutants is a direct indication that even this moderate drop in monoubiquitin concentration has serious



**Fig 7. DIAP1 overexpression rescues the apoptotic phenotype of the *DmUsp5* mutant.** Apoptotic indexes of wild type (wt), *DmUsp5* mutant (*DmUsp5*<sup>2</sup>) and DIAP1 overexpressing animals either in mutant (*da>UAS-DIAP1*<sup>V85M</sup>; *DmUsp5*<sup>2</sup>) or in wild type (*da>UAS-DIAP1*<sup>V85M</sup>) background were determined as described in Fig. 2C. Each column represents the mean of 7–8 preparations.

doi:10.1371/journal.pone.0120875.g007

physiological consequences. All the critical features of ubiquitin stress described in the yeast are characteristic properties of the *DmUsp5* mutants: loss of the DmUsp5 function leads to a dominant cycloheximide sensitivity in *Drosophila* (Fig. 6), with a marked increase in the

expression levels of both the *DmUsp14* gene and the genes of several proteasomal subunits (Fig. 5B). Taken together, these observations suggest that DmUsp5 has a major role in maintaining the free monoubiquitin pool in *Drosophila*. When its function is impaired, the free monoubiquitin shortage may compromise ubiquitin homeostasis.

Another characteristic feature of *DmUsp5* mutants is the abnormally high incidence of apoptosis in the imaginal tissues which is the most probable cause of the late larval lethality and could be directly linked to a free monoubiquitin shortage. Apoptosis is one of the ubiquitin-mediated pathways and is negatively regulated in a dynamic process by DIAP1 and protein degradation in *Drosophila*. DIAP1 ensures cell survival by regulating the abundance and stability of caspases and IAP antagonists through its E3 ubiquitin ligase activity. Ubiquitylation is therefore intrinsic to the anti-apoptotic activity of DIAP1 and it is quite conceivable that an ubiquitin shortage alone or together with an abnormally high level of polyubiquitins (free and conjugated) and crippled protein degradation may generate a death signal that activates the pro-apoptotic machinery, resulting in the abnormally high level of apoptosis observed in *DmUsp5* mutants. The elevated expression of the pro-apoptotic *p53* and some of the RHG genes in the absence of the DmUsp5 function support this idea. Although the molecular mechanism of apoptotic activation is not known, in the *DmUsp5* mutants it must take place upstream of the transcriptional activation of the RHG genes. Proteasome inhibition, which also leads to a free monoubiquitin shortage and eventually to apoptosis, was previously reported, to induce a shift in the distribution of conjugated ubiquitin from mainly nuclear to mainly cytoplasmic locations, and this coincided with a significant depletion of ubiquitylated histone H2A in the chromatin, together with chromatin remodeling [45]. It was also shown that this ubiquitin relocation was a direct effect of a competition for the limited pool of free monoubiquitins. Since changes in histone ubiquitylation are known to lead to major changes in gene expression [49], and histone H2A ubiquitylation is required for gene silencing [50], it is reasonable to conceive that a prolonged ubiquitin shortage could trigger expression of the RHG genes and thereby induce apoptosis during proteasome inhibition and in loss of function *DmUsp5* mutants too. This limited pool of free monoubiquitins links protein degradation to apoptosis and to development by making these ubiquitin-dependent processes mutually interdependent. The different pleiotropic effects indicate that DmUsp5 has a pivotal role in maintaining the free monoubiquitin pool.

During the course of the present manuscript preparation, an *in press* study appeared exploring the role of DmUsp5 in *Drosophila* development [51]. This reveals that DmUsp5 is essential for viability, and demonstrates that free and conjugated polyubiquitin chains accumulate in *DmUsp5* mutants, and that the levels of proteasome subunits are also elevated, findings with which our study fully agrees. It suggests an abnormal ubiquitin homeostasis behind these aberrations, though the ubiquitin stress and the apoptotic phenotype of the mutants were not analyzed or interpreted.

The fact that strong ectopic overexpression of the wild type DmUsp5 interfered with proteasomal degradation and development was somewhat surprising. The degree of overexpression was driver-, genomic location- and temperature-dependent (Fig. 4B, lanes 4–6). When the expression was driven by the da-GAL4 driver at different temperatures, the staining intensity of the high molecular weight smear of the ubiquitin species in both the stacking and separating gels was stronger at higher temperatures (S5 Fig.) and was directly proportional to the shift in the lethal phase of the animals: higher expression was associated with earlier lethality (Table 3). The electrophoretic behavior of the high molecular weight ubiquitin species was reminiscent of that of protein aggregates with low solubility [34]. A plausible explanation of this phenomenon could be that the huge amount of ectopically expressed DmUsp5 proteins overwhelms the protein-folding machinery of the cells, with the result that misfolded proteins appear which are

prone to form different associations and aggregates [52]. Misfolded proteins become polyubiquitinated for proteasomal degradation, but it has emerged that aggregate-prone proteins are dangerous proteasome substrates. It has been demonstrated that protein aggregates inhibit the activity of proteasomes [53, 54]. The precise mechanism of the inhibition is not known, but it has been suggested that proteasomes could capture tangled proteins, but are then unable either to degrade or to release them, so that they become stalled [53]. Be that as it may, proteasome inhibition spells an abnormal ubiquitin cycle and a shortage in free ubiquitins, which explains the lethal effect of DmUsp5 overexpression.

## Materials and Methods

### Drosophila stocks and techniques

Fly stocks were raised on standard yeast/cornmeal/dextrose medium at 25°C. P element insertion and transgenic RNA interference lines were obtained from the Bloomington Drosophila Stock Center, the Vienna Drosophila Resource Center and NIG-Fly. All genetic markers used are described in FlyBase at <http://flybase.org>.

In order to determine the lethal phase, 200–400 first-instar homozygous and heterozygous larvae were collected and counted. Metamorphosis was staged according to Bainbridge and Bownes [55].

### P element remobilization

*DmUsp5* deletion alleles were generated by the P element remobilization technique [56]. Imprecise excision of *P{EPgy2}EY20760* generated the *usp5<sup>1</sup>* allele carrying a 275 bp deletion which eliminates the catalytic histidine box and UBA2 domain coding sequence. Imprecise excision of *P{EPgy2}EY23569* resulted in the *usp5<sup>2</sup>* null allele bearing a 2175 bp deletion eliminating the gene. Since both mutants exhibited the same lethal and apoptotic phenotype, we used the *usp5<sup>2</sup>* null allele for further biochemical characterization.

### Semiquantitative RT-PCR

Total RNA was isolated from 10 wandering third-instar larvae through use of a Tri Reagent extraction kit (Sigma-Aldrich, USA). RNA samples were treated with RQ1 RNase-Free DNase (Promega Corporation, USA). Reverse transcription was carried out with a Fermentas cDNA synthesis kit. Samples of cDNA were normalized to the *rpL17A* level, and the pro-apoptotic and proteasome subunit gene expressions were then determined by 20–25-cycle PCRs with the use of exon specific primers.

### Quantitative real time PCR

For quantitative real time PCR, 1 microgram of total RNA was reverse transcribed using RevertAid First Strand cDNA synthesis kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's protocol. Real time PCR was performed using an ABI 7500 real time PCR system (Applied Biosystems) with SYBR Green chemistry, under the following conditions: 1 cycle of 95°C for 10 minutes, 40 cycles of 95°C for 15 second and 60°C for 1 minute. Primers were designed by the Clone Manager software. The  $C_t$  value for each mRNA was normalised to the *rpL17A* ribosomal RNA and *Actin 42A* RNA internal controls. The changes in expression levels of the examined genes were calculated by the  $\Delta\Delta C_t$  method. Primers for quantitative real time PCR:

*Actin42A* forward: GCGTCGGTCAATTCAATCTT

*Actin42A* reverse: AAGCTGCAACCTCTTCGTC

*RpL17A* forward: GAGCCAAGAACCTGTACG

*RpL17A* reverse: CAGGCATGACCTTCTTCC  
*p53* forward: CATCGAGGGCATGATTAAGG  
*p53* reverse: CGTAGGCACGTTTCTTAAGG  
*rpr* forward: AGGAGCAGCAGATCCTTC  
*rpr* reverse: TCTTCCGGTCTTCGGATG  
*hid* forward: ACCGACCAAGTGCTATACG  
*hid* reverse: GCGGATACTGGAAGATTTGC  
*grim* forward: GCGGTCAGAACAACGATG  
*grim* reverse: GATTGAGCCTGCCTTTCC

## Cytological analysis

Brains from third-instar larvae were dissected for both orcein and acridine orange staining. Details of these staining protocols can be found in [57]. Preparations were analyzed under an Olympus BX51 upright microscope, or with an Olympus FV 1000 confocal microscope.

For immunohistochemistry, imaginal discs from late third instar larvae were dissected in PBS and fixed in 4% formaldehyde. Samples were washed in PBSTx and blocked in 1% BSA. Rabbit polyclonal Cleaved Caspase-3 Antibody (Cell Signaling Technology) was used in 1:200 dilution. The primary antibody was detected by Alexa Fluor 647 Goat Anti-Rabbit (Life Technologies) secondary antibody in 1:400 dilution. Pictures were taken by an Olympus FV10i confocal microscope.

## *DmUsp5* tagging and overexpression

The coding sequence of *DmUsp5* was cloned into the pUAST Drosophila expression vector between the XhoI/XbaI sites. The resulting *pUAST-DmUsp5* plasmid was verified by sequencing and injected into isogenized *w<sup>1118</sup>* embryos. Transformants were selected for the presence of the *w<sup>+mC</sup>* marker. Transgene localization was mapped to chromosomes by using a balancer line marked on the second and third chromosomes. Transgene expression was induced by the ubiquitous *da-Gal4* driver.

In order to generate tagged *DmUsp5*-expressing lines, the *DmUsp5* coding sequence was cloned into pENTR1A and recombined into pTFWattB (for N terminal FLAG tagging) or pTGWattB (for N terminal GFP tagging) expression vectors. The phiC31 integrase-mediated site-specific transformation resulted in transgene insertion into the *su(Hw)attP1* landing site on the third chromosome. The expression of the transgene was induced by the *da-Gal4* driver. The presence of *FLAG-DmUsp5* was verified by Western blotting, while the production and localization of *GFP-DmUsp5* were examined by confocal microscopy.

## Yeast heterologous complementation test

The yeast strains and vectors used in this work were kindly provided by Mark Hochstrasser. Standard rich and minimal yeast media and yeast techniques were used.

The *DmUsp5* encoding RE70722 and *DmUsp14* encoding LP08774 cDNA clones were ordered from DGRC. These coding sequences were cloned into the pVT102U yeast expression vector. The *pVT102U-DmUsp5*, *pVT102U-DmUbp6*, *pVT102U-DmRpn11* and the empty vector were transformed into the *UBP14*-deficient MHY840 (*MAT $\alpha$  his $\Delta$ 200 leu2-3, 112 ura3-52 lys2-801 trp1-1 ubp14 $\Delta$ 1::HIS3*) strain. Single Ura<sup>+</sup> colonies were selected and then inoculated into 3 ml of rich YPAD media and incubated overnight at 30°C. The wild type MHY501 (*MAT $\alpha$  his $\Delta$ 200 leu2-3, 112 ura3-52 lys2-801 trp1-1*) strain served as control. Overnight cultures were diluted to OD<sub>600</sub> = 0.1 and then four-fold serially diluted four times. 5  $\mu$ l of each

dilution was spotted onto nitrogen-rich, Arg-free SC media containing 0.5 µg/ml canavanine sulfate. Plates were incubated at 30°C for 5 days, after which photos were taken.

## SDS-PAGE and Western blots

Protein samples were prepared from third-instar larvae or pupae. Proteins were separated in a 12% resolving gel by SDS-PAGE. The protein load was optimized by Coomassie Brilliant Blue staining. Samples were blotted onto a PVDF membrane and immunostained with 1:5000 Polyclonal Rabbit Anti-Ubiquitin primary antibody (DAKO, Denmark) and 1:33000 anti-rabbit IgG-HRP secondary antibody (DAKO, Denmark). Samples were optimized using a mouse anti-beta-tubulin monoclonal antibody (clone ID: E7, DSHB, USA) in 1:1000 dilution. It was detected with goat anti-Mouse IgG-HRP secondary antibody (DAKO, Denmark) in 1:33000 dilution.

## Cycloheximide treatment

Cycloheximide powder (Sigma-Aldrich, USA) was dissolved in 34% EtOH to obtain a 17.6 mM stock solution. First-instar larvae were collected in vials containing 3.5 ml of standard *Drosophila* medium and fed with 60 µl of cycloheximide solution appropriately diluted in 34% EtOH. The feeding concentration was calculated to a final volume of 3.5 ml. Emerging adults were counted and statistically analyzed with the use of Microsoft Office Excel.

## Supporting Information

**S1 Fig. Expression of *CG12082* in transgenic RNA interference, P element insertion and deletion mutant alleles.** Expression levels were determined by semiquantitative RT-PCR followed by agarose gel electrophoresis. Samples were normalized to *RpL17A* expression. (TIF)

**S2 Fig. *CG12082* mutant imaginal discs show strong cleaved caspase-3 specific immunostaining.** Leg discs of late L3 instar larvae from wild type (upper row) and *CG12082*<sup>2</sup> (lower row) were stained with DAPI (blue) and anti-cleaved caspase-3 antibody (red). Insets show individual cells at higher magnification. (TIF)

**S3 Fig. DmUsp14 shares high sequence similarity and an identical domain topology with yeast Ubp6 and human USP14.** Amino acid sequences were aligned using Align X tool of Vector NTI 10 software. Conserved and similar amino acids are highlighted by red and yellow backgrounds, respectively. Black underline indicates the ubiquitin-like (UBL) domain. Catalytic cysteine and histidine residues are marked by black arrows. (PDF)

**S4 Fig. Pro-apoptotic genes are overexpressed in *DmUsp5* mutant.** Total RNA was extracted from wild type and *DmUsp5*<sup>2</sup> larvae and reverse transcribed into cDNA. Quantitative real time PCR was performed on each pro-apoptotic gene normalized to *Actin42A* and *rpL17A* house-keeping genes. Columns represent the fold changes of gene expressions in *DmUsp5*<sup>2</sup> compared to wild type levels. Data represent mean and standard deviation of two independent experiments. (TIF)

**S5 Fig. Overexpression of DmUsp5 leads to temperature-sensitive accumulation of high molecular weight ubiquitin species.** Protein extracts were prepared from third-instar larvae overexpressing DmUsp5 at the indicated temperatures. Samples were separated in an 8%

SDS-PAGE gel, blotted onto a PVDF membrane and immunostained with a polyclonal anti-ubiquitin primary antibody. The Western blot reveals a fraction of high molecular weight ubiquitin species trapped in the stacking gel.

(TIF)

## Acknowledgments

We thank Mark Hochstrasser for the pVT102-U plasmid and MHY840 yeast mutant strain, and Imre Boros for the p53 RT-PCR primers.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PD LK AU OP. Performed the experiments: LK ON MP. Analyzed the data: LK PD AU MP. Contributed reagents/materials/analysis tools: PD OP AU. Wrote the paper: PD LK AU.

## References

1. Kerscher O, Felberbaum R, Hochstrasser M. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006; 22: 159–180. PMID: [16753028](#)
2. Bader M, Steller H. Regulation of cell death by the ubiquitin-proteasome system. *Curr Opin Cell Biol.* 2009; 21: 878–884. doi: [10.1016/j.ceb.2009.09.005](#) PMID: [19850458](#)
3. Mocchiari A, Rape M. Emerging regulatory mechanisms in ubiquitin-dependent cell cycle control. *J Cell Sci.* 2012; 125: 255–263. doi: [10.1242/jcs.091199](#) PMID: [22357967](#)
4. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 1998; 67: 425–479. PMID: [9759494](#)
5. Wilkinson KD, Tashayev VL, O'Connor LB, Larsen CN, Kasperek E, et al. Metabolism of the polyubiquitin degradation signal: structure, mechanism, and role of isopeptidase T. *Biochemistry.* 1995; 34: 14535–14546. PMID: [7578059](#)
6. Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem.* 2001; 70: 503–533. PMID: [11395416](#)
7. Kaiser P, Flick K, Wittenberg C, Reed SI. Regulation of transcription by ubiquitination without proteolysis: Cdc34/SCF(Met30)-mediated inactivation of the transcription factor Met4. *Cell.* 2000; 102: 303–314. PMID: [10975521](#)
8. Jentsch S, Rumpf S. Cdc48 (p97): a “molecular gearbox” in the ubiquitin pathway? *Trends Biochem Sci.* 2007; 32: 6–11. PMID: [17142044](#)
9. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science.* 1995; 267: 1445–1449. PMID: [7878463](#)
10. Broemer M, Meier P. Ubiquitin-mediated regulation of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 2009; 19: 130–140. doi: [10.1016/j.tcb.2009.01.004](#) PMID: [19217783](#)
11. Ditzel M, Broemer M, Tenev T, Bolduc C, Lee TV, Rigbolt KT, et al. Inactivation of effector caspases through nondegradative polyubiquitylation. 2008; *Mol Cell* 32:540–553. doi: [10.1016/j.molcel.2008.09.025](#) PMID: [19026784](#)
12. Zaman MM, Nomura T, Takagi T, Okamura T, Jin W, Shinagawa T, et al. Ubiquitination-deubiquitination by the TRIM27-USP7 complex regulates tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. 2013; *Mol Cell Biol* 33:4971–4984. doi: [10.1128/MCB.00465-13](#) PMID: [24144979](#)
13. Yang CS, Sinenko SA, Thomenius MJ, Robeson AC, Freel CD, Horn SR, et al. The deubiquitinating enzyme DUBAI stabilizes DIAP1 to suppress Drosophila apoptosis. *Cell Death Differ.* 2014; 21: 604–11. doi: [10.1038/cdd.2013.184](#) PMID: [24362437](#)
14. Song L, Rape M. Reverse the curse—the role of deubiquitination in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol.* 2008; 20: 156–163. doi: [10.1016/j.ceb.2008.01.012](#) PMID: [18346885](#)
15. Amerik AY, Hochstrasser M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1695: 189–207. PMID: [15571815](#)
16. Chen X, Fischer JA. *In vivo* Structure/Function analysis of the Drosophila fat facets deubiquitinating enzyme gene. 2000; *Genetics* 156: 1829–1836. PMID: [11102377](#)



17. Doelling JH, Yan N, Kurepa J, Walker J, Vierstra RD. The ubiquitin-specific protease UBP14 is essential for early embryo development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 2001; 27: 393–405. PMID: [11576424](#)
18. Hadari T, Warms JV, Rose IA, Hershko A. A ubiquitin C-terminal isopeptidase that acts on polyubiquitin chains. Role in protein degradation. *Biol Chem*. 1992; 267: 719–727. PMID: [1309773](#)
19. Amerik AY, Swaminathan S, Krantz BA, Wilkinson KD, Hochstrasser M. *In vivo* disassembly of free polyubiquitin chains by yeast Ubp14 modulates rates of protein degradation by the proteasome. *EMBO J*. 1997; 16: 4826–4838. PMID: [9305625](#)
20. Falquet L, Paquet N, Frutiger S, Hughes GJ, Hoang-Van K, et al. A human de-ubiquitinating enzyme with both isopeptidase and peptidase activities *in vitro*. *FEBS Lett*. 1995; 359: 73–77. PMID: [7851534](#)
21. Dayal S, Sparks A, Jacob J, Allende-Vega N, Lane DP, et al. Suppression of the deubiquitinating enzyme USP5 causes the accumulation of unanchored polyubiquitin and the activation of p53. *J Biol Chem*. 2009; 284: 5030–5041. doi: [10.1074/jbc.M805871200](#) PMID: [19098288](#)
22. Nakajima S, Lan L, Wei L, Hsieh CL, Rapić-Otrin V, Yasui A, et al. Ubiquitin-specific protease 5 is required for the efficient repair of DNA double-strand breaks. *PLoS One*. 2014; 9:1 Available: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0084899>.
23. Tsou WL, Sheedlo MJ, Morrow ME, Blount JR, McGregor KM, Das C, et al. Systematic analysis of the physiological importance of deubiquitinating enzymes. *PLoS One*. 2012; 7:8 Available: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0043112>.
24. Fan X, Huang Q, Ye X, Lin Y, Chen Y, Lin X, et al. *Drosophila* USP5 controls the activation of apoptosis and the Jun N-terminal kinase pathway during eye development. *PLoS One*. 2014; 9:3 Available: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0092250>.
25. Morris EJ, Michaud WA, Ji JY, Moon NS, Rocco JW, Dyson NJ. Functional identification of Api5 as a suppressor of E2F-dependent apoptosis *in vivo*. *PLoS Genet*. 2006; 2:11 Available: <http://www.plosgenetics.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pgen.0020196>.
26. Braid LR, Verheyen EM. *Drosophila nemo* promotes eye specification directed by the retinal determination gene network. *Genetics*. 2008; 180:283–299. doi: [10.1534/genetics.108.092155](#) PMID: [18757943](#)
27. Fan Y, Wang S, Hernandez J, Yenigun VB, Hertlein G, Fogarty CE, et al. Genetic models of apoptosis-induced proliferation decipher activation of JNK and identify a requirement of EGFR signaling for tissue regenerative responses in *Drosophila*. *PLoS Genet*. 2014; 10:1 Available: <http://www.plosgenetics.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pgen.1004131>.
28. Verma R, Aravind L, Oania R, McDonald WH, Yates JR, Koonin EV, et al. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science*. 2002; 298: 611–615. PMID: [12183636](#)
29. Reyes-Turcu FE, Horton JR, Mullally JE, Heroux A, Cheng X, Wilkinson KD. The ubiquitin binding domain ZnF UBP recognizes the C-terminal diglycine motif of unanchored ubiquitin. *Cell*. 2006; 124: 1197–1208. PMID: [16564012](#)
30. Kaiser SE, Riley BE, Shaler TA, Trevino RS, Becker CH, Schulman H, et al. Protein standard absolute quantification (PSAQ) method for the measurement of cellular ubiquitin pools. *Nat Methods*. 2011; 8: 691–696. doi: [10.1038/nmeth.1649](#) PMID: [21743460](#)
31. Oh C, Yoon JH, Park S, Yoo YJ. Simultaneous quantification of total and conjugated ubiquitin levels in a single immunoblot. *Anal Biochem*. 2013; 443: 153–155. doi: [10.1016/j.ab.2013.09.011](#) PMID: [24050967](#)
32. Wilkinson KD. Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *FASEB J*. 1997; 11: 1245–1256. PMID: [9409543](#)
33. Larsen CN, Krantz BA, Wilkinson KD. Substrate specificity of deubiquitinating enzymes: ubiquitin C-terminal hydrolases. *Biochemistry*. 1998; 37: 3358–3368. PMID: [9521656](#)
34. Junn E, Ronchetti RD, Quezado MM, Kim SY, Mouradian MM. Tissue transglutaminase-induced aggregation of alpha-synuclein: Implications for Lewy body formation in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 2047–2052. PMID: [12576551](#)
35. Hanna J, Hathaway NA, Tone Y, Crosas B, Elsasser S, Kirkpatrick DS, et al. Deubiquitinating enzyme Ubp6 functions noncatalytically to delay proteasomal degradation. *Cel*. 2006; 127: 99–111.
36. Hanna J, Meides A, Zhang DP, Finley D. A ubiquitin stress response induces altered proteasome composition. *Cell*. 2007; 129: 747–759. PMID: [17512408](#)
37. Hu M, Li P, Song L, Jeffrey PD, Chenova TA, Wilkinson KD et al. Structure and mechanisms of the proteasome-associated deubiquitinating enzyme USP14. *EMBO*. 2005; 24: 3747–3756. PMID: [16211010](#)
38. Szlanka T, Haracska L, Kiss I, Deák P, Kurucz E, Andó I, et al. Deletion of proteasomal subunit S5a/Rpn10/p54 causes lethality, multiple mitotic defects and overexpression of proteasomal genes in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Sci*. 2003; 116: 1023–1033. PMID: [12584246](#)

39. Ju D, Wang L, Mao X, Xie Y. Homeostatic regulation of the proteasome via an Rpn4-dependent feedback circuit. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 321: 51–57. PMID: [15358214](#)
40. Chernova TA, Allen KD, Wesoloski LM, Shanks JR, Chernoff YO, Wilkinson KD. Pleiotropic effects of Ubp6 loss on drug sensitivities and yeast prion are due to depletion of the free ubiquitin pool. *J Biol Chem*. 2003; 278: 52102–52115. PMID: [14559899](#)
41. Hanna J, Leggett DS, Finley D. Ubiquitin depletion as a key mediator of toxicity by translational inhibitors. *Mol Cell Biol*. 2003; 23: 9251–9261. PMID: [14645527](#)
42. Xu D, Woodfield SE, Lee TV, Fan Y, Antonio C, Bergmann A. Genetic control of programmed cell death (apoptosis) in *Drosophila*. *Fly(Austin)*. 2009; 3: 78–90. PMID: [19182545](#)
43. Holley CL, Olson MR, Colón-Ramos DA, Kornbluth S. Reaper eliminates IAP proteins through stimulated IAP degradation and generalized translational inhibition. *Nat Cell Biol*. 2002; 4:439–444. PMID: [12021770](#)
44. Ryoo HD, Bergmann A, Gonen H, Ciechanover A, Steller H. Regulation of *Drosophila* IAP1 degradation and apoptosis by reaper and ubcD1. *Nat Cell Biol*. 2002; 4:432–438. PMID: [12021769](#)
45. Dantuma NP, Groothuis TA, Salomons FA, Neefjes J. A dynamic ubiquitin equilibrium couples proteasomal activity to chromatin remodeling. *J Cell Biol*. 2006; 173: 19–26. PMID: [16606690](#)
46. Kimura Y, Tanaka K. Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis. *J Biochem*. 2010; 147: 793–798. doi: [10.1093/jb/mvq044](#) PMID: [20418328](#)
47. Deveraux Q, Ustrell V, Pickart C, Rechsteiner M. A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J Biol Chem*. 1994; 269: 7059–7061. PMID: [8125911](#)
48. Beal R, Deveraux Q, Xia G, Rechsteiner M, Pickart C. Surface hydrophobic residues of multiubiquitin chains essential for proteolytic targeting. *Proc Natl Acad Sci*. 1996; 93: 861–866. PMID: [8570649](#)
49. Mimnaugh EG, Chen HY, Davie JR, Celis JE, Neckers L. Rapid deubiquitination of nucleosomal histones in human tumor cells caused by proteasome inhibitors and stress response inducers: effects on replication, transcription, translation, and the cellular stress response. *Biochemistry*. 1997; 36:14418–14429. PMID: [9398160](#)
50. Wang H, Wang L, Erdjument-Bromage H, Vidal M, Tempst P, Jones RS, et al. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature*. 2004; 431: 873–878. PMID: [15386022](#)
51. Wang CH, Chen GC, Chien CT. The deubiquitinase Leon/USP5 regulates ubiquitin homeostasis during *Drosophila* development. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 452: 369–375. doi: [10.1016/j.bbrc.2014.08.069](#) PMID: [25152394](#)
52. Ecroyd H, Carver JA. Unraveling the mysteries of protein folding and misfolding. *IUBMB Life*. 2008; 60: 769–774. doi: [10.1002/iub.117](#) PMID: [18767168](#)
53. Bence NF, Sampat RM, Kopito RR. Impairment of the Ubiquitin-Proteasome System by Protein Aggregation. *Science*. 2001; 292: 1552–1555. PMID: [11375494](#)
54. Snyder H, Mensah K, Theisler C, Lee J, Matouschek A, Wolozin B. Aggregated and monomeric alpha-synuclein bind to the S6<sup>1</sup> proteasomal protein and inhibit proteasomal function. *J Biol Chem*. 2003; 278: 11753–11759. PMID: [12551928](#)
55. Bainbridge SP, Bownes M. Staging the metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol*. 1981; 66: 57–80. PMID: [6802923](#)
56. Oh SW, Kingsley T, Shin HH, Zheng Z, Chen HW, Chen X, et al. A P-element insertion screen identified mutations in 455 novel essential genes in *Drosophila*. *Genetics*. 2003; 163: 195–201. PMID: [12586707](#)
57. Pál M, Nagy O, Ménesi D, Udvardy A, Deák P. Structurally related TPR subunits contribute differently to the function of the anaphase-promoting complex in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Sci*, 2007; 120: 3238–3248. PMID: [17878237](#)