

# **A DmUsp5 dezubikvitiláz fiziológiai funkciójának meghatározása *Drosophila melanogaster*ben**

Doktori értekezés tézisei

**Kovács Levente**

Témavezető:

**Dr. Deák Péter**, tanszékvezető, egyetemi docens

SZTE TTIK Biológia Doktori Iskola

SZTE TTIK Genetikai Tanszék

MTA SZBK Biokémiai Intézet

**Szeged**

**2015**

## **1. Bevezetés**

Az ubikvitiláció során egy enzimeszköz 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 a proteázok osztályába tartozó dezubikvitiláló enzimek, vagy DUB-ok katalizálják. A DUB-ok eltávolíthatják a degradatív poliubikvitin láncokat a szubsztrátfehérjéről, így a lebontás ellen hatva növelik a fehérjék féléletidejét. A DUB-ok egy csoportja részt vesz a proteaszómális fehérjelebontás után visszamaradó poliubikvitin láncok szabad monomerekké hasításában, tehát nélkülözhetetlenek az ubikvitinek újrahasznosításához. Továbbá a DUB-ok funkciója elengedhetetlen az ubikvitinek bioszintéziséhez. Az új ubikvitinek riboszómális alegységekhez fuzionáltnak vagy poliubikvitin fúziókként keletkeznek, amelyeket a DUB-ok szabdalnak szabad ubikvitin monomerekké. Annak ellenére, hogy biokémiai szempontból DUB-

ok élesztőben és humán sejtvonalakban jól ismertek, konkrét fiziológiai folyamatokban játszott szerepük soksejtűekben kevésbé tisztázott. Nem teljesen tisztázott, hogy a DUB-ok hogyan vesznek részt olyan ubiquitin-függő folyamatok szabályozásában, mint például az apoptózis.

## **2. Célkitűzések**

Munkánk célja a dezubikvitiláló enzimek azonosítása és jellemzése egy soksejtű intakt modellorganizmusban, a *Drosophila melanogaster*-ben. A gének szisztematikus csendesítésével vizsgáltuk a DUB-ok szerepét a *Drosophila* egyedfejlődésében. Továbbá funkcionális szűrésekkel azonosítottuk azokat a DUB-okat, amelyeknek szerepe lehet olyan ubikvitin-függő folyamatokban, mint például az apoptózis. Ezeket a célokat az alábbi lépéseken keresztül valósítottuk meg:

1. Feltételezhetően dezubikvitiláló enzimeket kódoló gének azonosítása *Drosophila*-ban bioinformatikai módszerekkel.
2. Az így azonosított *Drosophila* DUB-ok előzetes jellemzése transzgénikus RNS interferencia és mutáns vonalak segítségével.
3. A DUB-ok szűrése az apoptózisban játszott potenciális szerepükre.
4. A különösen érdekes apoptotikus fenotípust mutató gén(ek) részletesebb funkcionális vizsgálata:
  - allélsorok előállítás;
  - az apoptózis vizsgálata mikroszkópos és immun-hisztokémiai technikákkal;
  - apoptotikus gének expressziójának vizsgálata;
  - funkcionális homológia vizsgálata;
  - az ubikvitin háztartás vizsgálata.

### **3. Alkalmazott módszerek**

1. Adatbázisok, szekvencia-összehasonlító és predikációs programok kezelése (NCBI, EBI, UniProt, FlyBase, InterPro Scan).
2. *Drosophila* transzgénikus RNS interferencia és P elem inszerciós mutánsok vizsgálata.
3. Szemikvantitatív, reverz transzkripcióhoz kapcsolt PCR (RT-PCR) és kvantitatív valós idejű PCR (qPCR).
4. Deléciós mutánsok előállítása P elem remobilizációval.
5. Western blot analízis.
6. Rekombináns DNS technikák.
7. Transzgénikus túltermelő *Drosophila* vonalak előállítása.
8. Alapvető élesztős technikák (élesztő növesztése szelektív táptalajon, transzformálás).
9. Lárvális szövetek citológiai és immunhisztokémiai vizsgálata.
10. Transzláció-gátlószer (cikloheximid) alkalmazása etetési tesztben.

#### **4. Eredmények**

1. Bioinformatikai módszerekkel azonosítottuk dezubikvitaláló enzimeket a *Drosophila*-ban. 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* dezubikvitaláló enzimet azonosítottunk. Úgy véljük, hogy a DUB-ok szerkezetéről rendelkezésre álló mai ismereteink alapján az összes *Drosophila* DUB-ot azonosítottuk.
2. A *Drosophila* DUB gének azonosítását azok részleges genetikai jellemzése követte. Ehhez a munkához 87 transzgénikus 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 dezubikvitaláló enzimek közül 27 létfontosságú, hiányukban az állatok elpusztulnak, vagy sterilek lesznek.
3. A *Drosophila* DUB-okra genetikai szűrést végeztünk annak megállapítására, hogy mely DUB-oknak lehet szerepe az apoptózis szabályozásában. Ebből a célból, szemben indukált géncsendesítést követően vizsgáltuk a muslicák szemének

morfológiáját. 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 egyik apoptotikus fenotípust mutató gént alaposabb vizsgálatnak vetettük alá.

4. A *CG12082* gén részletes genetikai analíziséhez két deléziós mutánst állítottunk elő P elem remobilizációval. Mindkét mutáció a gén funkcióját teljes mértékben gátolta és késői 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 lárvakori pusztulásához.
5. 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. Szekvencia összehasonlításon túlmenően heterológ menekítési kísérletet végeztünk a funkcionális homológia megállapítására. Azt tapasztaltuk, hogy a *CG12082* szekvencia képes menekíteni az élesztő *usp14Δ* 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.

6. Kimutattuk, hogy a DmUsp5 mutánsokban felhalmozódnak a szabad poliubikvitin láncok és szubsztráthoz kötött poliubikvitinek. Irodalmi adatok hasonló fenotípust írnak le az élesztő és humán ortológok esetében is. Ez a fenotípus arra utal, hogy a DmUsp5-nek az ubikvitinek újrahasznosításában van szerepe. A poliubikvitinek akkumulációjával párhuzamosan a szabad monoubikvitinek mennyiségének csökkenését mértük. Ennek az lehet a magyarázata, hogy az ubikvitin monomerek konjugált formában lekötvé maradnak és így a szabad ubikvitin készlet kimerül, pótlásuk DmUsp5 hiányában lassú, vagy gátlódik.
7. Részletesen vizsgáltuk a *DmUsp5* deléciós mutánsok apoptotikus fenotípusát. A mutáns lárvák agyából készült orceinnel festett mikroszkópi preparátumokon a kis, lekerekített, pyknotikus sejtek számának közel ötszörös megemelkedését tapasztaltuk. Ezek a sejtek az apoptotikus sejteknek feleltethetőek meg. A mutánsokban zajló nagymértékű sejthalált akridin-narancs festéssel és aktivált kaszpáz-3 elleni immunfestéssel is igazoltuk. Génexpressziós vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy a mutánsokban nagymértékben megemelkedik a *p53*, a *rpr* és a *hid* proapoptotikus regulátorok expressziója. A proapoptotikus regulátorgének terméke



kölcsönhat a DIAP1-el. A DIAP1 a fő apoptózis inhibitor *Drosophilában*, és normális körülmények között kordában tartja a kaszpázokat, így gátolja az apoptózist. Citotoxikus stressz hatására a proapoptotikus regulátorok túlexpresszálódnak, kötődnek a DIAP1-hez, gátolják a funkcióját. A DIAP1 gátlása a kaszpázok felszabadulásához vezet, és beindítja az apoptózist. A propapoptotikus regulátorgén az aktiválódása a *DmUsp5* mutásokban arra utal, hogy a DIAP1 apoptózist gátló fehérje inaktiválódik. A DIAP1 inaktiválására közvetve utal az is, hogy a *DmUsp5* mutásokban transzgénikusan túltermeltetett DIAP1 részlegesen menekítette a mutások letális és apoptotikus fenotípusát. A DIAP1 egy E3 ubikvitin-ligáz és a hibás működése a *DmUsp5* hiányában fellépő ubikvitin stresszel magyarázható.

8. 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. 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.

9. Élesztő vizsgálatokból ismert, hogy a monoubikvitin készlet kimerülése különösen érzékennyé teszi a sejteket különböző vegyületekkel, például a transláció gátló szerekkel szemben. Kimutattuk, hogy *DmUsp5* esetében, már a gén egyik kópiájának hiánya is jelentősen érzékennyé teszi a muslicákat 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 stresszválaszt jelzi.

## 5. Összefoglalás

Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy 45 DUB gént azonosítottuk *Drosophilában*, amelyeknek több mint fele nélkülözhetetlen az állatok egyedfejlődéséhez. A létfontosságú gének közül hétnek a hiánya vezet abnormálisan magas apoptózishoz. Ezek közül az egyik az evolúciósan konzerválódott *DmUsp5*, amely az ubikvitinek újrahaznosítása révén nélkülözhetetlen a sejt szabad ubikvitin készletének a fenntartásához. Hiányában a sejt ubikvitin egyensúlya felborul és jelentős mértékű ubikvitin stressz lép fel. A sejt monoubikvitin készlete normál körülmények között is limitált, ezért a különböző ubikvitilációval szabályozott folyamatok versengenek érte. A korlátozott mennyiségű szabad ubikvitin az, ami a szabályozott fehérjelebontást összekapcsolja az egyedfejlődéssel és az apoptózissal, azáltal hogy ezeket az ubikvitilációval szigorúan szabályozott folyamatokat egymástól kölcsönösen függővé teszi. A *DmUsp5* funkcióvesztéses mutánsokban tapasztalt pleiotróp hatások összessége arra utal, hogy az apoptotikus folyamatok indukciója az ubikvitin-egyensúly felborulásának következménye.

## **6. Közlemények**

*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

MTMT azonosítószám: 2871663

*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

MTMT azonosítószám: 2015348

*A dolgozat témájával kapcsolatos szóbeli előadások:*

- Molekuláris Élettudományi Konferencia, Eger, 2015. március 27-29.
- Magyar Biokémiai Egyesület 2014. évi Vándorgyűlése, 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 Fejlődésbiológiai Napok, Siófok, 2011. március 25-27.

*A dolgozat témájával kapcsolatos poszter bemutatók:*

- 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 Vándorgyűlése, 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.

## Társszerzői nyilatkozat

Alulírott **dr. Nagy Olga, dr. Pál Margit, dr. Udvardy Andor, dr. Octavian Popescu, dr. Deák Péter** nyilatkozok arról, hogy a *Kovács et al. Role of the Deubiquitylating Enzyme DmUsp5 in Coupling Ubiquitin Equilibrium to Development and Apoptosis in Drosophila melanogaster (2015)* közleményünkben, illetve *A DmUsp5 dezubikvitiláz fiziológiai funkciójának meghatározása Drosophila melanogasterben* című doktori értekezésében közölt eredményekben a jelölt, **Kovács Levente** szerepe meghatározó fontosságú. Hozzájárulok, hogy a közleményünkben foglalt eredményeket a jelölt felhasználja Szegedi Tudományegyetem TTIK Biológia Doktori Iskola keretében a doktori fokozat eléréseért benyújtott dolgozatában, és egyúttal kijelentem, hogy ezeket az eredményeket nem használtam fel tudományos fokozat megszerzésekor, és ezt a jövőben sem teszem.

jelölt, Kovács Levente

Dr. Octavian Popescu  
külföldön tartózkodik

.....

Dr. Nagy Olga  
külföldön tartózkodik

Dr. Deák Péter

.....

Dr. Pál Margit

.....

Dr. Udvardy Andor

.....

## **Témavezetői nyilatkozat**

Alulírott, dr. Deák Péter Kovács Levente PhD munkájának témavezetőjeként igazolom, hogy a jelölt tézisei az általa végzett munka eredményeit tükrözi és PhD értekezéséhez felhasznált közlemény (*Kovács és mtsai, Role of the Deubiquitylating Enzyme DmUsp5 in Coupling Ubiquitin Equilibrium to Development and Apoptosis in Drosophila melanogaster, 2015*) létrehozásához jelentős mértékben hozzájárult.

Dr. Deák Péter

.....