

A felgyorsult fehérje körforgás szerepe a transzlációs hibákkal szembeni alkalmazkodási folyamatokban

Ph.D. értekezés



Kalapis Dorottya

Témavezető: Dr. Pál Csaba

Biológia Doktori Iskola

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémia Intézet

SZTE TTIK

Szeged

2017

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
Rövidítések.....	5
1. Bevezetés.....	7
2. Irodalmi áttekintés.....	9
2.1. A fehérjék és szerkezetük.....	9
2.2. A transláció.....	10
2.2.1. A messenger RNS (mRNS) szerkezete.....	10
2.2.2. A transzfer RNS (tRNS) szerkezete.....	11
2.2.3. A riboszómális RNSek (rRNS) és a riboszóma.....	12
2.2.4. A fehérjeszintézis.....	13
2.3. A fehérjék feltekerése.....	14
2.4. A fehérjék lebontása.....	15
2.4.1. Lizoszómális lebontás.....	16
2.4.2. Proteaszómális lebontás.....	16
2.5. A fehérjeszintézis hibák típusai.....	17
2.5.1. A mRNS átírási hibák.....	18
2.5.2. A fehérje átírási hibák.....	18
2.5.3. A fehérjék utólagos módosítása és feltekerése alatt megjelenő hibák.....	19
2.6. A fehérjeszintézis hibák gyakorisága.....	19
2.7. A fehérjeszintézis hibák káros hatásai.....	21
2.8. A hibás fehérjeszintézis költségeinek minimalizálása.....	22
2.8.1. A translációs hibaráta csökkentése.....	22
2.8.2. A translációs hibák hatásainak mérséklése.....	24
2.9. A genetikai kód.....	25
2.10. A CTG klád egyedi genetikai kódja.....	26
2.11. Evolúciós elméletek a kodon átrendeződésre.....	28
2.12. A pékélesztő mint ideális modellszervezet.....	30
2.13. Kétértelmű aminosav kódolási rendszer kialakítása pékélesztőben.....	31
2.14. Az evolúciós alkalmazkodás elméleti modelljei.....	32
2.14.1. Az alkalmazkodás geometriai modellje.....	32
2.14.2. Az alkalmazkodás DNS szekvencia alapú modelljei.....	33
3. Célkitűzések.....	36
4. Anyagok és módszerek.....	37

4.1.	Felhasznált törzsek és plazmidok	37
4.2.	Alkalmazott táptalajok és tápoldatok	38
4.3.	Felhasznált módszerek	39
4.3.1.	Modellszervezet előállítása.....	39
4.3.2.	Laboratóriumi evolúció	40
4.3.3.	Rátermettség mérés.....	40
4.3.4.	Fehérjeszintézis gátló szerekkel szembeni érzékenység mérése.....	41
4.3.5.	A rátermettség mérése éhezési körülmények között.....	41
4.3.6.	Plazmid csere.....	41
4.3.7.	A fehérje aggregációs ráta mérése.....	42
4.3.8.	A translációs hibaráta mérése.....	42
4.3.9.	A β -galaktozidáz expresszió meghatározása (Western blottal)	43
4.3.10.	A tRNS _{CAG} ^{szerin} expressziójának meghatározása Northern blottal	44
4.3.11.	A fehérjeszintézis ráta meghatározása	44
4.3.12.	Proteaszóma aktivitás mérés.....	45
4.3.13.	A glükóz felvételi ráta mérése	46
4.3.14.	A kronológiai élettartam mérése	46
4.3.15.	A Rpl25p riboszómális fehérje eloszlásának vizsgálata	47
4.3.16.	A génexpresszió microarray alapú vizsgálata	47
4.3.17.	A microarray adatok kiértékelése.....	48
4.3.18.	DNS szekvencia meghatározása.....	49
4.3.19.	A genomsekvenciák bioinformatikai elemzése.....	49
4.3.20.	A funkcionális feldúsulás vizsgálata.....	50
5.	Eredmények.....	51
5.1.	A translációs hibaráta megemlése	51
5.1.1.	A tRNS _{CAG} ^{szerin} expresszió hatása a translációs hibarátára.....	51
5.2.	A magas translációs hibaráta hatása a rátermettségre	52
5.3.	A rátermettség változása a laboratóriumi evolúció alatt	54
5.4.	A magas translációs hibaráta költségeinek felderítése	57
5.5.	A magas translációs hibarátához történő evolúciós adaptáció genetikai és molekuláris hátterének vizsgálata	60
5.5.1.	Az adaptáció genetikai hátterének megismerése.....	60
5.5.2.	A génexpressziós változások adaptációban betöltött szerepének vizsgálata	62
5.6.	Az adaptáció molekuláris hátterének megismerése	64
5.6.1.	A translációs hibaráta változásának vizsgálata.....	64
5.6.1.1.	A translációs hibarátát befolyásoló mutációk azonosítása	64

5.6.1.2.	A translációs hibaráta változása az evolúció során.....	66
5.6.1.3.	A tRNA _{CAG} ^{szerin} expressziós szintjének meghatározása.....	67
5.6.2.	A fehérjeszintézis ráta mérése.....	68
5.6.3.	A proteaszóma aktivitás mérése.....	70
5.6.4.	Az adaptáció és a cikloheximid érzékenység kapcsolatának vizsgálata	71
5.7.	Az adaptáció mellékhatásainak azonosítása	73
5.7.1.	Az életképesség vizsgálta tápanyag limitáció mellett.....	73
5.7.2.	A glükóz felvétel mérése.....	75
5.7.3.	A kronológiai élettartam mérése	77
5.7.4.	A ribofágia mértékének meghatározása.....	78
6.	Az eredmények megvitatása.....	81
6.1.	A magas translációs hibaráta okozta rátermettség csökkenés laboratóriumi evolúció alatt gyorsan kompenzálható.....	81
6.2.	A magas translációs hibaráta elsősorban a fehérjék aggregációján keresztül okoz rátermettség csökkenést.....	83
6.3.	A magas translációs hibarátához való alkalmazkodás kialakulása laboratóriumi körülmények között	84
6.4.	Az adaptációs folyamatokban a translációs hibaráta csökkentése csak kisebb mértékben játszik szerepet.....	84
6.5.	A translációs hibákkal szembeni toleranciát az evolúció alatt felgyorsuló fehérje körforgás biztosítja	85
6.6.	A translációs hibákkal szembeni robusztusság kialakulásának mellékterméke a sejtek megnövekedett energiaigénye	88
7.	Gyakorlati következtetések	90
8.	Köszönetnyilvánítás	92
9.	Szakirodalmi hivatkozások.....	93
	Saját publikációk jegyéke	107
	Összefoglalás	109
	Summary	113
	Függelék.....	117

Rövidítések

A-hely	aminosav-hely
ATP	adenozin-trifoszfát
BCA	bicinchoninic sav
β -gal	β -galaktozidáz
Bp	bázispár
CCA	citozin-citozin-adenin
cDNS	complementary (komplementer) DNS
CFU	colony forming unit = telepképző egységek száma
Cyanine 3-CTP	Cyanine 3-aminoallylcitidine-5'-trifoszfát
DNS	dezoxiribonukleinsav
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EF-Tu	elongációs faktor-Tu
E-hely	„exit”-hely
GC	guanin-citozin
gDNS	genomi DNS
GEO adatbázis	Gene Expression Omnibus adatbázis
GFP	green fluorescent protein
GO	gene ontology
GTP	guanozin-trifoszfát
IgG	immunglobulin G
Kb	kilobázis
LiAC	lítium-acetát
mRNS	hírvivő ribonukleinsav
N-SLLVY-MCA	N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amido-4-Methylcoumarin
OD	optikai denzitás
ONPG	ortho-nitrofenil- β -galaktozid

PEG	polietilén- glikol
PGK1	foszfoglicerát-kináz
P-hely	peptidil-hely
Rpm	round per minute = percenkénti fordulatszám
rRNS	riboszómális ribonukleinsav
SC	synthetic complete = szintetikus gazdag
SDS	nátrium-dodec il-szulfát
SDS-PAGE	nátrium-dodec il-szulfát-poliakrilamid gélelektroforézis
SGD	Saccharomyces Genome Database
Tris	trisz-(hidroxi- metil)- amino- metán
tRNS	transzfer ribonukleinsav
TYC	ribotimin- pszeuouridin- citozin
UPR	unfolded protein response
UTR	untranslated region
UV	ultraibolya
VHL	von Hippel–Lindau

1. Bevezetés

A transláció egyike az élő szervezetekben lejátszódó alapvető felépítő folyamatoknak. A fehérjék az élőlények sejtjeinek fontos építő elemei, ezért a transláció pontos menete a sejtek életműködéseinek szempontjából kiemelt jelentőségű. Lévéen azonban, hogy nincs tökéletesen működő biológiai rendszer, a fehérjék képződése sem hibamentes, ez pedig hatással van az élőlények életképességére, és számos betegség kialakulásával is összefüggésbe hozható.

A fehérjék képződése az aminosavlánc felépítésén keresztül a megfelelő térszerkezet felvételén át a poszt-transzlációs módosításokig több egymásra épülő alrendszer együttes működése révén valósul meg. Friss kutatások kimutatták, hogy az említett folyamatok közül meglepően sok kifejezetten hibázásra hajlamos. Példaként említhető, hogy a hibás aminosav beépülések aránya 10^{-3} és 10^{-4} között mozog (Kramer és Farabaugh, 2007), ez az arány pedig jóval meghaladja a DNS másolás hibarátaját (közel 3-5 nagyságrenddel magasabb). Ezekből a számadatokból az látszik, hogy míg tökéletesen másolt DNS-t könnyen találhatunk a sejtekben, addig olyan sejt, melynek minden fehérjéje tökéletesen készült, nem létezik.

A hibás fehérjeképző folyamatok élőlényekre gyakorolt káros hatásaira számos bizonyíték létezik. A gyógyászatban ma is széles körben használnak olyan antibiotikumokat, melyek a transláció-megbízhatóság csökkentése révén fejtik ki ölő hatásukat (Kohanski és mtsai., 2008). Azt is tudjuk, hogy a fehérje képződés minőségellenőrzési rendszerének károsodása a normálistól eltérő sejtalak kialakulásához vezethet (Nangle és mtsai., 2006), illetve különböző neurodegeneratív betegségekkel összefüggő fenotípusok megjelenését idézheti elő (Lee és mtsai., 2006; Zhao és mtsai., 2005). A csökkent hatékonyságú fehérjeszintézis a fehérjék összecsapódásához és a minőségellenőrző rendszerek túltelítődéséhez is vezethet (Paredes és mtsai., 2012).

Hozzá kell azonban tenni, hogy ez csak az érem egyik oldala. Nem csak a translációs hibák feldúsulása, de a „túlzottan jól” működő minőségellenőrző folyamatok is negatívan befolyásolhatják az életképességet. A túl pontosan működő riboszómák kinetikusan kevésbé aktívak, így lassítják a fehérjék képződésének folyamatát, ez pedig az egész sejt növekedési sebességére hatással van (Ruusala és mtsai., 1984; Zaher és Green, 2009). Ezen adatokból látszik, hogy a fehérjeképződés

precizitásának van egy egyensúlyi szintje, melyet költség-haszon elvek mentén a hibák káros hatásai, és a riboszómák sebessége befolyásol.

Ha a fehérjeképző rendszer viszonylag nagy hibázási valószínűséggel dolgozik, a sejtek fehérjetartalmának jelentős része valamilyen mértékben sérült lehet. Felmerül a kérdés, hogyan képesek mégis a sejtek a normális életműködéseiket fenntartani? A probléma megoldását változatos minőségellenőrző rendszerek biztosítják. A folyamatok irányát tekintve két csoportra oszthatjuk a translációs hibákkal szemben kialakult védekező mechanizmusokat; az egyik csoportba a hibák megjelenési arányának csökkentésére irányuló, míg a másik csoportba a már meglévő hibák által okozott káros hatások mérséklését célzó folyamatokat soroljuk (Drummond és Wilke, 2009).

Jelenleg keveset tudunk arról, hogy ezen védekező mechanizmusok közül melyek és milyen arányban járulnak hozzá a sejtek normális működését biztosító fehérjetartalom kialakításához. Doktori disszertációmban az evolúcióbiológia, a biokémia, és a funkcionális genomika eszközeit felhasználva mutatok be egy kísérleti rendszert, mely laboratóriumi körülmények között vizsgálja a translációs hibák káros hatásainak mérséklésére irányuló védekező folyamatokat. Vizsgálatainkhoz egy speciális, *Saccharomyces cerevisiae* alapú modellt használtunk, melyben egy külsőleg bevitt tRNS segítségével mesterségesen emeltük meg egy adott kodon (CUG) kódolásának hibázási esélyét. Kutatási eredményeinkkel közelebb kerülhetünk annak megértéséhez, hogy az evolúció hogyan járulhat hozzá a fehérjék, mint a biológiai információ egységeinek megtartásához.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A fehérjék és szerkezetük

A sejtekben lejátszódó biológiai folyamatok nélkülözhetetlen szereplői a fehérjék. Erre már 1838-ban Berzelius is utalt, aki a fehérjéknek a görög eredetű *proteios* elnevezést adta, melynek jelentése „elsődleges fontosságú” (Vickery, 1950). A fehérjék gyakorlatilag valamennyi, a sejtben lejátszódó folyamatban részt vesznek: többek között biokémiai reakciók katalizálása (enzimek), különböző molekulák membránon keresztüli mozgása (transzporterek), jel-érzékelés és -feldolgozás (szabályozó és jelátviteli fehérjék). Adott fehérjék sejt szerkezeti valamint motoros funkciókkal is rendelkeznek (Arce és mtsai., 2009; Hirokawa és Takemura, 2003).

A természetben előforduló fehérjék zöme a genetikai kód által meghatározott 20 aminosavból felépülő polimer. Léteznek azonban olyan különleges élőlények is, melyeknél a genetikai kód bővülése tapasztalható. Jelenleg két olyan módosított aminosav ismert, mellyel a genetikai kód bővülése lehetséges az élővilágban (Ling és mtsai., 2015). Egyes archaea (Rother és Krzycki, 2010) és baktérium (Zhang és mtsai., 2006) fajok szelenociszteint építenek a redox enzimeikbe, bizonyos metanogén mikroorganizmusok pedig pyrrolizinnel bővítik a lehetségesen beépíthető aminosavak számát (Borrel és mtsai., 2012; Hao és mtsai., 2002).

A fehérjék szerkezetére a hierarchikus egymásra rendeződés jellemző. Megkülönböztetünk elsődleges-, másodlagos-, harmadlagos- illetve negyedleges szerkezetet (Brésen és Tooze, 1991). A felépítő aminosavak egymás utáni rendeződéséből kialakult lineáris polimer alkotja a fehérjék elsődleges szerkezetét. Az elsődleges szerkezetben az aminosavak egymással peptid kötéssel keresztül kapcsolódnak (Pauling, 1960). A másodlagos szerkezet a polipeptidlánc különböző részeinek térbeli elrendeződésével alakul ki. Ezeket a szerkezeti elemeket H-híd kötések stabilizálják. A legfontosabb ilyen elemek a hélixek, redők és a hurokok. A harmadlagos szerkezet alatt a teljes polipeptidlánc térbeli konformációját értjük, melyet elsősorban a molekulán belüli hidrofób kölcsönhatások stabilizálnak (Wood, 1996). A harmadlagos szerkezet egységei a domének, gyakran egy-egy funkcionális egységnek felelnek meg (Brésen és Tooze, 1991). Vannak fehérjék, melyek egynél több polipeptidlánc komplexbe rendeződésével alakulnak ki. A negyedleges struktúra ezen

alegységek egymáshoz való viszonyát és térbeli elrendeződését határozza meg (Berg és mtsai., 2002).

2.2. A transláció

A fehérjék termeléséhez szükséges összes információt az örökítő anyag (DNS) kódolja, mely információkat a molekuláris biológia centrális dogmája alapján a mRNS-ek közvetítése teszi a fehérjeszintézis rendszer számára értelmezhetővé (Crick, 1970). Transzlációnak azon folyamatok összességét nevezzük, melyek során a mRNS bázis sorrendje által meghatározottan zajlik az aminosavak polipeptidlánccá kapcsolása (Campbell, 1996). Eukarióta sejtekben a fehérjeszintézis helye a citoplazma (Kapp és Lorsch, 2004).

A transláció három különböző típusú ribonukleinsav (RNS) molekula egymással és egyéb faktorokkal történő együttműködése révén valósul meg. Ez a három RNS molekula a messenger RNS (mRNS), a transzfer RNS (tRNS) és a riboszómális RNS (rRNS) (Barciszewski és Clark, 2012).

2.2.1. A messenger RNS (mRNS) szerkezete

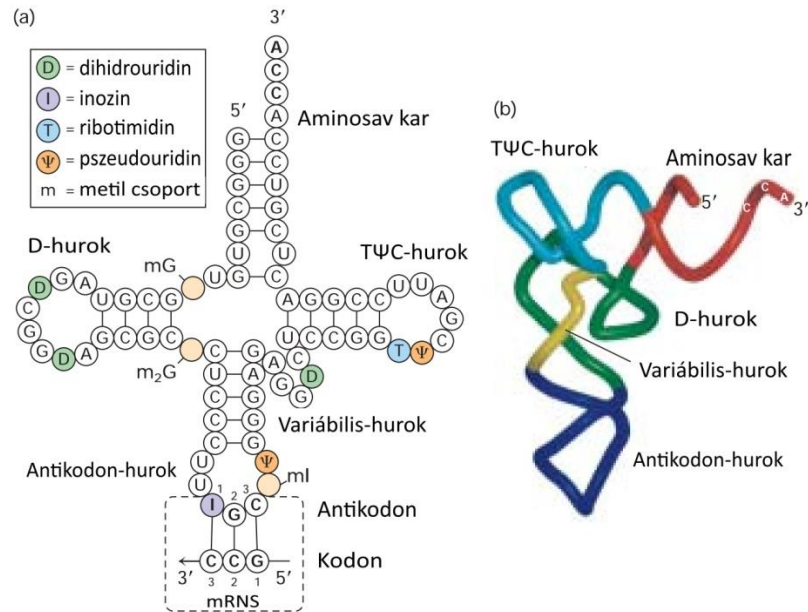
A mRNS információ közvetítő funkciót tölt be az örökítő anyag (DNS) és a fehérjeszintézis rendszere között (Crick, 1970). A DNS bázis sorrendjében meghatározott genetikai információ a transzkripció során fordítódik át a mRNS bázis sorrendjére (Brenner és mtsai., 1961). A mRNS láncot alkotó bázisok hármasával úgynevezett tripleteket, más néven kodonokat alkotnak. Egy-egy ilyen triplet a genetikai kódtábla szabályainak megfelelően egy-egy aminosav meghatározásáért felelős. A tripletek egymás utáni sorrendje adja a fehérjéket felépítő aminosavak sorrendjét. A mRNS fehérjét kódoló része az 5' start kodontól a 3' stop kodonig tart (Barciszewski és Clark, 2012). A prokariotákban egy adott mRNS molekula több fehérjét is kódol, azaz policisztronos (Kozak, 1983). Az eukarióták mRNS-ei ezzel szemben monocisztronosak (a splicing-variánsoktól eltekintve), azaz egy-egy mRNS molekula csak egy fehérje meghatározásáért felelős (Kozak, 1983).

A fehérjét kódoló szakaszon kívül, az 5' start helyet megelőzően illetve a 3' stop hely után úgynevezett nem átíródo régiók (UTR) helyezkednek el. A 5' UTR régióban található a mRNS-ek riboszóma kötőhelye (Elliott és Ladomery, 2015), a promóter

régió valamint egyéb szabályozó elemek is. Prokariótákban ezt a feladatot a Shine-Dalgarno szekvencia, eukariótákban a Kozak szekvencia látja el (Brown, 2002). Az eukarióta mRNS 5' végén található egy 7-metilguanozin sapka, mely az exonukleázok elleni védelemtől kezdve a riboszóma-kötés segítségével több feladatot is ellát (Elliott és Ladomery, 2015). Szintén az eukarióta mRNS-re jellemző a 3' UTR szakasz végén található poli-adenil farok, melynek a mRNS stabilitásának megőrzésében, a citoplazmába történő szállításkor, illetve a fehérjeszintézis hatékonyságának szabályozásában van szerepe (Barrett és mtsai., 2012).

2.2.2. A transzfer RNS (tRNS) szerkezete

A tRNS a „kódféjtő” szerepét tölti be a mRNS tripletok aminosavakká történő átírásában. Feladata a megfelelő aminosavak megkötése, a fehérjeszintézis helyére történő szállítása és a készülő polipeptidláncba épülésének segítése. A tRNS-ek általában 76-90 nukleotid hosszú molekulák (Sharp és mtsai., 1985), melyeket másodlagos szerkezetük miatt gyakran lóhere formában (1A. ábra), negyedleges szerkezetük miatt pedig L-alakban ábrázolnak (1B. ábra, Itoh és mtsai., 2013). Másodlagos szerkezetük alapján minden tRNS egy karral, és három hurokkal rendelkezik (lásd 1. ábra). A hurkok az ellentétes lefutású bázisok Watson-Crick párosodása révén jönnek létre. A molekula 3' végén található az „aminosav kar”. Nevét onnan kapta, hogy a 3' végén található egy citozin-citozin-adenin (CCA) szekvencia, ezen keresztül kapcsolódik a szállítandó aminosav a tRNS-hez. A három hurkot D-huroknak, antikodon-huroknak, illetve T-huroknak nevezzük (Itoh és mtsai., 2013). Néhány tRNS-ben az antikodon hurok és a T-hurok között még egy úgynevezett „variábilis hurok” is található. A T-hurok neve a rajta található ribotimin-pszepseudouridin-citozin (TΨC) szekvenciából ered. Az antikodon hurok tartalmazza a három bázis hosszúságú antikodont, mely ellentétes lefutásban kapcsolódik a mRNS megfelelő kodonjával. A D-hurok a nevét a rajta található 2-3 darab módosult bázisról, a dihidrouridintről kapta (Björk és mtsai., 1987).



1. ábra. A tRNS szerkezetének sematikus vázlata

A: A tRNS másodlagos szerkezete. B, A tRNS negyedleges szerkezete (ábra: Lodish és mtsai alaján., 2003)

2.2.3. A riboszómális RNSeK (rRNS) és a riboszóma

A riboszómális RNS-ek különböző fehérjékkel összerendeződve komplexeket alkotnak, melyeket riboszómáknak nevezünk. A riboszómák a fehérjeszintézis helyei, a mRNS-en végighaladva „olvassák le” a kódolt információkat, és ezek alapján katalizálják az aminosavak lánczá rendeződésének folyamatát, miközben számos faktort és tRNS-t is megkötnék (Barciszewski és Clark, 2012). A riboszómák kis és nagy alegységből épülnek fel. Mindkét alegységet a rá jellemző rRNS-ek és fehérjék alkotják. A teljes eukarióta riboszóma mérete 80S, ebből a kis alegység 40S, a nagy alegység pedig 60S méretű (Ben-Shem és mtsai., 2011). Az eukarióta kis riboszómális alegység a 18S rRNS-ből és 33 fehérjéből rendeződik össze (Ben-Shem és mtsai., 2011; Rabl és mtsai., 2011). A kis alegység fő feladata a mRNS-en kódolt információ „leolvasása” (Ramakrishnan, 2002). Az eukarióta riboszóma nagy alegysége egy 5S RNS-ből, egy 5.8S RNS-ből, egy 28S RNS-ből, és további 50 fehérjéből épül fel (Ben-Shem és mtsai., 2011; Klinge és mtsai., 2011). A nagy alegység fő feladata az aminosavak polipeptidláncba kapcsolása (Ramakrishnan, 2002).

Működés szempontjából három eltérő tRNS kötő helyet különböztetünk meg a riboszómákon; az aminosav-helyet (A-hely), a peptidil-helyet (P-hely), valamint az

angol „exit”, azaz kijárat szóból eredő E-helyet. Az A-helyre érkeznek és kötnek az aminosavval töltött tRNS-ek, melyek a fehérjelánc hosszabbításakor a P-helyre csúsznak tovább, és a riboszómát, már aminosav nélkül, az E-helyen hagyják el (Griffiths és mtsai., 2000).

2.2.4. A fehérjeszintézis

A polipeptidlánc szintézisének megkezdése előtt az építőköveknek, azaz az aminosavaknak a nekik megfelelő tRNS-hez kell kapcsolódniuk. Ez a folyamat két lépcsőbe zajlik le: az aminosavakat először egy specifikus aminoacil-tRNS-szintetáz enzim felismeri és megköti (aminosav aktiválás), ezt követően pedig az aktivált aminosavakat a nekik megfelelő tRNS-re kovalensen kapcsolja (Berg és mtsai., 2002). A megfelelő tRNS felismerésében az antikodon mellett egyéb szerkezeti elemek, mint az antikodon kar (Berg és mtsai., 2002), vagy a T-hurok (Schimmel és mtsai., 1993) is segítik az aminoacil-tRNS-szintetáz enzimet.

A létrejött aminoacil-tRNS molekulák ezután a riboszómához diffundálnak, ahol megkezdődik a polipeptidláncok szintézise. A fehérjeszintézis három szakaszban zajlik le: lánckezdés (iniciáció), lánchosszabbítás (elongáció) és lánczárás (termináció) (Rodnina és Wintermeyer, 2009).

A fehérjeszintézis iniciációs szakaszában a riboszóma két alegysége még nem alkot egymással komplexet, a szintézisben részt nem vevő alegységeket iniciációs faktorok tartják egymástól távol (Malys és McCarthy, 2011). A translációs preiniciációs komplex akkor alakul ki, mikor a kis alegység-iniciációs faktor komplexhez köt a lánckezdő aminosavat, formil-metionint szállító tRNS, GTP, további másik iniciációs faktoral együtt (Pestova és mtsai., 2001). Az iniciációs komplex kialakulásakor a kis alegységhez a lánckezdő AUG kodont felismerve köt a mRNS. Ebben a folyamatban a kis alegységet az eukarióta mRNS 5' UTR régiójában található Kozak-szekvencia segíti (De Angioletti és mtsai., 2004). Ez követően GTP hidrolizációja mellett a riboszóma peptidil helyére köt a formil-metionin-tRNS (Pestova és mtsai., 2001). Az iniciáció folyamata a riboszóma nagy alegységének GTP hidrolízise mellett történő kötődésével zárul (Pestova és mtsai., 2001; Poulin és Sonenberg, 2000).

Az elongáció a fehérjeszintézis második szakasza, mely során az aminosavak lépésenkénti láncba építése zajlik, a mRNS kodonjai által meghatározott sorrendben. A

folyamatban segítő fehérjék, úgynevezett elongációs faktorok is részt vesznek (Berg és mtsai., 2002).

Az iniciáció szakaszában az első aminosavat kötő tRNS a riboszóma peptidil helyén található, az A-hely pedig szabad. Ide érkezik a mRNS kodonjának megfelelő aminosavval töltött tRNS, és kapcsolódik a már ott lévő aminosavval GTP hidrolízise mellett. Ezt a reakciót peptidil-transzferáz reakciónak nevezzük, melyet a riboszóma nagy alegysége katalizál (Noller és mtsai., 2002).

A peptidkötés létrejöttével a már két aminosavból álló lánc az A-helyen lévő tRNS-en helyezkedik el. Ezt követően újabb GTP hidrolízis mellett a láncot hordozó tRNS az A-helyről a P-helyre, míg a már üres tRNS a P-helyről az E, vagyis kilépő helyre kerül a riboszóma csúszásának következtében. Ezt nevezzük a riboszóma transzlokációjának (Noller és mtsai., 2002). Az E-helyről a citoplazmába távozik az üres tRNS, az A-hely pedig ismét szabaddá válik, lehetővé téve az éppen aktuális kodonnak megfelelő aminosav odaszállítását, és a növekvő lánchoz kötését (Griffiths és mtsai., 2000). Az elongációs ciklusok ilyen lépések mentén a teljes aminosavlánc elkészültéig tartanak. Az aminosavlánc az amino-terminális végétől a karboxi-terminális vége felé halad, miközben a riboszóma a mRNS 5' végétől a 3' vég irányába csúszik. Egy mRNS-en adott időben több riboszóma is haladhat aktív fehérjeszintézist végezve. Ezt a struktúrát polisómának nevezzük (Warner és mtsai., 1963).

A polipeptidlánc szintézise akkor zárul le (termináció), mikor a riboszóma csúszásával az A-helyre a mRNS 3' végén található stop kodonok valamelyike kerül. Ilyenkor egy újabb tRNS kötése helyett speciális elengedő „release” faktorok érkeznek a komplexbe (Poole és Tate, 2000). A release faktorok GTP hidrolízise mellett leválasztják az elkészült fehérjeláncot a tRNS-ről, a tRNS-t a P helyről, és a riboszóma két alegységére disszociál (Korostelev, 2011).

2.3. A fehérjék feltekerése

Ahhoz, hogy a fehérjék feladatukat megfelelően ellássák, elengedhetetlen a megfelelő térbeli szerkezet kialakítása. Az a fizikai folyamat, mely során a polipeptidlánc felveszi a működéshez szükséges térszerkezetet, a feltekeredés vagy folding (Hartl és mtsai., 2011). Minél nagyobb egy fehérje, statisztikailag annál több lehetséges térszerkezetet vehetne fel, a legtöbb fehérje azonban a termodinamikailag számára legkedvezőbb, legstabilabb állapot elérésére törekszik (Govindarajan és Goldstein, 1998). Ezt a

térszerkezetet natív állapotnak nevezzük. Az Anfinsen-dogma szerint a fehérjék térszerkezetét az aminosav sorrendjük határozza meg (Anfinsen, 1972). A Levinthal-paradoxon értelmében a fehérjék ezt a natív állapotot viszonylag gyorsan elérik anélkül, hogy az összes lehetséges állapotot végigpróbálnák (Zwanzig és mtsai., 1992). A feltekeredés köztes, átmenetileg stabil állapotokon keresztül megy végben (Onuchic és mtsai., 1996).

A fehérjék natív állapotukat már a transláció alatt, vagy annak befejeztével is felvehetik. Bár a folyamat spontán is lezajlik, ez a sejtek életműködésének szempontjából túl lassú, és kevésbé hatékony megoldás. A gyorsabb és hatékonyabb feltekeredéshez a fehérjéknek segítségre van szüksége, ezt a feladatot a dajkafehérjék látják el (Hartl és mtsai., 2011). A dajkafehérjék egy egész fehérjecsaládot alkotnak, melyek tagjai nem csak az újonnan szintetizált fehérjék aktív feltekerésében, hanem a még natív állapotot el nem ért fehérjék átmeneti stabilizálásában és a hibás térszerkezet felvételének megakadályozásában is szerepet játszanak (Kim és mtsai., 2013). Sőt, a kisebb térbeli szerkezeti hibákat javítani is képesek a fehérjék kitekerésével, és megfelelő állapotba való visszatekerésével (Kim és mtsai., 2013). A dajkafehérjék működése energiát igényel (Kim és mtsai., 2013), de azzal, hogy meggyorsítják és hatékonyabbá teszik a fehérjék feltekerését, a sejteknek megéri erőforrásaik egy részét a dajkafehérjék működésére fordítani. A befektetett energia pedig különösen megtérülhet stresszkörülmények (pl: hőstressz) között.

2.4. A fehérjék lebontása

A fehérjék sejten belüli mennyiségét a felépítő és lebontó folyamatok dinamikus egyensúlya alakítja ki. A fehérjék fél-életideje között jelentős különbségek lehetnek (Zhou, 2004). Vannak olyan fehérjék, mint például a transzkripció faktorok, jelátviteli molekulák, vagy a sejtciklus szabályozó fehérjéi, melyek aktuális mennyisége döntő jelentőségű lehet a sejtek számára. Ezek azok a molekulák, melyek szerepet játszanak gyors sejtválaszok lebonyolításában, ezért fontos, hogy felépítési és lebontási folyamataik pontos szabályozás alatt álljanak. Ezeket a fehérjéket feladatuk végeztével gyakran el is kell távolítani a rendszerből (Kirschner, 1999). A rövid fél-életidejű fehérjék mellett a hibás, nem javítható fehérjék lebontása is szükséges (Kirschner, 1999). Az eukarióta sejtekben a felesleges vagy káros fehérjék lebontásának két fő mechanizmusa ismert; a lizoszómális és a proteozómális lebontás (Cooper, 2000).

2.4.1. Lizoszómális lebontás

Az eukarióta sejtek lizoszómái membránnal határolt sejszervecskék, melyekben hidrolitikus enzimek végzik az oda bekerült makromolekulák lebontását. Itt bomlanak le a sejtek előregedett, vagy sérült sejtalkotói, valamint a fagocitózis során az extracelluláris térből bekebelezett anyagok (Luzio és mtsai., 2007). Ez a fehérje lebontás kevésbé szelektív módja.

2.4.2. Proteaszómális lebontás

A lizoszómális lebontási úttól eltérően a proteaszómális lebontás szelektív folyamat, csak az egyedileg megjelölt, és így a lebontásra kijelölt fehérjék indulhatnak el ezen az úton. Ez az egyedi jel a fehérjék kovalens módosítása poliubiquitin oldallánc rákapcsolása útján (Cooper, 2000).

Az ubiquitin egy 76 aminosavból álló polipeptid, mely legtöbbször a fehérjék lizin oldalláncára kapcsolódik (Pickart, 2001). Néhány esetben megfigyeltek ubiquitilációt a fehérjék aminoterminális végén (Bloom és mtsai., 2003), még ritkábban egyéb aminosavakon, így ciszteinen, szerinen, és threoninon is (Witte és mtsai., 2005).

Az ubiquitiláció egy három lépcsős enzimátikus folyamat. Az első lépés az ubiquitin aktivációja. Ezt az E1 ubiquitin aktiváló enzim végzi, és a reakcióhoz ATP formájában energia szükséges. A második lépésben az aktivált ubiquitin az ubiquitin konjugáló enzim ciszteinjére kerül. A harmadik lépésben az ubiquitin konjugáló enzimről peptidkötéssel a célfehérje lizinjéhez kapcsolódik, ezt a reakciót az ubiquitin ligáz enzim katalizálja (Dikic és Robertson, 2012).

A fehérjék monoubiquitilációja még nem lebontási jel, hanem szabályozó funkciója van, a fehérje aktivitását vagy sejten belüli elhelyezkedését befolyásolja (Ikeda és Dikic, 2008). Lebontási jelet egy minimum 4 ubiquitinből álló lánc kapcsolódása jelent (Hicke, 2001), mely a fent ismertetett három lépéses enzimátikus folyamat ismétlődéseivel jön létre. A létrejött poliubiquitin oldalláncot ismeri fel a proteaszóma, a lebontást végző sejtalkotó.

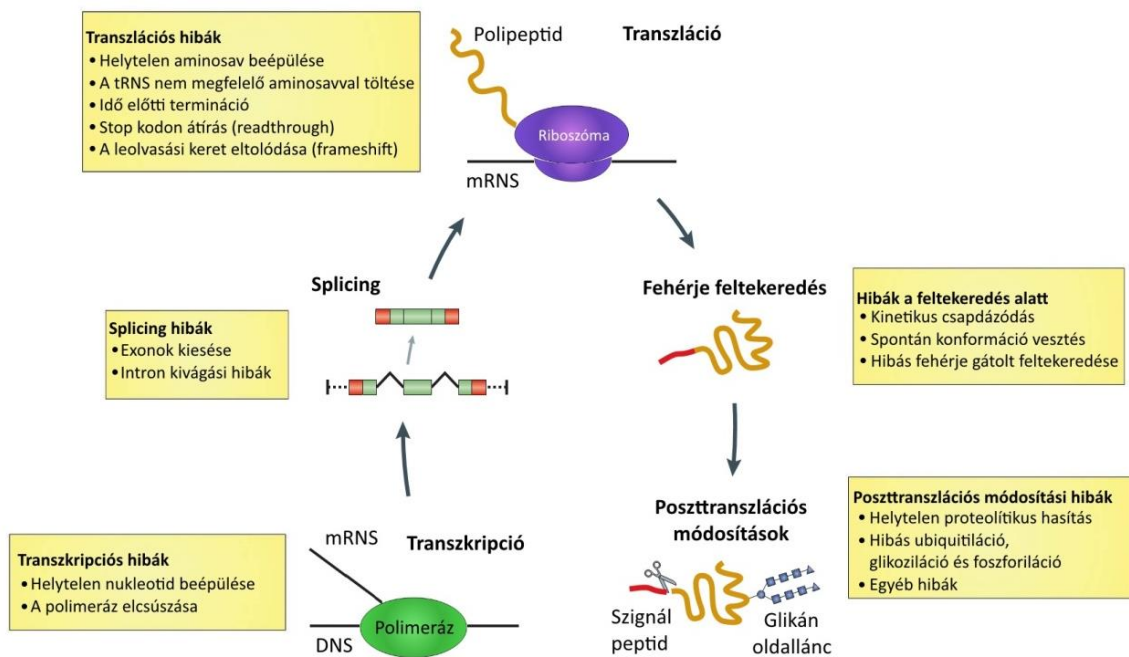
A proteaszómák eukariótákban, archaeákban, és bizonyos baktériumokban megtalálható fehérjekomplexek, melyek a fehérjelebontásért felelősek. Az eukariótákban leggyakrabban 26S proteaszóma névvel jelzett fehérjekomplex egy központi 20S cylinder alakú magból, és két szélső 19S fedőből áll. A központi 20S alegység két külső

α gyűrűből és két belső β gyűrűből áll. Ez utóbbiak rendelkeznek a fehérjék lebontásához szükséges katalitikus tulajdonságokkal; kimotripszin-szerű, tripszin-szerű és peptidil-glutamil-peptid aktivitással (Adams, 2003).

A fehérjék lebontása energiaigényes folyamat, melyhez ATP jelenlétére van szükség. A szabályozást a komplex két végén található 19S fedő alegységek végzik, melyek ATP molekulák hidrolízisével biztosítják a fehérjék lebontásához szükséges energiát (Liu és mtsai., 2006).

2.5. A fehérjeszintézis hibák típusai

Hibák a fehérjék képződésének valamennyi szakaszában bekövetkezhetnek, a transzláció, a térbeli szerkezet felvétele, illetve az utólagos kémiai módosítások alatt is. A közvetlen fehérje képződéssel összefüggő folyamatokon túl mRNA átírása és érése során jelentkező hibák is hatással vannak a fehérjeszintézis folyamataira (Drummond és Wilke, 2009, 2. ábra).



2. ábra. Az eukarióta transzlációs hibák típusai. (ábra: Drummond és Wilke, 2009 alapján)

2.5.1. A mRNS átírási hibák

A transzkripció hibák komolyan befolyásolhatják a transzlációs folyamatok minőségét. A DNS információ tartalmának pontatlan másolása a mRNS bázis sorrendjének megváltozását eredményezheti (Thomas és mtsai., 1998), az így képződött mRNS-ekről pedig hibás, a sejt genetikai programjának nem megfelelő elsődleges szerkezetű fehérjék íródnak át. Az eukarióták mRNS-einek jelentős része érési folyamatokon is keresztülmegegy, melyek ha nem megfelelően mennek végbe, a fehérjék szintézisére is súlyos hatást gyakorolnak (Douglas és Wood, 2011).

2.5.2. A fehérje átírási hibák

A transzláció alatt bekövetkező hibák a mRNS információ tartalmának téves lefordításából adódnak és a genetikailag meghatározottól eltérő aminosav sorrendű, és/vagy hosszúságú polipeptidláncok keletkezésével járnak.

Misztranszlációról akkor beszélünk, ha egy adott lánc pozícióba a genetikai kódnak nem megfelelő aminosav épül. Ennek egyik lehetséges módja, hogy egy olyan tRNS érkezik a riboszómához, mely a kodon-antikodon párosodás szabályainak ugyan megfelel, de rossz aminosavat köt (Wiltrout és mtsai., 2012). A hibás beépülés másik lehetősége, hogy egy megfelelő aminosavval töltött tRNS a genetikai kód lötyögése miatt nem a genetikai kód szabályai szerint párosodik a mRNS-sel (Kramer és Farabaugh, 2007).

A riboszómán a leolvasási keret elcsúszásával egymás melletti bázisok új tripleteket alkothatnak, így a képződő fehérje aminosav sorrendje is megváltozik. Ez a *frameshift* jelensége. A leolvasási keret elcsúszását többek között hibás tRNS-ek is okozhatják (Sésers és mtsai., 2008). Frameshifttel akár egy új, kódoló szekvencián belüli stop kodon is létrejöhet, melyet a riboszóma felismer, és így a transzláció a teljes aminosavlánc szintézise előtt leáll (Arava és mtsai., 2005; Jørgensen és Kurland, 1990). A transzláció terminációja sem feltétlen hibamentes. Ha a stop kodon felismerése zavart szenved, úgy az aminosavlánc szintézise nem áll le a mRNS 3' kódoló végén, hanem folytatódik a nem átírózó régiókban egy következő, stop kodonnak megfelelő bázishármasig (Dabrowski és mtsai., 2015; Williams és mtsai., 2004).

2.5.3. A fehérjék utólagos módosítása és feltekerése alatt megjelenő hibák

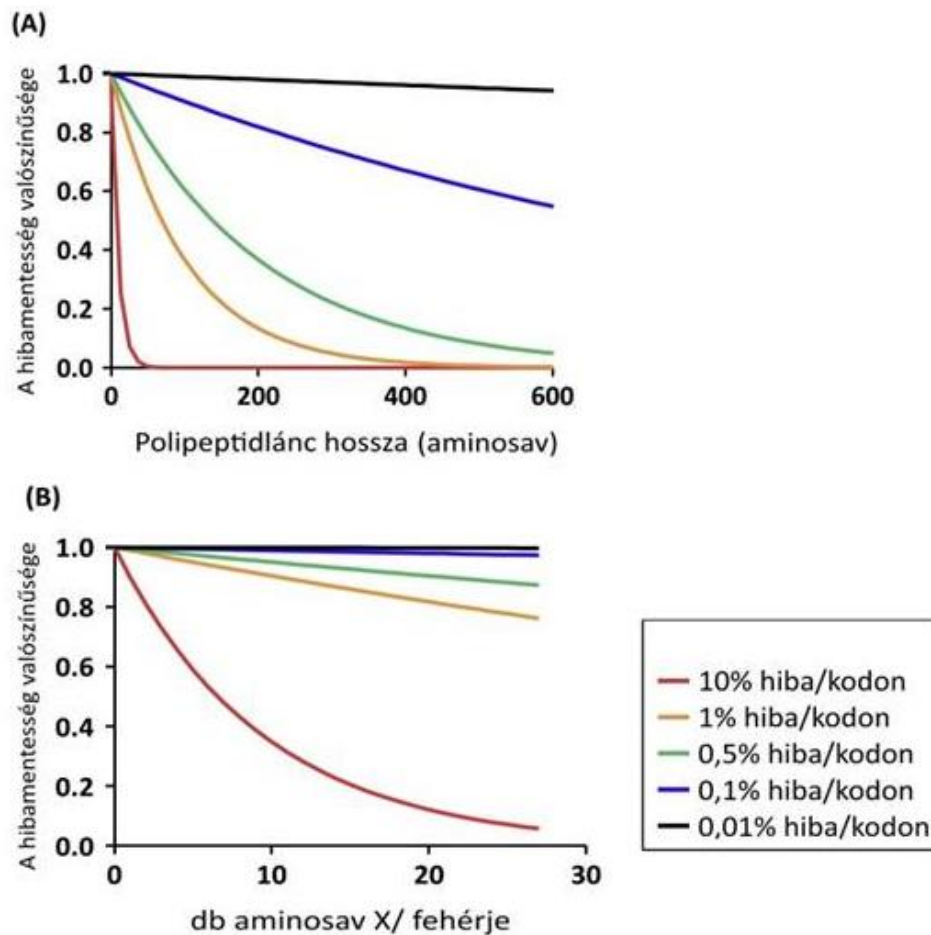
Az utólagos kémiai módosítási hibák minőségüktől függően befolyásolhatják a képződött fehérjék funkciót. Több humán betegség hátterében azonosítottak már glikozilációs (Hagberg és mtsai., 1993) vagy foszforilációs hibákat (Winklhofer és mtsai., 2008), ismereteink azonban még meglehetősen hiányosak a hibás poszt-transzlációs módosítások előfordulási gyakoriságának és következményeinek tekintetében.

A hibás feltekeredésnek is több oka lehet. A transzláció, valamint az utólagos kémiai módosítások alatt bekövetkező hibák gyakran eredményeznek hibás fehérje térszerkezetet, azonban akár egy tökéletesen elkészített fehérje feltekeredése során is adódhatnak problémák (Zhang és Yang, 2015).

2.6. A fehérjeszintézis hibák gyakorisága

A mai napig viszonylag kevés pontos becslés született a fehérjeszintézis hibáinak gyakoriságát illetően. Az ilyen témájú vizsgálatok mind egy-egy kifejezett esemény előfordulási valószínűségét mérik, ezekből az adatokból következtetve egy adott hiba típus megjelenési gyakoriságára. A különböző organizmusokban és eltérő módszerek segítségével végzett vizsgálatok eredményei mind azt bizonyítják, hogy a fehérjék képződése alatt több nagyságrenddel nagyobb a hibák megjelenési valószínűsége, mint a DNS szintézis folyamán. Míg a DNS másolás alatt 10^8 - 10^{10} eseményként történik meg egy hibás nukleotid beépítése (Kunkel és Bebenek, 2000), addig a transzláció alatt minden 10^3 - 10^6 -ik aminosav-beépülés hibás (Ellis és Gallant, 1982; Kramer és Farabaugh, 2007; Plant és mtsai., 2007; Rakwalska és Rospert, 2004; Salas-Marco és Bedwell, 2005; Stansfield és mtsai., 1998).

Ha a hibás aminosav beépülések aránya mellett a polipeptidláncok átlagos hosszát is figyelembe vesszük, teljesebb képet kapunk a transzlációs hibaráta proteómra gyakorolt hatásairól. Egy fehérjelánc hibamentességének valószínűsége adott hibaráta mellett a lánchosszúsággal csökken. Ez könnyen belátható, hiszen a hosszabb fehérjék több aminosavból állnak, így statisztikailag nagyobb valószínűséggel halmoznak fel hibákat a transzláció során. Alacsony hibaráta mellett a sejtek fehérjetartalmának jelentős része lehet hibamentes, azonban a „tökéletes” fehérjék előfordulási valószínűsége a hibaráta növekedésével csökken (Ribas de Pouplana és mtsai., 2014 és 3A ábra).



3. ábra. Összefüggés a translációs hibák gyakorisága és a fehérjék tulajdonságai között. A, Összefüggés a translációs hibák gyakorisága és a fehérjék hossza között B, Összefüggés a translációs hibák gyakorisága és a fehérje aminosav összetétele között. (Ábra: Pouplana és mtsai alapján, 2014)

Ha a translációs hibarátát egy bizonyos aminosav csere vonatkozásában nézzük, akkor egy tökéletes fehérje elkészülésének valószínűségét két tényező befolyásolja: a vizsgált hiba egész fehérjetartamra vonatkoztatott megjelenési valószínűsége, illetve hogy az adott fehérje hány olyan aminosavat tartalmaz, melyet a hiba érinthet (Ribas de Pouplana és mtsai., 2014 és 3B ábra).

A téves aminosav beépülések számszerűsítése mellett a fehérjeszintézis egyéb folyamatainak hibázási valószínűségeit is vizsgálták már. *Escherichia coli*-ban a leolvasási keret eltolódása $1,5-3 \times 10^5$ eseményenként egyszer (Curran és Yarus, 1986), idő előtti lánctermináció pedig $2,7 \times 10^4$ kodononként egyszer (Jørgensen és Kurland, 1990) volt megfigyelhető. Pékésztőben végzett vizsgálatok pedig 10^3 kodononként

egy téves láncterrminációs eseményről számoltak be (Arava és mtsai., 2005). Jelenlegi tudásunk alapján azt mondhatjuk, hogy a pro-és eukarióták fehérjeképző folyamatai hasonló hibázási valószínűséggel dolgoznak (Stansfield és mtsai., 1998).

2.7. A fehérjeszintézis hibák káros hatásai

Számos vizsgálat bizonyította már, hogy a fehérjeszintézis során bekövetkező hibák negatívan befolyásolhatják az élőlények életképességét, az okozott káros hatások pedig rendkívül változatosak lehetnek. A translációs minőségellenőrző rendszer sérülése megváltozott sejtalapot, szélsőséges esetben apoptózist indukálhat eukarióta sejtekben, az egész szervezetet tekintve pedig akár autoimmun folyamatok beindítását is eredményezheti (Nangle és mtsai., 2006). A fehérjékben felhalmozódó hibák megváltoztathatják a sejtek környezeti stresszel szembeni érzékenységét is (Bacher és mtsai., 2005). Péklesztő modellben bizonyították, hogy a translációs hibarátá megemelkedése a légzési lánc sérülésén keresztül csökkenti az életképességet (Reynolds és mtsai., 2010). A translációs hibák neurodegeneratív kórképek kialakulásában játszott szerepét is azonosították már (Winklhofer és mtsai., 2008). A translációs hibák életképesség csökkentő hatását az antibiotikum terápia alkalmazásakor is kihasználják. Ismert, hogy az aminoglikozid típusú antibiotikumok, például a sztreptomycin vagy a kanamicin a baktériumok translációs minőségellenőrző rendszerét blokkolják, így fejtik ki ölü hatásukat (Kohanski és mtsai., 2008).

Az életképesség csökkenés hátterében sokféle jelenség állhat. A hibás fehérjék működésképtelenné válhatnak, ami zavarhatja az életfolyamatok normális menetét.

Durva közelítéssel elmondható, hogy a hibás aminosav beépülések 10-50%-a okoz zavart a fehérjék működésében (Guo és mtsai., 2004; Markiewicz és mtsai., 1994).

A téves aminosav beépülések döntő többségben a térszerkezet változtatásán keresztül okozzák a fehérjék működésének zavarait (Pakula és Sauer, 1989). *E. coli*-ban is kimutatták, hogy ha a β -laktamáz enzim működése a helytelen térszerkezet miatt gátolt, az csökkenti a baktérium életképességét (Goldsmith és Tawfik, 2009).

Egyes tanulmányok szerint az elvesztett fehérje funkciók neurodegeneratív betegségek kialakulását is magyarázhatják. Olscha és munkatársai úgy vélik, hogy az ilyen kórképek esetén megfigyelhető amiloid-szerű aggregátumok sok esszenciális fehérjét is tartalmaznak és ez vezet az életképesség csökkenéshez (Olscha és mtsai., 2011).

A fehérjék a felhalmozott hibák hatására új, káros funkciókat is nyerhetnek. Ez kevésbé jellemző az egyébként normális térszerkezettel rendelkező fehérjékre (Drummond és Wilke, 2009). Általános jelenség, hogy a felhalmozódó hibák hatására helytelen térszerkezetű fehérjék képződnek, ezek jelenléte pedig káros a sejtek számára. A hibás fehérjék összecsapódása beindíthatja az endoplazmatikus retikulum stressz folyamatait (Lee és mtsai., 2006; Smith és mtsai., 2005), a Golgi készülékek széteséséhez (Gosavi és mtsai., 2002), és a sejtmembrán destabilizációjához vezethet (Stefani, 2007; Volles és mtsai., 2001).

A neuronális sejtek különösen érzékenyek az összecsapódó fehérjék felhalmozódására (Soto, 2003), ez sok esetben neurodegeneratív kórképek kialakulását eredményezi. Az összecsapódó fehérjék idegsejt károsító hatása máig egy intenzíven kutatott terület (Brettschneider és mtsai., 2015).

A hibás fehérjék a rendelkezésre álló molekuláris eszközök tekintetében és energetikai értelemben is megterhelést jelentenek a sejtek számára (Willensdorfer és mtsai., 2007). Mivel a sejtek riboszóma és proteaszóma ellátottsága véges, így a hibás fehérjék akár a „helyet is foglalhatják” a működőképes fehérjék előtt. A rendszer energiát is pazarol azzal, hogy „felesleges” fehérjéket szintetizál, és ezek lebontása is csak energia befektetéssel valósulhat meg. A hibás fehérjék megnövekedett szintje a dajkafehérjék rendszerét is túlterhelheti (Sóti és Csermely, 2003).

2.8. A hibás fehérjeszintézis költségeinek minimalizálása

2.8.1. A translációs hibaráta csökkentése

A hibás aminosav beépülések elkerülésében fontos szerepe van a minőségellenőrző folyamatoknak. Ezek a folyamatok a fehérjeszintézis lépéseinek nyomonkövetésével a genetikai kódban foglalt információk pontos lefordítását segítik. A keletkezett hibákat a minőségellenőrző rendszerek kiszűrik, javítják, vagy megakadályozzák a további károk felhalmozódását.

A transláció első lépése a tRNS megfelelő aminosavval töltése, melyet az aminoacil-tRNS szintetázok végeznek. Ezek az enzimek számos szekvencia-specifikus fehérje-RNS interakció segítségével képesek megkülönböztetni a genetikai kódnak megfelelő tRNS-t a többitől. Bizonyos aminoacil-tRNS szintetázok eredendően alacsony hibázási

valószínűséggel működnek, míg mások rendelkeznek további szerkesztő funkciókkal, melyekkel a hibásan kapcsolt aminosavak hidrolizálását végzik (Ibba és Söll, 1999). Pro- és eukariótáknál is kimutatták, hogy a hiba javítása az aminosav tRNS-re kapcsolása előtt és után is megtörténhet (Ling és mtsai., 2009).

Az aminosavval töltött tRNS-ek riboszómához szállítását az elongációs faktor-Tu (EF-Tu) végzi. Az aminosav oldallánc minősége és a tRNS váz szerkezete együttesen jelenti a felismerés alapját. Az Ef-Tu képes különbséget tenni egy megfelelő aminoacil-tRNS és egy rossz aminosavval töltött tRNS között. A helyes aminoacil-tRNS-ek hasonló affinitással kötődnek az elongációs faktornak, a hibásak kötődési erőssége között viszont nagyságrendi különbségek mutatkoznak (LaRiviere és mtsai., 2001). Az EF-Tu ezen felismerő képessége a translációs minőségellenőrzés egy újabb szintjét jelenti (Reynolds és mtsai., 2010).

Újabb kutatások azt is kimutatták, hogy az aminosav aktiválástól az aminoacil-tRNS riboszómáig történő szállítását egy nagy komplex végzi, mely mint egy csatorna irányítja a polimerizációhoz szükséges monomereket (Kyriacou és Deutscher, 2008). Ennek a komplexnek talán szerepe lehet a translációs minőségellenőrző folyamatokban, a pontos mechanizmus azonban még nem tisztázott.

A megfelelő aminosavval töltött tRNS-ek riboszómához szállítása után következik az utolsó, a transláció minőségének szempontjából fontos lépés, a megfelelő tRNS riboszómához kötése és az aminosavlánc hosszabbítása. A helyes tRNS-ek kiválasztásának alapja a mRNS kodon:tRNS antikodon bázishármasok klasszikus Watson-Crick féle párosodása. Ilyenkor a riboszóma már nem tudja elkülöníteni, hogy az adott tRNS a neki megfelelő, vagy esetleg hibás aminosavval töltött-e (Reynolds és mtsai., 2010). Ha szabályosan párosodó tRNS érkezik, az hatékonyabban segíti a riboszóma térszerkezet változását, mint egy teljesen eltérő, vagy csak részben megfelelő antikodonú tRNS (Pape és mtsai., 1999). Ez a gyors térszerkezet változás előfeltétele az aminosavlánc hosszabbodásának. Az új peptidkötés kialakulása után a riboszóma rendelkezik még egy utolsó ellenőrző lépéssel. Ha ekkor bizonyosodik be, hogy a párosodási szabályoktól eltérően kapcsolódott az aminoacil-tRNS (ekkor már peptidil-tRNS), az további hibák felhalmozódásához, végül a fehérjelánc szintézisének leállításához és a riboszóma széteséséhez vezet (Zaher és Green, 2009).

Az egyes kodonok átírásakor eltérő valószínűséggel jelentkeznek hibák. A ritkább tRNS-ekhez rendelhető kodonok átírásakor nagyobb a téves aminosavak beépülésének valószínűsége. Ennek hátterében a helyes Watson-Crick párosodású, de ritka, valamint a

nem tökéletesen párosodó, de gyakori tRNS-ek versengése áll (Kramer és Farabaugh, 2007). A kodonok átírási hibarátajának különbsége hatással van a gének kódoló szekvenciájának evolúciójára is. A természetes szelekció a kisebb hibaráttal átíródó kodonokat részesíti előnyben, különösen a fehérjeszerkezet és -működés szempontjából meghatározó láncpozíciókban (Akashi, 1994).

A riboszómák is növelhetik a transláció hatékonyságát, ami azonban költségekkel is jár. *E. coli*-ban a pontosabban működő riboszómákon lassabban és energetikailag költségesebben zajlik a fehérjeszintézis. Ennek oka, hogy a hibásan kötődő aminoacil-tRNS-ek eltávolításához a riboszómának több időre és több energiára van szüksége (Ruusala és mtsai., 1984).

2.8.2. A translációs hibák hatásainak mérséklése

Valószínűtlen, hogy a translációs folyamatok tökéletesen hibamentesen működjenek. Erre azonban nincs is szükség, ha a sejtek életképesség csökkenés nélkül képesek a megjelenő hibák egy részét elviselni. A fehérjeszintézis hibáival szembeni ellenálló képességet translációs robusztusságnak nevezzük (Wilke és Drummond, 2006).

A genetikai kód kiosztásának egyik alapelve a hibás aminosav beépülések káros hatásainak mérséklése. Az egymáshoz jobban hasonló kodonokhoz hasonló fizikokémiai tulajdonságokkal rendelkező aminosavak rendelhetőek. Ennek a mintázatnak köszönhető, hogy ha genetikai mutáció, vagy hibás kodon-antikodon párosodás következtében hibás aminosav épül be, ez kevésbé befolyásolja a képződő fehérje működését és térszerkezetét (Freel és Hurst, 1998; Woese, 1965).

A kodonok eloszlásának is van a translációs robusztusságot befolyásoló vetülete. Ismert, hogy a szinoním kodonok eltérő translációs robusztussággal rendelkeznek. Ez azt jelenti, hogy félreolvasásuk eltérő valószínűséggel jár az eredetitől kémiai értelemben szerkezetileg jelentősen különböző aminosav beépülésével. Így az evolúció a szinoním kodonok közül azokat részesíti előnyben, melyek esetleges félreolvasása kevesebb káros következménnyel jár (Archetti, 2004, 2006).

A translációs robusztusság növelése céljából az evolúció a fehérjék biokémiai sajátosságaira is hatással van. Matematikai modellek azt jelzik, hogy a fehérjék kis mennyiségű translációs hiba mellett is képesek megőrizni a normális működésüket, melyre a növekvő termodinamikai és szerkezeti stabilitás ad lehetőséget (Bloom és mtsai., 2005). A nagyobb mennyiségben kifejeződő fehérjék által felhalmozott hibák a

fokozottabb összecsapódási hajlam miatt súlyosabb következményekkel járnának. Ennek elkerülésére a magasabb expressziójú fehérjék nagyobb transzlációs robusztussággal rendelkeznek, ezáltal csökkentve az összecsapódás valószínűségét (Tartaglia és mtsai., 2007; Vendruscolo és Tartaglia, 2008).

Az evolúció során kifejlődött hiba-tolerancia mechanizmusok hatékonyságát az is mutatja, hogy egyes baktériumok meglepően magas, akár 10%-os transzlációs hibaráttát is képesek elviselni. Ruan és munkatársai *E. coli*-ban vizsgálták a magas transzlációs hibaráttára adott sejtválaszokat. Eredményeik azt mutatták, hogy a hibás fehérjék számának emelkedése a magas hőmérsékleti stresszhez hasonló választ vált ki. A dajkafehérje-rendszer fokozott aktivitása, és a hibás fehérjék lebontása a jelentős energetikai költség mellett is biztosítja a sejtek emelkedett transzlációs hibaráta melletti túlélését (Ruan és mtsai., 2008).

2.9. A genetikai kód

A genetikai kód az a szabályrendszer, mely alapján a sejtek az örökítő anyagukban tárolt információk alapján fehérjéiket létrehozzák. Gyakorlati értelemben a genetikai kód egységei a három bázispárból álló tripletek. Ezeket a bázishármasokat a mRNS-en kodonoknak hívjuk. A mRNS-en a kodonok egymás utáni elrendeződését, mely egy fehérje meghatározásáért felelős, leolvasási keretnek nevezzük. Ahogy halad a riboszóma a leolvasási kereten, úgy fordítódnak át a mRNS kodonjai aminosavakká. A leolvasási keretben a tripletek kihagyás nélkül, közvetlen egymás után következnek. A genetikai kódnak ezt a tulajdonságát vesszőmentességnek nevezzük (Crick és mtsai., 1961).

A három bázis összes lehetséges kombinációja 64 kodont eredményez. Ebből a 64-ből azonban csak 61 kódol aminosavat, a maradék három stop kodon, melyek a fehérjeszintézis lezárásáért felelősek. Az élővilág nagy részében igaz, hogy egy kodon egyértelműen egy aminosavnak feleltethető meg. Ez a genetikai kód egyértelműsége (Osawa és mtsai., 1992). Egy aminosavat azonban több kodon is meghatározhat, hiszen 61 kodonra összesen 20 aminosav jut. A metionin és a triptofán kivételével minden aminosav meghatározásáért több mint egy kód felel. Ez a genetikai kód degeneráltsága. Az egyes kodonok megoszlását az aminosav kódolás tekintetében a genetikai kódtábla szemlélteti (4. ábra).

		Második betű				
		U	C	A	G	
Első betű	U	UUU } Phe	UCU } Ser	UAU } Tyr	UGU } Cys	U
		UUC } Phe	UCC } Ser	UAC } Tyr	UGC } Cys	C
		UUA } Leu	UCA } Ser	UAA Stop	UGA Stop	A
		UUG } Leu	UCG } Ser	UAG Stop	UGG Trp	G
	C	CUU } Leu	CCU } Pro	CAU } His	CGU } Arg	U
		CUC } Leu	CCC } Pro	CAC } His	CGC } Arg	C
		CUA } Leu	CCA } Pro	CAA } Gln	CGA } Arg	A
		CUG } Leu	CCG } Pro	CAG } Gln	CGG } Arg	G
	A	AUU } Ile	ACU } Thr	AAU } Asn	AGU } Ser	U
		AUC } Ile	ACC } Thr	AAC } Asn	AGC } Ser	C
		AUA } Ile	ACA } Thr	AAA } Gly	AGA } Arg	A
		AUG Met	ACG } Thr	AAG } Gly	AGG } Arg	G
	G	GUU } Val	GCU } Ala	GAU } Asp	GGU } Gly	U
		GUC } Val	GCC } Ala	GAC } Asp	GGC } Gly	C
		GUA } Val	GCA } Ala	GAA } Glu	GGA } Gly	A
		GUG } Val	GCG } Ala	GAG } Glu	GGG } Gly	G

4. ábra. A genetikai kódtábla

A genetikai kódtáblából az is látszik, hogy az egy azon aminosavat kódoló kodonok leggyakrabban csak a harmadik bázisban különböznek. Ezt a jelenséget hívjuk „lötyögésnek” (Osawa és mtsai., 1992). Korábban úgy gondolták, hogy a genetikai kód fent említett tulajdonságai az egész élővilág tekintetében érvényesek, azaz a genetikai kód univerzális (Koonin és Novozhilov, 2009). Mára azonban egyértelműen bizonyított, hogy léteznek olyan élőlény csoportok, melyek genetikai kódja eltér ettől az általános mintától (Silva és mtsai., 2007), nem is beszélve a mitokondriális genom saját genetikai kódjáról (Jukes és Osawa, 1990).

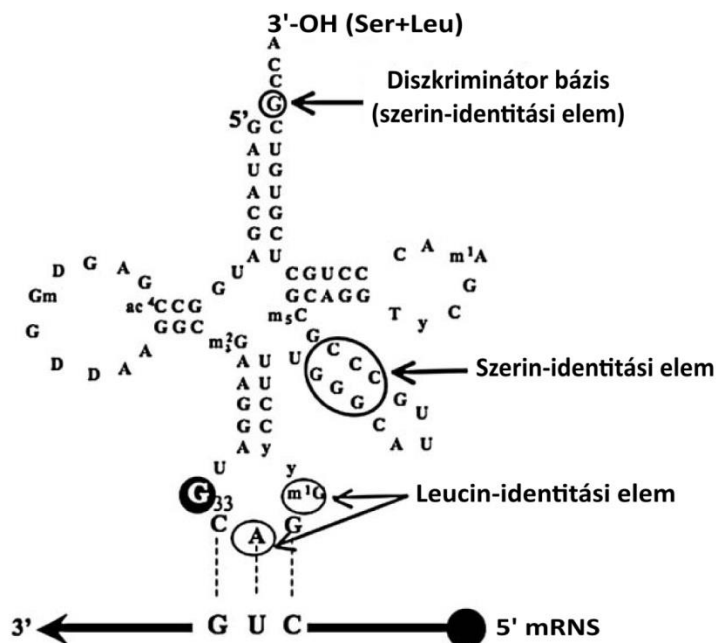
2.10. A CTG klád egyedi genetikai kódja

A genetikai kód egységességét korábban az élő szervezetek egyik jellegzetes tulajdonságának tartották (Crick, 1968). Ezt az állítást azonban az azóta eltelt közel 40 évben több alkalommal megcáfolták már. A prokariótáktól az eukariótákon át a

mitokondriális genomig számos példát találunk az univerzálisnak vélt genetikai kódtól eltérő rendszerekre (Knight és mtsai., 2001).

Egysejtű gombák egy speciális csoportjában is megfigyelhető az „univerzalista” eltérő genetikai kód. Ezeknél az élőlényeknél a CUG kodon leucin helyett szerin kódolására rendeződött át, ezért ezt a csoportot összefoglaló néven CTG kládnak nevezzük. A *Candida* nemzetség legalább 75 tagja és néhány egyéb, közel rokon gombafaj, a *Pichia stipitis*, a *Debaryomyces hansenii* és *Lodderomyces elongisporus* alkotják ezt a kládot (Fitzpatrick és mtsai., 2006; Sugita és Nakase, 1999). *Candida albicans* és sok egyéb gomba esetén ez az átrendeződés nem zajlott le teljesen, a CUG kodonok 97% körüli valószínűséggel határoznak meg szerint, a maradék 3% esetében még leucin beépítések történnek (Suzuki és mtsai., 1997). Erre a kettős kódolásra egy újonnan megjelenő tRNS_{CAG} nyújt lehetőséget. Ez a tRNS szerinnel vagy leucinnal egyaránt töltődhet, az így létrejövő szerin-tRNS_{CAG} és leucin-tRNS_{CAG} molekulák pedig versengenek a riboszómák A-helyein lévő CUG kodonokért (Gomes és mtsai., 2007). A translációs minőségellenőrző folyamatok sem az aminosavval töltés, sem a lánchosszabbítás folyamatába nem szólnak bele, ezáltal biztosított a valódi kettős kódolás jelensége (Santos és mtsai., 1997).

A fent említett tRNS azért is különleges, mert a leucil-tRNS szintetáz és a szeril-tRNS szintetáz enzimek felismerő helyeit egyaránt magán hordozza. Antikodon karja a leucil-tRNS-ekre jellemző, aminosav karja és variábilis hurka pedig a szeril-tRNS-ekhez teszi hasonlatossá (Santos és mtsai., 2011 és 5. ábra).

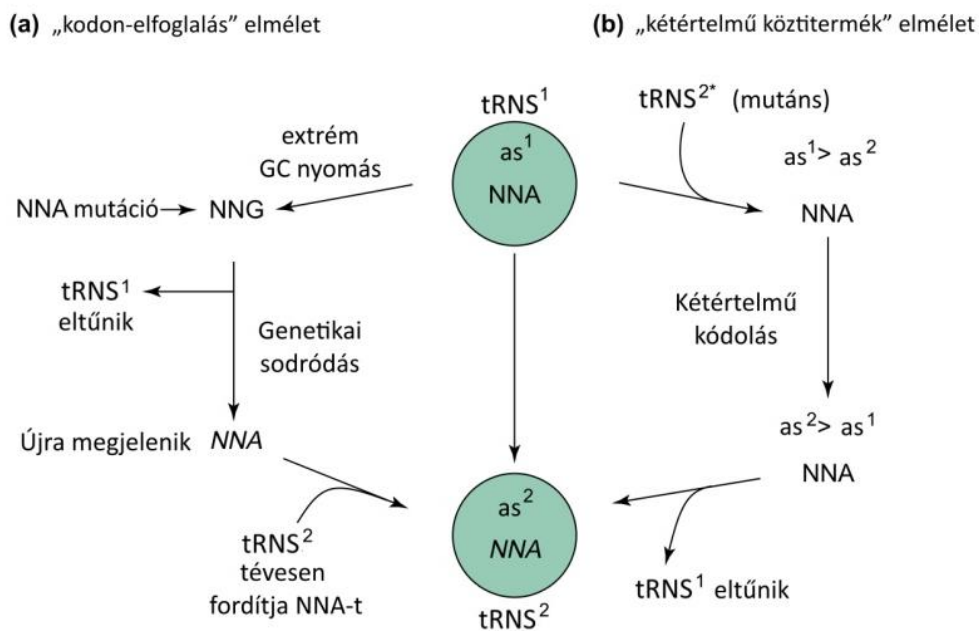


5. ábra. A *Candida albicans* tRNA_{CAG}^{Szerin} molekula. A *Candida albicans* tRNA_{CAG}^{Szerin} kettős tulajdonságú, a leucil-tRNA szintetáz és a szeril-tRNA szintetáz enzimek felismerő helyeit egyaránt tartalmazza (ábra: Santos és mtsai, 2011 alapján).

2.11. Evolúciós elméletek a kodon átrendeződésre

Ahogy újabb és újabb egyedi genetikai kódolási rendszerek létezésére derül fény, úgy fokozódik az érdeklődés e változatosság kialakításában szerepet játszó molekuláris és evolúciós mechanizmusok iránt. Azt, hogy hogyan kaphat egy kodon új, az eddigétől eltérő értelmet, két egymással szemben álló evolúciós elmélet igyekszik magyarázni; a „kodon-elfoglalás” (codon-capture) (Osawa és Jukes, 1989) és a „kétértelmű köztitermék” (ambiguous intermedier) (Schultz és Yarus, 1994) elmélete.

A „kodon-elfoglalás” teória (6a ábra) alapja, hogy a genom bázisösszetételének megváltozása a genetikai kód megváltozásával is jár. Egy szélsőségesen egyenetlen guanin-citozin (GC) – adenin-timin (AT) eloszlású genomból genetikai sodródás során akár el is veszhetnek ritka bázisokból felépülő kodonok. Később az elveszett kodonok újra megjelenhetnek, és új értelmet kaphatnak. A őket „elfoglaló” tRNA minőségétől függ, hogy melyik aminosavat fogják az új kódolás értelmében meghatározni. A ritka kodonok elvesztése majd megjelenése neutrális folyamat, melynek előnye, hogy az átrendeződés nem jár hibás fehérjék felhalmozódásával (Santos és mtsai., 2004).



6. ábra. A kodon átrendeződés evolúciós elméletei (ábra: Santos és mtsai, 2004 alapján)

A „kétértelmű köztitermék” elmélet (6b ábra) szerint egyes kodonok értelmezése az eddig meglévő aminosav mellett egy újabb kódolására is kiterjedhet. Ezt az teszi lehetővé, hogy egy, eredetileg nem megfelelő tRNA mutációk révén szintén képessé válik a kodon felismerésére, így az eredetileg megfelelő tRNA mellett az új, mutáns tRNA is hozhat aminosavat a kérdéses láncpozíciókba. A mutáns tRNA a továbbiakban fokozatosan kiszorítja az eredeti tRNA-t a kódolásból, így változtatva meg az adott kodon értelmét. Az átrendeződés folyamata nem tekinthető neutrálisnak, hiszen a kétértelmű kódolási állapotban a fehérjék aminosav sorrendje változik, mely kihathat a működésükre is (Schultz és Yarus, 1994).

A CTG klád tagjainál megfigyelhető leucin–szerin átrendeződés valószínűsíthetően a két mechanizmus kombinációjával valósult meg. A Candidák jelenlegi CUG kodonjai korábban szerint, vagy hozzá kémiai hasoló aminosavat meghatározó kodonokból alakultak ki (Massey és mtsai., 2003), az eredeti leucin pozícióban lévő CUG kodonok eközben pedig elvesztek a genomból. A sajátos, kettős kódolási helyzetet egy mutáns szerin-tRNA_{CUG} megjelenése teremtette, ezáltal a CUG kodonok felismerésére az eredeti leucin-tRNA_{CUG} mellett az új tRNA is képessé vált (Santos és mtsai., 2011).

A mai napig nem tisztázott, hogy a CUG kodonok átrendeződése mögött milyen folyamatok állnak. Összehasonlító genomi vizsgálatok valószínűsítik, hogy a leucint

kódoló CUG kodonok fokozatos eltűnése az újonnan megjelenő, szerin-tRNS_{CUG} elterjedésével párhuzamosan mehetett végbe (Massey és mtsai., 2003).

2.12. A pékélesztő mint ideális modellszervezet

A pékélesztő, azaz *Saccharomyces cerevisiae* már évszázadok óta fontos szerepet tölt be az emberi gasztronómiában; nélküle nem készülhetne kenyér. A sütőiparban betöltött gyakorlati jelentősége mellett azonban mára már a tudományos kutatások első számú eukarióta modellszervezetévé vált. 1996-ban a *S. cerevisiae* volt az első eukarióta sejt, melynek teljes genetikai kódját sikerült megfejteni (Goffeau és mtsai., 1996). Nem sokkal ezt követően egy nemzetközi tudományos összefogás keretében létrehozták az egyszeres gén-deléciós haploid élesztő kollekción, melyben a fehérje kódoló gének nagy részét sikerült egy antibiotikum rezisztencia kazettával helyettesíteni (Giaever és Nislow, 2014). Azóta további mutáns könyvtárak is készültek (többek között: Cao és Yan, 2013; Ho és mtsai., 2009; Huh és mtsai., 2003), melyek használata hozzásegít az élesztő fehérjék működésének megismeréséhez és a sejtekben zajló molekuláris folyamatok összefüggéseinek feltárásához. Az élesztő kutatások során összegyűjtött információkat egy központi adatbázisba, a *Saccharomyces* Genome Database-be (SGD; <http://www.yeastgenome.org/>) gyűjtik, így mindenki számára elérhetővé válnak (Cherry és mtsai., 1998).

Az örökítő anyagról, fehérjékről, életfolyamatokról, stb. rendelkezésre álló nagy mennyiségű információ mellett más érvek is az élesztő használata mellett szólnak. Az élesztő laboratóriumi körülmények között könnyen fenntartható, gyorsan szaporodik, és genetikailag is könnyen manipulálható, ezek a tulajdonságok teszik ideális modell szervezetté.

A pékélesztőt a kísérleti evolúcióbiológia kedvelt modellszervezetei között is megtaláljuk. Az élesztőkkel végzett laboratóriumi evolúciós vizsgálatok a gombák gyors szaporodását és környezethez való alkalmazkodó képességét használják ki. A genom szekvencia pontos ismerete pedig lehetőséget biztosít az evolúciós folyamatok alatt bekövetkező genetikai változások nyomon követésére (Botstein és Fink, 2011).

2.13. Kétértelmű aminosav kódolási rendszer kialakítása pékélesztőben

Az „univerzális” genetikai kódtól eltérő rendszerek felfedezése óta foglalkoztatja a kutatókat az a jelenség, hogy a proteómra gyakorolt végzetes hatások nélkül hogyan változhat meg bizonyos kodonok értelmezése.

Santos és munkatársai a CUG kodonok leucinről szerinre történő átkódolásának folyamatát, illetve annak hatásait vizsgálják. Ennek tanulmányozására a *Candida albicans*-ban megtalálható és a CUG kodonok szerinné fordításáért felelős tRNS_{CAG}^{szerin}-t fejeztették ki a közeli rokon *Saccharomyces cerevisiae*-ben. Ezáltal a pékélesztő sejtek a saját, CUG-t leucinre fordító tRNS-eik mellett szerin identitású tRNS-eket is tartalmaznak. A módosított pékélesztőben a két különböző identitású tRNS egymással verseng a CUG kodonokért, így a *Candida* törzsfajlódása során kialakult kétértelmű kódolási állapotot hoztak létre (Silva és mtsai., 2007).

Candida albicans-ban a fehérje kódoló gének 67%-a tartalmaz legalább egy CUG kodont (Gomes és mtsai., 2007). *Saccharomyces cerevisiae*-ben ez a szám magasabb, itt a fehérje kódoló gének 89%-a érintett (Rocha és mtsai., 2011). Ez a két számadat önmagában még nem mond sokat, azonban a két faj CUG-t tartalmazó orthológ génpárjainak összehasonlítása egy fontos különbségre hívja fel a figyelmet. *C. albicans*-ban a CUG kodonok 90%-a nem konzervált genomi régiókban található, ahol a két aminosav véletlenszerű beépülése nem okoz lényeges változást a fehérjék térszerkezetében és működésében. Háromdimenziós fehérje térszerkezeti modellek vizsgálata azt is megállapította, hogy a CUG pozíciókban található aminosavak inkább a fehérjék felületén, vagy köztes állapotokban találhatóak. Ezzel szemben *S. cerevisiae*-ben a vizsgált orthológ gének CUG kodonjai 22%-ban konzervált, és 27%-ban részlegesen konzervált régiókban találhatóak, ahol fokozott jelentőséggel bír, hogy a hidrofób leucin, vagy a poláros szerin épül-e a fehérjeláncokba. Térszerkezeti modellek alapján a pékélesztőben a CUG kodonok által meghatározott aminosavak több mint 60%-a a fehérjék belsejében helyezkedik el (Rocha és mtsai., 2011).

A CUG kodonok eloszlásában megfigyelhető jelentős különbségek arra engednek következtetni, hogy a két faj között jelentős különbségek lehetnek a hibás aminosav beépülések életképességre gyakorolt hatását tekintve. *Candida*-ban a kétértelmű kódolás hatásainak mérséklésére a CUG kodonok megfelelő eloszlását a szelekciós nyomások évmilliók alatt alakították ki. Pékélesztőben a kodon eloszlást más erők formálták, így

egy mesterségesen létrehozott kétértelmű kódolási rendszer a fehérjék térszerkezetének és működésének befolyásolásával jelentős életképesség csökkentő hatással bírhat.

2.14. Az evolúciós alkalmazkodás elméleti modelljei

Evolúciós alkalmazkodásnak (adaptációnak) azt a folyamatot nevezzük, mely során egy populáció összetétele egy olyan fenotípus felé mozog, amely a környezetnek jobban megfelel. Az adaptáció a természetes szelekció révén valósul meg, biztosítva annak lehetőségét, hogy a rátermettebb egyedek terjedjenek el a populációban (Fisher, 1930). Azonban a természetes szelekció nem mindig jelent egyúttal adaptációt is. Az egyes önző genetikai elemek (transzpozonok) populáción belüli elterjedése is természetes szelekció eredménye, azonban ezt nem tekinthetjük adaptációnak, hiszen jelenlétük általában nem biztosít rátermettségbeli előnyt a hordozó egyed számára (Hurst, 1992).

Egy jelleget akkor tekinthetünk adaptáltnak, ha az az egyednek adott környezetben, vagy környezetek összességében maximális rátermettséget biztosít (Fisher, 1930). A 19. században Charles Darwin is az adaptív jellegek megfigyelésén keresztül fogalmazta meg evolúciós elméletét „A fajok eredete” című munkájában (Darwin, 1859). Bár akkoriban a tudomány még nem ismerte az öröklődés törvényszerűségeit, mégis Darwinnak tulajdoníthatjuk az első genetikai alapokkal rendelkező adaptációs elméletet. Darwin gradualista elmélete szerint az evolúció nagyon kis lépésekben történik. Az adaptáció egymást követő kis variációk sokaságán keresztül zajlik, és sosem eredményez hirtelen nagy változásokat (Darwin, 1859).

2.14.1. Az alkalmazkodás geometriai modellje

Ronald Fisher 1930-ban publikálta az evolúció geometriai modelljét, mely a darwini gradualista elmélet megerősítését is jelentette. Fisher modelljében már jelen vannak a mendeli öröklődés szabályai. A modell szerint egy egyed a környezetéhez mutációkon keresztül alkalmazkodik. A véletlenszerűen megjelenő mutációk közül azok, melyek közelebb viszik az egyed fenotípusát az adott szituáció optimumához (adaptív mutációk), a természetes szelekció révén terjednek el a populációban. Az adaptív mutációk azonban nem egyforma mértékben járulnak hozzá a fenotípus optimum eléréséhez – vannak kis és nagy hatású mutációk. A modell szerint a kis fenotípus

hatású mutációk megjelenési esélye sokkal nagyobb, mint a nagy fenotípus hatásúaké. Feltételezve, hogy a mutációk megjelenése véletlenszerű, és a nagy hatású mutációk megjelenési valószínűsége elég kicsi, a geometriai modell jóslata szerint az alkalmazkodás kis változásokon keresztül megy végbe (Fisher, 1930).

A geometriai modell egy fontos tényezőt figyelmen kívül hagy az adaptív mutációk elterjedésével kapcsolatban. Erre a hiányosságra a megjelenése utáni majd fél évszázaddal Motoo Kimura hívta fel a figyelmet. Kimura a genetikai sodródás szemszögéből vizsgálta Fisher geometriai modelljét. Rámutatott, hogy bár a kis hatású mutációknak nagyobb az esélyük, hogy növeljék egy egyed rátermettségét, éppen ezek a mutációk azok, melyek egy véges méretű populációból a legnagyobb eséllyel vesznek el. Ennek értelmében így a kis hatású mutációk kisebb valószínűséggel is fixálódnak egy populációban. A nagy hatású mutációk ezzel ellentétben, bár kis mértékben járulnak hozzá a rátermettség növeléséhez, mégis kisebb a valószínűsége, hogy a genetikai sodródás által elveszenek a populációból. Ezek alapján Kimura arra következtetett, hogy a legfontosabb szerepe a közepes hatású mutációknak van az adaptáció folyamatában (Kimura, 1983).

Fisher és Kimura megállapításai egy bizonyos adaptív mutáció hatásának mértékéről és fixálódásáról szóltak. Valójában azonban az adaptáció során több előnyös mutáció is fixálódhat a populációban. A 90-es évek végén elméleti modellek és számítógépes szimulációk segítségével arra következtettek, hogy az egymás után fixálódó mutációk hatásai exponenciális görbe mentén csökkennek. Ez azt jelenti, hogy az első fixálódó mutáció viszonylag nagy hatású, majd ezt későbbi kisebb hatású mutációk fixálódása követi. Ezzel a kezdeti nagy hatású mutáció szerepét a későbbiekben kisebb hatású mutációk veszik át, ún. „finomhangolva” a rendszert (Orr, 1998, 1999; Barton és Keightley, 2002).

2.14.2. Az alkalmazkodás DNS szekvencia alapú modelljei

Fisher geometriai modellje figyelembe veszi ugyan a mutációk mendeli öröklődését, az öröklődés molekuláris alapjait azonban nem. A DNS, mint örökítő anyag lineáris molekula, mely nukleotidok egymás utáni sorrendjével fejezik ki lineáris aminosav sorrendjét határozza meg. Mind a nukleotid sorrendnek, mind az aminosav sorrendnek véges számú változata lehet, ennek értelmében tehát a szekvencia tér, amin belül a

mutációk bekövetkezhetnek, jól körülhatárolt (Maynard Smith, 1970). Az alkalmazkodás ilyen tekintetben tehát limitált keretek között valósulhat meg.

A szekvencia modellek megszületése felé vezető úton fontos állomás volt a fitness tájkép koncepciójának megszületése, mely Sewall Wright nevéhez köthető. Wright még nem DNS vagy aminosav szekvenciákról írt, hanem génkombinációk hálózatáról. A fitness tájképen az egyes génkombinációk egymástól egy mutációs távolságra vannak. A különböző kombinációkhoz különböző rátermettségi értékek rendelhetők, a magas fitness értékek a tájkép csúcsain helyezkednek el. Az alkalmazkodás folyamatát elképzelhetjük úgy, hogy a génkombinációk változásával az organizmus egy magasabb rátermettségi szintet ér el, gyakorlatilag a fitness tájkép csúcsára „mászik” (Wright, 1932).

Az első valódi szekvencia alapú alkalmazkodási modellt John Maynard Smith dolgozta ki. Maynard Smith a véges szekvencia tere tovább egyszerűsíti modelljében. Feltételezi, hogy az evolúció során a többszörös mutációk megjelenési aránya elhanyagolható, ha a mutációs ráta elég alacsony és a szelekciós nyomás pedig nagy (Maynard Smith, 1970).

Maynard Smith az alkalmazkodást egy ún. „adaptív sétaként” írta le. Eszerint a populáció az általa egy mutációval elérhető szekvencia térben mindig arra a pontra mozdul tovább, amelynek a vad típusnál nagyobb a rátermettsége. A szekvencia tér elemei (fehérjék és DNS molekulák egyaránt) ezáltal egy olyan, felesleges köztes állapotoktól mentes hálózatot alkotnak, melyben az elemek egymást követő egyedi mutációkkal összeköthetők (Maynard Smith, 1970).

A 80-as években Kaufmann és Levin matematikai paraméterek alkalmazásával finomították a Wright által már lényegében leírt fitness tájképet. Az általuk alkalmazott modellekben a fitness tájkép egyes pozíciói már nem génkombinációkat, hanem adott DNS szekvencia variánsokat jelentettek. A fitness tájképek csúcsainak száma („rögössége”) a modell két matematikai paraméterének változtatásával befolyásolható (Kauffman és Levin, 1987).

A mai napig vitatott, hogy milyen rátermettségi értékeket rendelhetünk a DNS szekvencia modellekben ismertett fitness tájképek egyes pontjaihoz. A kérdést Gillespie a valószínűségszámítás elveivel próbálta megválaszolni. Vizsgálatai során arra jutott, hogy az adaptáció gyakran egy viszonylag magas fitnessű vad típusú szekvenciáról indul. Az ezt körülvevő mutációs térben a pontok nagy része pedig a vad típusnál rosszabb rátermettséggel rendelkezik, és csak nagyon kevés az olyan mutációs

esemény, mely a rátermettséget tovább emeli. Ahogy halad a populáció a fitness csúcs felé, annál kisebb az adaptív mutációk gyakorisága, és egyre kisebb mértékű fitness növekmény érhető el. Mivel a szekvencia tér diszkrét, és csak véges számú mutáció végbemenetele lehetséges, így könnyen elképzelhető, hogy a populáció egy olyan helyi rátermettségi csúcsot ér el, melyről bármilyen elmozdulás a fitness romlásával járna (Gillespie, 1984).

3. Célkitűzések

A translációs hibák sejtkárosító hatásainak széles spektruma ismert; egyes fehérjék funkció-vesztése, a rossz térszerkezet következményeként megjelenő toxikus fehérje-aggregátumok, vagy akár a minőségellenőrző és/vagy lebontó rendszerek telítődése is negatívan befolyásolhatja az életképességet. Bár az okozott károk sokfélék lehetnek, a sejtek képesek tompítani azok életképességre illetve rátermettségre gyakorolt hatásait.

Munkánk célja volt hogy felderítsük, melyek azok az alapelvek, melyek mentén a sejtek képesek alkalmazkodni a translációs hibák okozta káros hatásokhoz. Kérdéseink megválaszolásához a translációs hibák egy speciális fajtájának, a kétértelmű aminosav kódolásnak pékélesztő sejtekre gyakorolt hatásait elemeztük.

Vizsgálataink során az evolúcióbiológia, a biokémia, és funkcionális genomika eszközeit ötvözve a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. *Saccharomyces cerevisiae* sejtekben laboratóriumi evolúció során mérsékelhető-e a mesterségesen megemelt translációs hibaráta okozta rátermettség csökkenés?
2. A translációs hibák okozta rátermettség csökkenés hátterében milyen okok állhatnak?
3. Milyen genetikai és sejtélettani változások teszik lehetővé az emelkedett translációs hibarátával szembeni alkalmazkodást?
4. Az emelkedett translációs hibarátával szembeni alkalmazkodással párhuzamosan milyen evolúciós mellékhatások azonosíthatóak?

4. Anyagok és módszerek

4.1. Felhasznált törzsek és plazmidok

A modellszervezet előállításához diploid *Saccharomyces cerevisiae* (his3 Δ 1/his3 Δ 1; leu2 Δ 0/ leu2 Δ 0; lys2 Δ 0/ lys2 Δ 0; ura3 Δ 0/ ura3 Δ 0) genetikai háttérű törzset használtunk.

A munka során felhasznált plazmidokat a következő táblázat mutatja be:

Név	Fontosabb jellemzők	Felhasználás	Hivatkozás
pUKC715	G33tRNS _{CAG} ^{szerin} gén szelekciós marker: LEU2	Transzlációs hibaráta megemlése	Santos és mtsai, 1996.
pRS315	szelekciós marker: LEU2	Kontroll plazmid	Santos és mtsai, 1996.
pUKC815	PGK1 gén promóter régió, E. coli lacZ gén, szelekciós marker: URA3	Transzlációs hibaráta mérése	Stansfield és mtsai, 1998
pGAL-VHL- mCherry (CHFP)	Galaktóz indukálható promóter, VHL-mCherry riporter gén szelekciós marker: URA3	Fehérje aggregációs ráta mérése	Kaganovich és mtsai, 2008.
pRS316	natív promóter, RPL25- GFP riporter gén szelekciós marker: URA3	Ribofágia mértékének meghatározása	Kraft és mtsai, 2008.

4.2. Alkalmazott táptalajok és tápoldatok

SC-leucin (1 liter)	1,7 g élesztő nitrogén bázis (ammónium szulfát és aminosav nélkül) 5 g ammónium szulfát 100 ml 20%-os glükóz oldat 100 ml aminosav keverék (20 g/l) 1 ml hisztidin (10mg/ml törzsoldatból) 1 ml metionin (10mg/ml törzsoldatból) 5ml uracil (2 mg/ml törzsoldatból) 800 ml bidesztillált víz
YPD agar (1 liter)	20 g pepton 10 g élesztő kivonat 20 g agar 100 ml 20%-os glükóz oldat 900 ml bidesztillált víz

A tápoldatokat autoklávozással sterilizáltuk, ezt követően kevertük bele a glükóz oldatot, illetve szükség szerint az aminosavakat.

Aminosav keverék összetevők (20g/l)

Adenin	7.5 g
Para-amino-benzoésav	0.5 g
Inozitol	5 g
Alanin	5 g
Arginin	5 g
Aszparagin	5 g
Aszparaginsav	5 g
Cisztein	5 g
Fenilalanin	5 g
Glutaminsav	5 g
Glutamin	5 g
Glicin	5 g
Izoleucin	5 g
Lizin	5 g
Prolin	5 g
Szerin	5 g
Threonin	5 g
Tirozin	5 g
Triptofán	5 g
Valin	5 g

4.3. Felhasznált módszerek

4.3.1. Modellszerkezet előállítás

A vizsgálatainkhoz diploid *Saccharomyces cerevisiae* (his3 Δ 1/his3 Δ 1; leu2 Δ 0/ leu2 Δ 0; lys2 Δ 0/ lys2 Δ 0; ura3 Δ 0/ ura3 Δ 0) laboratóriumi törzset használtunk. A transzlációs hibaráta megemeléséhez a *Candida albicans* G33tRNS_{CAG}^{szerin} gént egyszeres kópiájú plazmidon transzformáltuk az élesztő sejtekbe. Ehhez a korábban Santos és munkatársai által létrehozott pUKC715 plazmidot használtuk, melyet a *C. albicans* G33tRNS_{CAG}^{szerin} gén LEU2 plazmidra klónozásával készítették el (Santos és mtsai., 1996).

A kontroll törzset az egyszeres kópiájú pRS315 plazmid (üres vektor) alaptörzsbe transzformálásával hoztuk létre.

Az élesztő sejtek transzformálását magas hatékonyságú lítium-acetátot és egyszálú DNS-t használó módszerrel végeztük (Gietz és Schiestl, 2007). A transzformálni kívánt törzseket egy éjszaka alatt 30 C°-on 200 rpm-es rázatás mellett 10 ml tápoldatban felszaporítottunk, a felnőtt kultúrákat másnap reggel OD=0,4 (OD600) denzitásra visszahígítottuk, és körülbelül 3 órát, egy osztódásnyi időt vártunk. Ezt követően a sejteket 5 perc 3000 x g centrifugálással üleptítettük, majd a kultúrákat előbb 25 ml steril vízzel, majd 0,1 M lítium-acetáttal mostuk. Mosás után a sejt pelletet transzformálásonként 360 μ l transzformáló mixben szuszpendáltuk fel.

Élesztő transzformáló mix:

Polietylén glikol (PEG, 50 m/V %)	240 μ l
Lítium-acetát 1 M (LiAc)	36 μ l
Egyszálúsított* carrier DNS (lazac spermából izolált, 2 mg/ml)	50 μ l
Plazmid (200ng) +steril bidesztillált víz	34 μ l

*=A transzformáló mix elkészítéséhez a lazac spermából izolált DNS-t 5 percig 100 C°-on forralással egyszálúsítottuk, majd jégen hűtöttük.

A transzformáló mix-szel elkevert sejteket egy 30 perces 30 C°-os elő-inkubációt követően, 40 percig 42 C°-on hősokkoltuk. A hősokkot követően a sejteket

centrifugálással összegyűjtöttük, a transzformáló mixet pipettázással eltávolítottuk, a pelletet steril vízben szuszpendáltuk, és a sejteket szelekciós táptalajra szélesztettük.

4.3.2. Laboratóriumi evolúció

A laboratóriumi evolúciót SC tápoldatban végeztük leucin hozzáadása nélkül. A leucin kihagyásával szelekciós nyomást gyakoroltunk a plazmid fenntartására, mindemellett azonban minimalizáltuk a populációkra ható külső stressz mértékét. Egyedi kolóniából 11 tRNS_{CAG}^{szerin}-t expresszáló kultúrát indítottunk el 100 µl folyadék tápoldatban, ehhez 96 lyukú lemezt használtuk (Greiner). A kultúrákat 30 C°-on 200 rpm rázási sebesség mellett növesztettük. A fenti módszerrel további 11 vad típusú populációt is létrehoztunk, melyek a kontrollként használt üres vektort hordozták. A vad típusú populációkat a tRNS_{CAG}^{szerin}-t expresszáló populációkkal közös 96 lyukú lemezen helyeztük el, ezzel az evolúció teljes időtartama alatt azonos növesztési körülményeket biztosítottunk a vizsgált kultúráknak. A kísérlet időtartama alatt minden második napon a stacioner fázisú kultúrák 1%-át friss tápoldatba oltottuk át. Az átoltásokhoz VP407 típusú kézi átoltót (V&P Scientific, Inc.) használtunk. A laboratóriumi evolúciót 72 napig végeztük, ezalatt közel 250 élesztő generáció jött létre.

4.3.3. Rátermettség mérés

A rátermettség (fitnesz) mérését egy hiteles, élesztő populációk rátermettségének meghatározására alkalmas módszer segítségével végeztük (Warringer és Blomberg, 2003; Warringer és mtsai., 2003). Az ősi vonalak fitneszét 10, az evolált vonalakét pedig 20 technikai ismétlésben mértük. A populációk növekedési görbáját egy 48 órás növesztési szakasz alatt automata lemez-leolvasó műszerrel (Biotek Powerwave XS2) követtük nyomon. A leolvasáshoz a populációkat 384 lyukú lemezben (Corning) szelekciós tápoldatban növesztettük. A mérési periódus alatt a populációk optikai denzitását minden 4,5 percben 600 nm-en (OD600) a műszer leolvasta, két leolvasási pont között a lemezeket 30 C°-on váltakozó rázási paraméterek mellett (1000-1200 rpm) inkubáltuk. A populációk növekedési rátáját matematikai módszer segítségével határoztuk meg (Szamecz és mtsai., 2014). A mért növekedési ráta értékeket használtuk az ősi és evolált populációk fitneszének számszerűsítésére.

4.3.4. Fehérjeszintézis gátló szerekkel szembeni érzékenység mérése

Az ősi és evolvált populációk fehérjeszintézis gátló szerrel szembeni érzékenységét folyadék kultúrában (SC-leucin) cikloheximid jelenlétében vizsgáltuk. A cikloheximid az egyik leggyakoribb laboratóriumi fehérjeszintézis gátló szer (Schneider-Poetsch és mtsai., 2010). A riboszóma transzlokáció akadályozásán keresztül a transláció elongációs szakaszát gátolja (Obrig és mtsai., 1971). A tápoldathoz a minimális gátló koncentrációt (MIC) el nem érő mennyiségben, 0,06 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban cikloheximidet adtunk. A populációk növekedési rátáját a már említett módon, optikai denzitás mérésen alapuló módszerrel határoztuk meg. Az ősi és evolvált vonalak cikloheximid érzékenységét a mért növekedési ráták alapján határoztuk meg.

4.3.5. A rátermettség mérése éhezési körülmények között

A szénforrás limitáció rátermettségre gyakorolt hatásának vizsgálatához az ősi és evolvált populációkat 1% glükózzal kiegészített SC-leucin tápoldatban növesztettük (a normál 2% helyett). A populációk növekedési rátáját a már említett módon, optikai denzitás mérésen alapuló módszerrel határoztuk meg, a rátermettség számszerűsítésére a mért növekedési ráta értékeket használtuk.

Az aminosav limitáció rátermettségre gyakorolt hatásának vizsgálatához az ősi és evolvált populációkat 0,25% aminosav keverékkel kiegészített SC-leucin tápoldatban növesztettük (a normál 2% helyett). A populációk növekedési rátáját és a rátermettséget az előbbiekkal megegyezően határoztuk meg.

4.3.6. Plazmid csere

Annak érdekében, hogy az evolúció során megjelenő mutációk hatásait közvetlenül vizsgálhassuk, a $\text{tRNS}_{\text{CAG}}^{\text{szerin}}$ -t hordozó plazmidot üres vektorra cseréltük az evolvált vonalakban. Ehhez először a vonalakat gazdag táptalajon (YPD) növesztve lehetőséget biztosítottunk a plazmid elvesztésére, ezt követően pedig szelektív SC-leucin táptalajon ellenőriztük, hogy valóban megtörtént-e a plazmid veszteség. Miután mind a 11 esetben igazoltuk a $\text{tRNS}_{\text{CAG}}^{\text{szerin}}$ -t hordozó plazmid elvesztését, az evolvált vonalakba az üres vektort jutattuk be a korábban leírt transzformálási módszerrel.

4.3.7. A fehérje aggregációs ráta mérése

A fehérje aggregációs ráta mérését egy, a szakirodalomban jól dokumentált fluoreszcens riporter rendszer (Kaganovich és mtsai., 2008) segítségével végeztük. A módszer egy vörös fluoreszcens fehérjével (mCherry) összekapcsolt humán fehérje, a von Hippel–Lindau protein (VHL) aggregációját vizsgálja. Ez a fehérje hajlamos rossz térszerkezetet felvenni az elongin BC nevű kofaktora nélkül. Annak ellenére, hogy ez a kofaktor nincs jelen a pékélesztőben, a jól működő minőségellenőrző folyamatok képesek meggátolni a VHL aggregációját, így a fúziós protein a sejben egyenletesen oszlik el, azaz az mCherry fluoreszcens jel eloszlása a citoplazmában egyenletes lesz. Ha azonban megnő a hibás fehérjék mennyisége a sejtekben, a minőségellenőrző rendszerek fokozott terhelés alá kerülnek, ez pedig a riporter fehérje aggregációjához vezet, a fluoreszcens jel sérülése nélkül. Ilyen esetben az aggregálódott humán fehérjék elhelyezkedését a sejten belül a vörös jel fókuszált pontba történő átalakulásával tudjuk detektálni.

Vad típusú, ősi és evolált $\text{tRNS}_{\text{CAG}}^{\text{szerin}}$ -t expresszáló vonalakba transzformált pGAL-VHL-mCherry (CHFP) plazmidról leucin- és uracil-mentes SC tápoldatban 2% galaktózzal indukáltuk a fúziós riporter fehérje expresszióját, 2% raffinózzban történő előnövesztést követően. A sejteket PerkinElmer Operetta® High Content fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. Megszámoltuk, hogy hány sejt expresszálja a VHL-mCherry-t, és hány sejtben figyelhető meg a riporter fehérje aggregációja. A fehérje aggregációs ráta meghatározásához az aggregált VHL-mCherry-t tartalmazó sejtek számát elosztottuk a teljes, VHL-mCherry-t expresszáló sejtszámmal.

4.3.8. A translációs hibaráta mérése

A translációs hibaráta mértékét az ősi és evolált vonalakban β -galaktozidáz enzim aktivitás méréssel határoztuk meg (Paredes és mtsai., 2012). Vizsgált törzsenként 9 technikai ismétlést végeztünk. Az *Escherichia coli* LacZ génjének 54 CUG kodon pozíciójába random módon szerinek vagy leucinok épülnek, ezzel pedig számos különböző aminosav szekvenciájú β -galaktozidáz enzim molekula jön létre, melyek stabilitása hő sokk kezelés alkalmazásával mérhető.

A translációs hibaráta méréshez üres vektort hordozó illetve $\text{tRNS}_{\text{CAG}}^{\text{szerin}}$ -t expresszáló sejteket transzformáltunk pUKC815 plazmiddal. Ezen a vektoron az *E. coli*

β -galaktozidáz kódoló lacZ génje található az élesztő foszfoglicerát-kináz (PGK1 (S000000605)) gén promóter régiójával és N-terminális 33 aminosavnyi génszakaszával fuzionáltatva (Stansfield és mtsai., 1998). A két különböző vektort hordozó sejteket leucin- és uracil mentes SC tápoldatban szelektáltuk. Az ősi és evolvált vonalak exponenciális kultúráiból centrifugálással ülepített $2,5 \times 10^6$ sejtet a tápoldatból desztillát vízzel kimosva, 800 μ l Z-puffer, 20 μ l of 0.1% SDS és 50 μ l kloroform elegyében szuszpendáltuk fel. Ezt követően a mintákat 30 másodpercig vortexeltük, és 3-3 részre osztva 10 percig 47 °C-os vízfürdőben inkubáltuk. A β -galaktozidáz denaturációját követően a mintákat 30 másodpercig jégen renaturáltuk. Ezt követően a megmaradt β -galaktozidáz aktivitást határoztuk meg. Ehhez a 200 μ l térfogatú mintákat, 4 mg/mL o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid (ONPG, Sigma-Aldrich) szubsztrát hozzáadásával 37 °C-on 5 percig inkubáltuk. A reakciót 400 μ l 1M Na₂CO₃ hozzáadásával állítottuk le. A β -galaktozidáz aktivitást az enzim reakció mértékével arányos o-nitrofenol mennyiség 420 nm-en történő mérésével és a vonalakban termelődő teljes β -galaktozidáz fehérje mennyiségre normalizálással határoztuk meg.

4.3.9. A β -galaktozidáz expresszió meghatározása (Western blottal)

Annak érdekében, hogy az egyes vonalak eltérő β -galaktozidáz fehérje szintjére kontrollálni tudjunk, az említett enzim fehérje mennyiségét Western blot segítségével határoztuk meg. Az ősi és evolvált vonalakból teljes fehérjetartalmat izoláltunk, és a mintákat redukáló körülmények között, 10% SDS-PAGE-en futtattuk meg, majd nitrocellulóz membránra (Hybond ECL, Amersham) blottoltuk át. A β -galaktozidáz fehérjét anti β -gal IgG elsődleges ellenanyaggal (Invitrogen) 1:5,000 hígításban kötöttük. Az elsődleges ellenanyagot IRDye 680 másodlagos ellenanyagot (1:10,000 hígítás) tartalmazó membránnal (Li-cor Biosciences, Lincoln, NE, USA) tettük láthatóvá, és Odyssey típusú infravörös képrögzítő rendszerrel (Li-cor Biosciences) vizsgáltuk. A mért β -galaktozidáz mennyiséget a teljes fehérje frakcióban megtalálható ADH1 (S000005446) mennyiségre normáltuk.

4.3.10. A tRNS_{CAG}^{szerin} expressziójának meghatározása Northern blottal

A magas transzlációs hibarátáért felelős tRNS_{CAG}^{szerin} expressziós szintjét Northern blot technika alkalmazásával határoztuk meg, az ősbén valamint három evolált vonalban. Negatív kontrollként üres, tRNA_{CAG}^{szerin}-t nem expresszáló vad típust, pozitív kontrollként *C. albicans* SN148 törzset használtunk. A törzsekből totál RNS-t vontunk ki, majd a tRNSek elválasztását 12-15%-os, 8M ureát tartalmazó poliakrilamid gélen végeztük. A gél minden zsebébe 50 µg total RNS mintát vittünk fel, majd 16 óráig futtattuk 500 V feszültség mellett. A tRNS frakciót UV lámpa alatt azonosítottuk, az azonosított gél-részletet kivágtuk, és a tRNSeket nitrocellulóz membránra vittük át (Hybond N, Amersham) Semy-dry Trans Blot (Bio-Rad) segítségével. A hibridizációs próbákhoz 10 pmol defoszforilált oligonukleotidot és 4 µl of γ-32P-ATP-t (5000Ci/mmol) (Perkin Elmer) 1x T4 kináz puffert, 10 mM spermidin és 16 egység T4 kinázt (Takara) használtunk fel. A jelölési reakciót 1 óráig 37 °C-on végeztük. Ezt követően a próbákat fenolkloroformizoamilalkohol elegyével (25:24:1) vontuk ki. A hibridizációt Heitzler és munkatársai által leírt módon végeztük (Heitzler és mtsai., 1992). A membránokat 55 °C-on 30 percig hibridizációs oldattal [(5x Denhardt oldat (1% Ficoll, 1% Polivinilpyrrolidon és 1% Bovine serum albumin) 6x SSPE (3 M NaCl, 173 mM NaH₂PO₄, 25 mM EDTA) és 0,05% SDS] kezeltük elő. A membrán hibridizációt egy éjszakán át végeztük hibridizációs pufferben.

A hibridizáció során alkalmazott próbák:

GCGACACGAGCAGGGTTC

tRNS_{CAG}^{szerin}

GCGGAAGCCGGGAATCGAAC

kontroll tRNA_{CCC}^{glicin}.

A membránokat 4x3 percig mostuk 2x SSPE és 0.5% SDS elegyében 53 °C-on. A előhívást Molecular Imager FX (Bio-Rad) készülékkel végeztük.

4.3.11. A fehérjeszintézis ráta meghatározása

A fehérjeszintézis rátájának mérését a szakirodalomban már jól ismert [¹⁴C(U)]-L-Aminosav keveréket használó „Pulse-labeling” módszerrel végeztük (Alamgir és mtsai., 2008; Schwartz és Parker, 1999). tRNS_{CAG}^{szerin}-t nem expresszáló ősi és evolált vonalakban 15-15 technikai ismétlésben mértük a radioaktívan jelölt aminosavak

beépülési arányát. Ehhez a vizsgált vonalokból 2×10^7 sejtet centrifugálással összegyűjtöttünk, majd előmelegített tápoldatban felfuszpendáltuk, és 20 percig $30\text{ }^\circ\text{C}$ -on rázatva inkubáltuk. Ezt követően $20\ \mu\text{l}$ hideg [^{14}C (U)]-L-Amino Acid Mixture-t (Perkin Elmer, $0.1\ \text{mCi/ml}$) adtunk a mintákhoz, és további 10 percig inkubáltuk. Az aminosav beépülést ezután $60\ \mu\text{l}$ cikloheximid hozzáadásával ($20\ \text{mg/ml}$) és jégen hűtéssel állítottuk le. A sejteket hideg vízzel mostuk, és $-80\text{ }^\circ\text{C}$ -on lefagyasztottuk. A sejtek fehérje tartalmának kivonásához a pelletet $300\ \mu\text{l}$ lízis pufferben ($50\ \text{mM}$ kálium-foszfátpuffer pH 7, $1\ \text{mM}$ EDTA, 5% (V/V%) glicerinben, $1\ \text{mM}$ fenilmetilszulfonil fluoridban, teljes proteáz enzim gátló koktélnál (Roche) $100\ \mu\text{l}$ üvegyöngy hozzáadásával felfuszpendáltuk. A sejtek feltárása Precellys készülékkel (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France) történt, 5 darab, egyenként 10 másodperces $5,000\ \text{rpm}$ -es ciklussal, közöttük pedig 1-1 perc jégen hűtéssel. Ezt követően a mintákat 10 percig $5,000 \times g$ fordulatszámon centrifugáltuk. A felülúszóból $50\ \mu\text{l}$ -t vittünk fel $1\ \text{cm}^2$ mikrofilter szűrőpapírra. (GF/C, Whatman, Maidstone, UK). Az aminosav beépülési ráta meghatározásához Beckman márkájú szcintillációs számológépet alkalmaztunk. A sejtekből kivont fehérje mennyiségét BCA-meghatározásos módszerrel (Pierce, Rockford, IL, USA) végeztük. A beépült [^{14}C (U)]-L-aminosavmennyiségét a sejtek összfehérje tartalmára normalizáltuk.

4.3.12. Proteaszóma aktivitás mérés

Az ősz és az evolált vonalak proteaszóma aktivitásának mérését 3-3 technikai ismétlésben végeztük egy korábban már leírt, flourogén peptid szubsztrát alkalmazásán alapuló módszer alkalmazásával (Demasi és mtsai., 2003). Ehhez a vizsgált törzsek exponenciális kultúráiból 2×10^8 sejtet gyűjtöttünk, melyeket $-80\text{ }^\circ\text{C}$ -on lefagyasztottunk. A sejt pelletet $350\ \mu\text{l}$ lízis pufferben ($10\ \text{mM}$ Hepes, $10\ \text{mM}$ KCl, $1.5\ \text{mM}$ MgCl) felfuszpendáltuk $2/3$ térfogatnyi üvegyöngy hozzáadása mellett. A mintákat Precellys készülékkel 3, egyenként 10 másodperces $5,000\ \text{rpm}$ -es ciklussal, és 2-2 perces jégen hűtéssel tártuk fel. A pelletet $3000 \times g$ fordulatszámon 5 percig, majd $15000 \times g$ fordulatszámon 10 percig centrifugáltuk. A fehérje tartalom meghatározását BCA-módszerrel (Pierce) végeztük. A $100\ \mu\text{g}$ fehérjét tartalmazó mintákat $100\ \mu\text{l}$ pufferben ($10\ \text{mM}$ Tris pH 8, $20\ \text{mM}$ KCl, $5\ \text{mM}$ MgCl) szuszpendáltuk, és 15 percig $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk. A reakcióhoz N-SLLVY-MCA (Sigma) proteaszóma szubsztrátot adtunk $50\ \mu\text{M}$ végkoncentrációban, majd a mintákat 1 óráig $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on rázatva

inkubáltuk. A proteaszóma aktivitást Perkin Elmer Luminescence Spectrometer-rel (LS 50B) 365 nm-es excitációs és 435 nm emissziós hullámhosszon mértük.

4.3.13. A glükóz felvételi ráta mérése

A sejtek által felvett glükóz mennyiségének meghatározására egy korábban leírt módszert alkalmaztunk (Torres és mtsai., 2007). Ehhez 3-3 technikai ismétlésben ős és evolvált, tRNS_{CAG}^{szerin}-t nem expresszáló vonalakat oltottunk 20 ml leucin mentes SC tápoldatba úgy, hogy a kultúrák optikai denzitása 600 nm-en 0,01 legyen. A kultúrákat 30 °C-on 200 rpm-es fordulatszámra rázatva növesztettük, és az optikai denzitást 3 óránként mértük, ezáltal követve a sejtszám változását. Ezzel párhuzamosan a tápoldat glükóz tartalmát is nyomon követtük Glucose assay HK kit (Sigma) segítségével. A tápoldat glükóz tartalmának meghatározását a gyártó utasításainak megfelelően végeztük. A tápoldat kezdeti glükóz koncentrációjának ismeretében kiszámolható volt a sejtek által felvett glükóz mennyisége. A glükóz felvételi ráta meghatározásához a sejtek által felvett glükóz mennyiségét az adott populáció sejtszámára (optikai denzitásból számolva) normalizáltuk.

4.3.14. A kronológiai élettartam mérése

A kronológiai élettartamot Fabrizio és munkatársai által leírt mérési módszerrel (Fabrizio és mtsai., 2010) vizsgáltuk. Ehhez 3-3 technikai ismétlésben ős és evolvált, tRNS_{CAG}^{szerin}-t nem expresszáló vonalakat oltottunk le 10 ml leucin mentes SC tápoldatba. Az auxotrófiából eredő mérési hibák kiküszöbölésére a tápoldathoz kétszeres koncentrációban adtunk hisztidint, metionint és uracilt. A kultúrák denzitását OD₆₀₀=0,05-re állítottuk be, ezt követően három napig 30 °C -on 200 rpm-en rázatva növesztettük őket. A stacioner fázisú kultúrákból vett mintákból több lépcsős hígítási sorban YPD agar lemezre pipettáztunk, és a kinőtt telepek számából meghatároztuk a populációk élő sejtszámát (CFU). Ezt tekintettük a kezdeti, 100%-os életképességnek. A szaturáló kultúrák sejteit centrifugálással összegyűjtöttük, steril vízzel átmostuk, majd 10 ml steril vízben újra felfuszpendáltuk. Ezzel a lépéssel eltávolítottuk a szétesett halott sejteket is médiumból, melyek akár tápanyagforrásként is szolgálhattak volna a még életben lévő sejtek számára. A kultúrákat ezt követően 30 °C -on 200 rpm-en

rázattuk. A kultúrák élő sejtszámának csökkenését minden harmadik napon a kezdeti sejtszám meghatározásával megegyezően végeztük.

4.3.15. A Rpl25p riboszómális fehérje eloszlásának vizsgálata

A Rpl25p riboszómális fehérje sejten belüli eloszlását fluoreszcens mikroszkópia segítségével vizsgáltuk (Kraft és mtsai., 2008). A Rpl25p-t GFP fluoreszcens jellel jelölve követhető annak citoplazmában és vakuolumban történő eloszlása, melyből a ribofágia mértékére következtethetünk. Ehhez az ősi és evolált tRNS_{CAG}^{szerin}-t expresszáló vonalakat transzformáltuk az RPL25-GFP-t hordozó pRS316 plazmiddal (Kraft és mtsai., 2008). A transzformálást követően egyedi telepeket izoláltunk, melyeket leucin és uracil mentes SC tápoldatba oltottunk, és a kultúrákat OD₆₀₀=0,2-0,8 denzitásig növesztettük. A sejteket 5 perc 3000 x g fordulatszámú centrifugálással összegyűjtöttük. A felülúszót eltávolítottuk, majd egy mosási lépést követően a sejteket 24–48 óráig éhezési körülmények között növesztettük (0.17% élesztő nitrogén bázis, aminosav keverék és ammónium szulfát nélkül, 2% glükóz). A mikroszkópos vizsgálathoz a mintákat előre elkészített 1%-os agaróz réteggel borított tárgylemezre cseppentettük. A GFP-vel jelölt fehérjék elhelyezkedését Zeiss MC80 Axioplan, epifluoreszcens mikroszkópia funkcióval ellátott készülékkel vizsgáltuk, HE38-as szűrőt használva. A látómezőket random módon választottuk, melyekben mintánként legalább 100 sejtet vizsgáltunk. A mintákról AxioCamHRc kamera segítségével készítettünk felvételeket. Az ImageJ programot használva megszámláltuk, hogy hány sejtben figyelhető meg vakuoláris fluoreszcencia, majd ezt az értéket a teljes sejtszámra normalizáltuk (Schneider és mtsai., 2012).

4.3.16. A génexpresszió microarray alapú vizsgálata

A génexpresszió vizsgálatához a mintákból savas-kloroformos módszerrel teljes RNS-t tisztítottunk (Schmitt és mtsai., 1990). Ehhez a vizsgált ősi és evolált vonalakat 50 ml leucin mentes SC tápoldatban exponenciális fázisig növesztettük, a sejteket centrifugálással összegyűjtöttük, és a mintákat -80 °C-on egy éjszakán át fagyasztottuk. Másnap a fagyasztott sejt pelletet 0,5 ml lízis pufferben (10 mM Tris pH 7,5, 10 mM EDTA, 0,5% SDS) és 0,5 ml savas fenol-kloroform (5:1 pH 4,7, Sigma) elegyében felszuszpendáltuk. A mintákat alaposan vortexeltük, és 1 óráig 65 °C-on inkubáltuk. A

vizes és fenolos fázist 4 °C-on történő centrifugálással választottuk szét. A vizes fázist legyűjtöttük, és vele megegyező térfogatú kloroform-izoamil-alkohollal (24:1, Fluka) kezeltük. Az RNS-t kicsapását egy éjszakán át -30 °C-on 96%-os etanollal és 3 M nátrium acetáttal (pH 5,2) végeztük. A képződött csapadékot centrifugálással összegyűjtöttük, és steril bidesztillált vízben felfuszpendáltuk. A teljes RNS kivonatot a gyártó utasításainak megfelelően DNaseI (Amersham Biosciences) enzimmel kezeltük. A kivonás végén Agilent 2100 Bioanalyzer műszerrel határoztuk meg a minták tisztaságát és RNS tartalmát.

A géneexpressziós vizsgálatok az „Agilent One-Color Microarray Based Gene Expression Analysis Quick Amp Labeling v5.7. (Agilent Technologies) szerint történtek. A cDNS szintéziséhez 600 ng teljes RNS kivonatot, Agilent T7 Promoter Primer-t és T7 RNA Polymerase Blend-et használtunk, a jelölés pedig Cyanine 3-CTP-vel történt. A jelölt cDNS-t RNeasy mini spin columns (QIAGEN) oszlopon tisztítva távolítottuk el a feleslegben lévő jelölő anyagot. A festék beépülését Nanodrop 1000 Spectrophotometer műszerrel mértük.

A hibridizációs reakcióhoz 1.65 µg Cy3-mal jelölt cRNS-t kevertünk össze a fragmentáló mix-el (Blocking Agent és Fragmentation Buffer), majd a mintákat 30 percig 60 °C-on inkubáltuk. Ezután GEx Hybridization Buffer HI-RPM-t adtuk a mintákhoz, és a speciálisan erre a célra tervezett Agilent array (yeast G4813A)-re vittük fel őket, a gyártó utasításainak megfelelően. A hibridizációs reakciók egyenként 17 óráig 65 °C-on zajlottak, az Agilent hibridizációs készülékben. A kész reakciókat ezután mostuk, szárítottuk és az Agilent G2565AA microarray scanner (Agilent) segítségével értékeltük.

4.3.17. A microarray adatok kiértékelése

A hibridizációs próbákhoz rendelhető adatpontokat Agilent Feature Extraction Software (Agilent) segítségével nyerték ki a microarrayból.

A nyers adatokat a GEO adatbázisban GSE65718 elérési szám alatt találhatók meg. Az adatok normalizálása „median centering” módszerrel történt, melyhez a Biometric Research Branch BRB-Array tools v3.4.0 programot használtuk.

A géneexpressziós adatok elemzését a MEV (TM4 Microarray Software Suite) (Saeed és mtsai., 2006) program segítségével végeztük el. Student-féle t-tesztet alkalmaztunk

azoknak a géneknek az azonosítására, melyek expressziója szignifikánsan ($p < 0,01$) különbözött a kontroll (ős üres plazmida) és az evolált vonalakban.

4.3.18. DNS szekvencia meghatározása

Az ősi és evolált magas transzlációs hibaráttájú vonalakból a kereskedelmi forgalomban kapható Genomic-tip 100/G kit (Qiagen) kit használatával a gyártó utasításainak megfelelően teljes genomi DNS-t tisztítottunk. A kapott DNS hozamának és tisztaságának meghatározása Picogreen fluoreszcencia alapú módszerrel történt.

A DNS előkészítése és Illumina platformon szekvenálása a gyártó utasításainak megfelelően történt. Az Illumina DNA Sample Prep protokoll alapján mintánként egy, 400-500 bp hosszú inszertekből álló könyvtárat készítettek. Ehhez mintánként 5 µg nagy molekulású genomi DNS-t (gDNS) fragmentáltak Covaris szonikátorral. Az így létrehozott DNS fragmentek végeit javították, A-farokkal látták el, az adapter molekulákat pedig a 3' timin végekre kapcsolták. Az így létrehozott termékeket PCR-rel sokszorozították. Az elkészült könyvtárakból ezután az Illumina Flowcellen klasztereket hoztak létre. A szekvenálás Genome Analyzer IIx készüléken történt, átlagosan 150 bp-nyi párosodó leolvasási hosszal.

4.3.19. A genomszekvenciák bioinformatikai elemzése

A nyers szekvencia adatok 146 bázispárnyi párosodó végű, átlagosan 400-500 bázis hosszú leolvasási szakaszokból álltak. A szekvenciák 5' és 3' végeiről a nem megbízható, a 20-as értéknél rosszabb minőségű szakaszokat eltávolították. A leolvasási szakaszokat az alábbi paraméterek alapján szűrtük tovább: kétértelműség (N tartalom < 5%), komplexitás (score ≥ 10), leolvasáshossz (50 bázis, vagy hosszabb) és átlagos minőség (average base quality ≥ 20). A szűréshez a Bamtools (Barnett és mtsai., 2011) algoritmust használtuk.

A szűrési feltételeknek megfelelő leolvasási szakaszokat a *Saccharomyces Genome Database*-ből (Cherry és mtsai., 1998) letöltött *Saccharomyces cerevisiae* S288C referencia genomra térképeztük, ehhez a BWA (Li és Durbin, 2010) programot használtuk. A sikeresen térképezett read-eket ezután Samtools (Li és mtsai., 2009) segítségével szűrtük és vizsgáltuk tovább. A duplikációkat, a referencia-genom

ellentétes lefutású szálaira térképeződő leolvasási szakasz-párokat, valamint a várhatónál hosszabb szakaszokat kiszűrtük az adatsorból. Azokat a párokat is eltávolítottuk, melyek legalább egyik tagja alacsony hatékonysággal térképeződött ($MQ < 20$), vagy a referencia szekvenciával 95%-nál kisebb egyezést mutatott.

A megfelelően térképezett leolvasási szakaszokat Samtools (Li és mtsai., 2009) segítségével illesztettük össze, és azonosítottuk a referencia genomtól eltérő nukleotid szekvencia variánsokat. A fentebb ismertetett szűrési paraméterek mellett csak pontmutációkat tudunk egyértelműen azonosítani, kis inszerciókat és deléciókat nem. Az alacsony minőségi mutatókkal rendelkező, háromnál alacsonyabb leolvasási-mélységű, vagy a minta átlagos lefedettségénél kettő, vagy többszörös lefedettségű bázisokat ismeretlen genotípusként definiáltuk. A teljes szekvenálási adatsor elérhető az European Nucleotide Archive adatbázisban, PRJEB8951 referencia szám alatt.

4.3.20. A funkcionális feldúsulás vizsgálata

A funkcionális feldúsulás vizsgálatához a FunSpec (mozaikszó, az angol „functional specification” kifejezésből) internetes felületen működő élesztő klaszter azonosítót használtuk (Robinson és mtsai., 2002). A vizsgálni kívánt gének listáját feltöltöttük a FunSpec internetes felületére, ahol automata algoritmusok segítségével zajlott a klaszterek létrehozása. A klaszterek kialakításához különböző adatbázisok szolgáltak forrásként. Egy adott funkcionális kategória (GO „gene ontology”) feldúsulását akkor minősítettünk szignifikánsnak, ha az adott kategóriához köthető gének a vizsgált gén csoportban szignifikánsan gyakrabban ($p < 0,05$) fordultak elő, mint a teljes genomban.

5. Eredmények

5.1. A translációs hibaráta megemelése

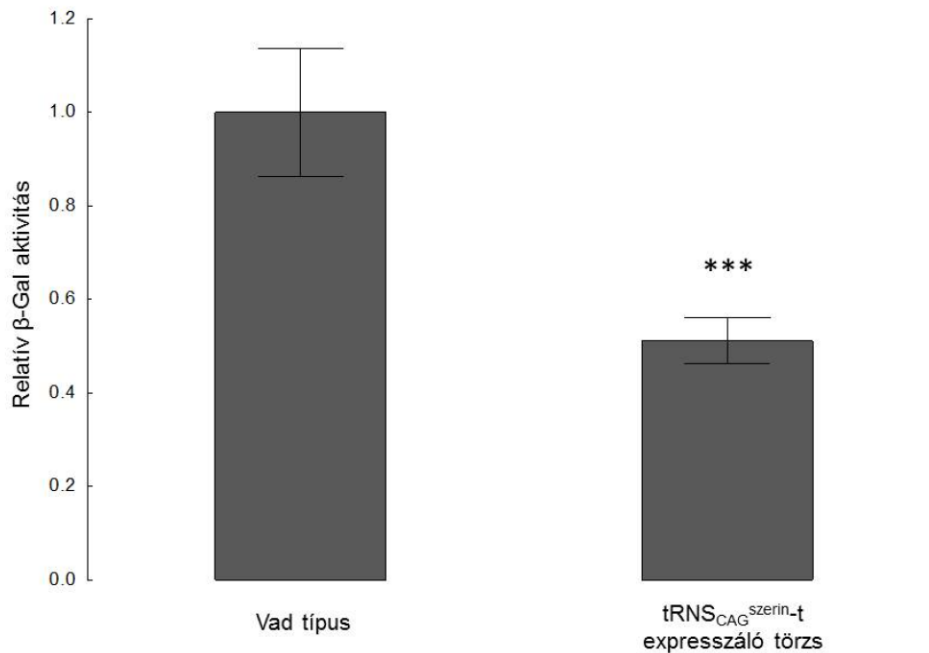
A translációs hibaráta rátermettségre gyakorolt hatásait egy speciális modell segítségével vizsgáltuk. Korábban Santos és munkatársai élesztőben egyszeres kópiájú plazmidra klónozták a *Candida albicans* tRNS_{CAG}^{szerin} génjét, melynek expressziója *Saccharomyces cerevisiae*-ben a CUG kodonok kétértelmű meghatározásához vezet (Santos és mtsai., 1996, 1999). Ennek oka a sejtek saját (tRNS_{CAG}^{leucin}) és a külsőleg bevitt (tRNS_{CAG}^{szerin}) tRNS-ének a versengése a mRNS-ek CUG helyeiért. Tömegspektrometriai mérések azt is kimutatták, hogy pékélesztőben a tRNS_{CAG}^{szerin} a CUG pozíciók 1,4%-ba épít leucin helyett hibásan szerint. Tekintve, hogy élesztőben a természetes translációs hibaráta 0,001% (Stansfield és mtsai., 1998), az új mutáns tRNS kifejeződése közel 1400-szorosára emeli a hibás szerin beépülések arányát. Mivel korábbi eredmények a translációs hibaráta több nagyságrendbeli emelkedését valószínűsítik, ez a rendszer ideális modellnek bizonyult vizsgálataink elvégzéséhez.

5.1.1. A tRNS_{CAG}^{szerin} expresszió hatása a translációs hibarátára

Kísérleteink megkezdéséhez szükséges volt annak bizonyítása, hogy a tRNS_{CAG}^{szerin} kifejeződése valóban emeli a translációs hibarátat pékélesztő sejtekben. Modellünk helyességének igazolásához a translációs hibaráta mértékét a jól ismert β -galaktozidáz enzim aktivitás méréssel határoztuk meg (Paredes és mtsai., 2012). A módszer alapja, hogy az *Escherichia coli* LacZ génjének 54 CUG kodon pozíciójába random módon szerinek vagy leucinok épülnek, ezzel pedig különböző aminosav szekvenciájú β -galaktozidáz enzim molekula jön létre. A CUG pozíciókba épülő két aminosav kémiai tulajdonságában jelentősen eltér (a szerin poláris, míg a leucin hidrofób tulajdonságú), ez pedig az enzim fehérjék stabilitására és aktivitására is kihat. A CUG pozíciókba épülő szerinek mennyiségének emelkedésével csökken az enzim hőstabilitása. Hősokk kezelést követően a maradó enzim aktivitás mérésével megbecsülhető a translációs hibaráta mértéke.

Ezzel a módszerrel vizsgáltuk a translációs hibaráta mértékét tRNS_{CAG}^{szerin} –t expresszáló törzsben vad típusú kontrollhoz képest. Eredményeink azt mutatták hogy a

mutáns tRNS expressziója szignifikáns, 62%-os β -galaktozidáz enzim aktivitás csökkenést eredményezett (7. ábra).



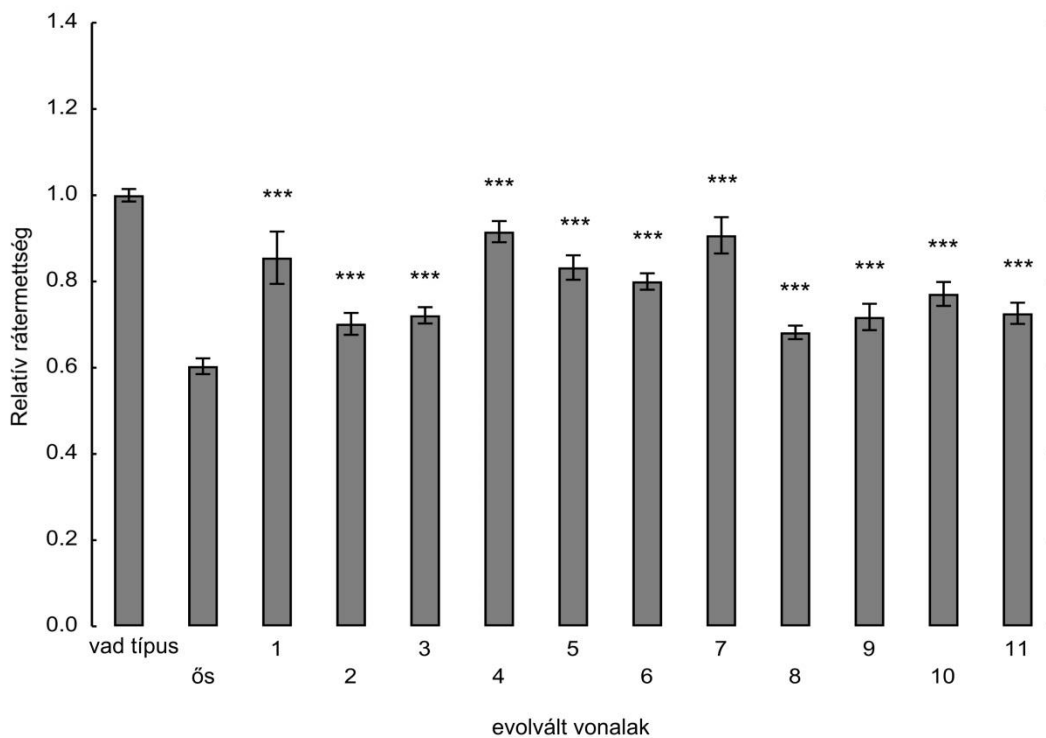
7. ábra. A tRNS_{CAG}^{szerin} expresszió hatása a translációs hibarátára. Az ábrán vad típusú, valamint tRNS_{CAG}^{szerin}-t expresszáló törzsben mért β -galaktozidáz enzim aktivitás látható. A mért enzim aktivitásokat a vad típusban mért enzim aktivitásra vonatkoztatva ábráztuk, valamint kontrolláltuk a teljes β -galaktozidáz enzim fehérje mennyiségre is (Western blot-tal meghatározva). A hibaszávok az átlag körüli 95%-os konfidencia intervallumot jelölik. ***= P<0,001 (Mann-Whitney U teszt).

5.2. A magas translációs hibaráta hatása a rátermettségre

A magas translációs hibaráta rátermettségre gyakorolt hatásának vizsgálatára a korábban ismertetett, plazmid alapú tRNS_{CAG}^{szerin} expressziós rendszert diploid pékélesztő sejtekbe transzformáltunk. Ezt követően a megemelt translációs hibarátájú, valamint a kontroll vad típusú vonalak rátermettségét vizsgáltuk. Élesztő populációk rátermettségének mérésére egy korábban publikált, megbízható módszert (Warringer és Blomberg, 2003; Warringer és mtsai., 2003) alkalmaztunk. A módszer lényege, hogy a sejteket folyadék kultúrában növesztve és a kultúra optikai denzitását 600 nm-en időről-időre lemérve nyomon lehet követni a populáció növekedését. Az eltelt idő és az optikai denzitás változásának ismeretében kiszámolható a populáció növekedési rátája. A növekedési ráta pedig a populáció rátermettségének egyik előrejelzője lehet.

Magas transzlációs hibarátájú, azaz tRNS_{CAG}^{szerin}-t expresszáló, valamint alacsony transzlációs hibarátájú, azaz vad típusú, üres vektorral transzformált törzsek növekedési rátáját mértük, SC-leucin tápoldatban, 20-20 technikai ismétlésben.

Eredményeink azt mutatták, hogy a tRNS_{CAG}^{szerin} expressziója 40%-kal csökkentette a növekedési rátát a vad típusú kontrollhoz képest. Mivel a növekedési ráta a rátermettség egyik mérőszámaként értelmezhető, így azt is mondhatjuk, hogy a magas transzlációs hibarata 40%-os rátermettség csökkenést eredményezett a vizsgált törzsekben (8. ábra, első két oszlop). Az alacsony és magas hibarátájú vonalak között mért rátermettségbeli különbség statisztikailag szignifikáns (Mann-Whitney U teszt, p-érték < 0,001), ez pedig azt valószínűsíti, hogy a misztranszláció jelentős költséggel jár.



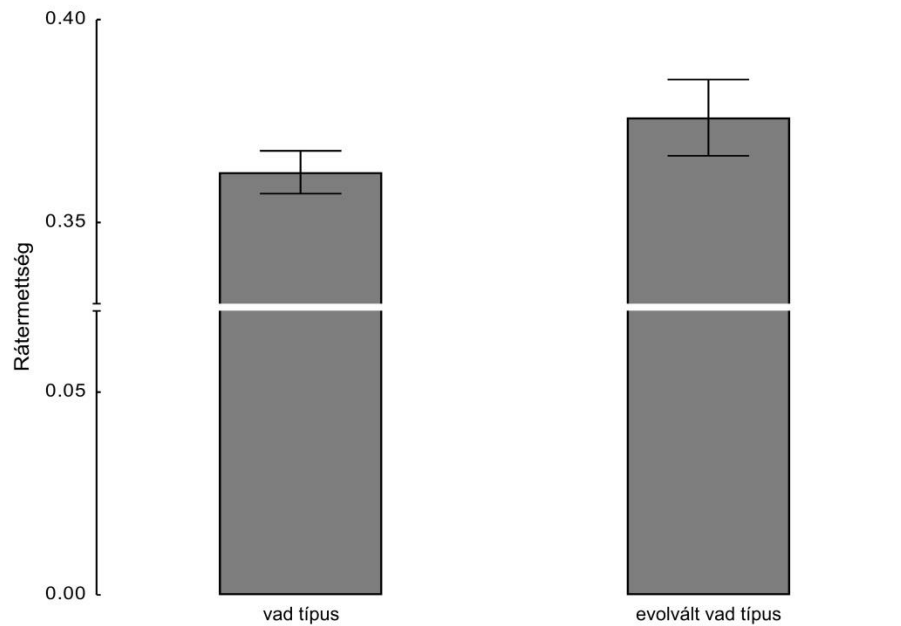
8. ábra. A magas transzlációs hibarátájú ős és evolált vonalak rátermettsége. Az ősi és evolált vonalak tRNS_{CAG}^{szerin}-t expresszáltak. A vad típus az ősi vonallal megegyező genotípusú, azzal a kivétellel, hogy a tRNS_{CAG}^{szerin}- helyett üres vektort hordoz, így alacsony a transzlációs hibarátája. A populációk optikai denzitásából számolt növekedési rátát értelmeztük rátermettségként. Az ábrán a vad típus törzshöz viszonyított növekedési ráták láthatók. A hibasávok az átlag körüli 95%-os konfidencia intervallumot jelölik. *** P<0,001(Mann-Whitney U teszt).

5.3. A rátermettség változása a laboratóriumi evolúció alatt

Kutatási eredményeink azt mutatják, hogy a magas transzlációs hibarátája jelentős rátermettség csökkenéshez vezet (8. ábra, első két oszlop). Annak eldöntésére, hogy a megfigyelt rátermettségbeli hátrány kompenzálható-e egy rövid ideig tartó alkalmazkodási periódus alatt, egy laboratóriumi evolúciós kísérletet végeztünk el. Ehhez 11 független tRNS_{CAG}^{szerin}-t expresszálo klónt oltottunk le SC-leucin tápoldatba. A magas transzlációs hibarátájú vonalak mellett további 11, csak üres plazmidot hordozó, alacsony transzlációs hibarátájú kontroll vonal evolúcióját is elindítottuk. A kísérlet minden második napján a felnőtt populációk 1%-át friss tápoldatban hígítottuk tovább. Az evolúciós kísérletet 70 napig végeztük, mely alatt közel 250 generáció jött létre. Az evolúció befejeztével összevetettük a kezdeti és vég időpontokból származó vonalak növekedési rátáját. Ehhez mind a 22 (11 magas és 11 alacsony transzlációs hibarátájú) evolválódó populációból egyedi klónokat izoláltunk, majd ezek rátermettségét a már ismertetett, optikai denzitás mérésen alapuló módszer segítségével határoztuk meg.

Eredményeinkből az látszik, hogy az evolúció befejeztével mind a 11, tRNS_{CAG}^{szerin}-t expresszálo evolúciós vonal életképessége emelkedett az evolúció kezdetén mért értékhez képest. A vonalak mindegyikében szignifikáns (Mann-Whitney U-teszt, p-érték < 0,001) mértékű volt az rátermettség növekedés. Az evolúciós vonalakban 13,3%–51,7%-os életképesség változás volt megfigyelhető, néhány vonal még a vad típusú kontroll rátermettségét is megközelítette (8. ábra).

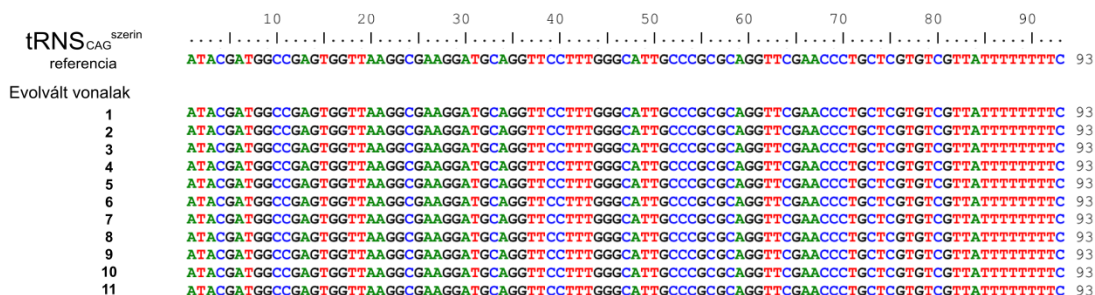
Ezzel ellentétben a kontroll vonalaknál nem volt megfigyelhető ilyen mintázat, ezek rátermettsége elhanyagolható mértékben, mindössze 3,7%-nyit emelkedett az evolúció alatt (9. ábra).



9. ábra. Laboratóriumi evolúció alacsony transzlációs hibaráta mellett. $\text{tRNA}_{\text{CAG}}^{\text{szerin}}$ -t nem expresszáló vad típusú populációk optikai denzitásból számolt növekedési rátáját mértük, ezt értelmeztük rátermetségként. Az ábrán az abszolút növekedési ráták láthatók. A hibasávok az átlag körüli 95%-os konfidencia intervallumot jelölik.

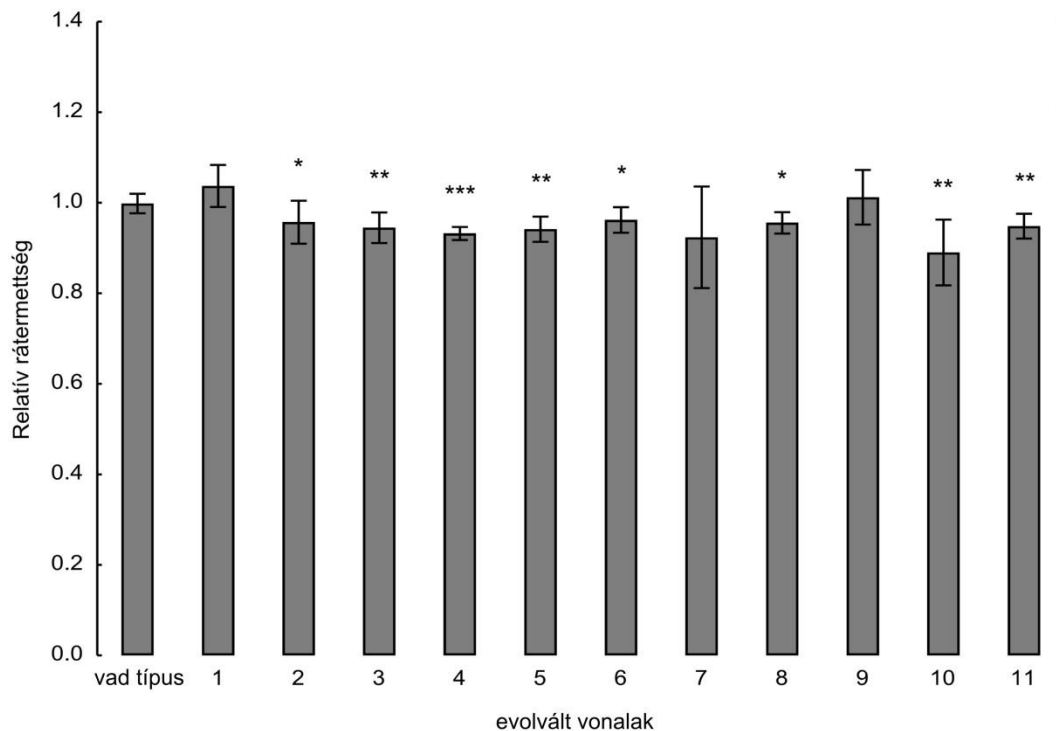
Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a magas transzlációs hibaráta által okozott rátermetség csökkenés mérsékelhető egy kísérleti evolúció során, és a tapasztalt változások valóban a hibarátához, és nem a tápoldathoz történő alkalmazkodásból erednek.

Azért, hogy az esetleges vektoron keletkezett mutációk rátermetséget befolyásoló hatásait kizárhassuk, mind a 11 független evolúciós vonalból plazmidot izoláltuk, és ezek bázissorrendjét szekvencia analízissel meghatároztuk. A plazmidok szekvenciája az összes evolúciós vonal esetén változatlan maradt (10. ábrán illusztrálva: $\text{tRNA}_{\text{CAG}}^{\text{szerin}}$ gén szekvenciái). Ez arra enged következtetni, hogy az evolúció során tapasztalt rátermetség növekedés nem a vektoron megjelenő inaktiváló mutációk eredménye



10. ábra. Az evolúciós vonalaktól izolált plazmidok tRNA_{CAG}^{serin} gén szekvenciái

Azért, hogy megvizsgálhassuk, hogy a magas transzlációs hibarátahoz való alkalmazkodás eredményeként létrejött hatások mennyire általánosak, a két evolúciós időpontból származó összes magas transzlációs hibarátajú vonal tRNA_{CAG}^{serin}-t expresszáló vektorját üres plazmidra cseréltük. Ezt követően optikai denzitás mérésen alapuló módszer segítségével mértük meg a létrehozott vonalak életképességét. Mérési eredményeink alapján az evolúciós vonalak többsége a magas transzlációs hibaráta eredményező plazmid nélkül szignifikáns (Mann-Whitney U-teszt, p-érték < 0,05/0,01/0,001), 3-11%-os növekedési hátrányba került az ősi állapothoz képest (11. ábra). Ez arra enged következtetni, hogy az evolúciós adaptációs mechanizmusok csak a magas transzlációs hibaráta jelenléte mellett előnyösek, egyéb körülmények között negatívan befolyásolhatják a rátermettséget.



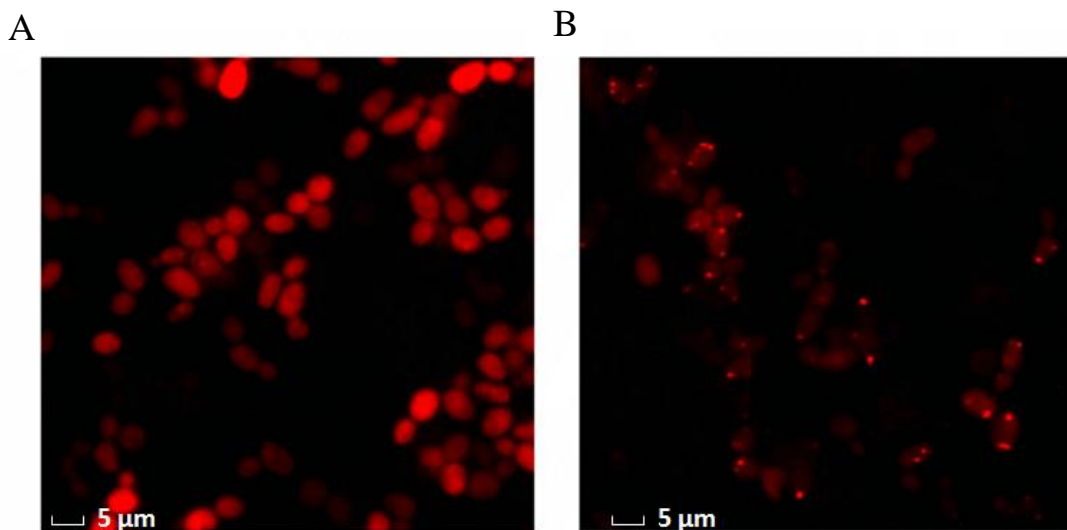
11. ábra. Alacsony translációs hibarátájú ősz és evolvált vonalak rátermettsége. Az ősi és evolvált vonalak $tRNA_{CAG}^{szerin}$ -t hordozó plazmidját üres vektorra cseréltük. A populációk optikai denzitásából számolt növekedési rátát értelmeztük rátermettségként. Az ábrán az őshöz viszonyított növekedési ráták láthatók. A hibasávok az átlag körüli 95%-os konfidencia intervallumot jelölik. *= $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$ (Mann-Whitney U teszt).

5.4. A magas translációs hibaráta költségeinek felderítése

A misztranszláció okozta rátermettség-csökkenés hátterében korábbi feltételezések alapján a fehérjék hibás feltekeredése, összecsapódása, és a létrejött fehérje-aggregátumok sejtkárosító hatása is állhat (Drummond és Wilke, 2009). Ezt az elméletet kísérleti úton is sikerült alátámasztani, miszerint $tRNS_{CAG}^{szerin}$ expressziója élesztőben proteotoxikus stresszhez, és az ehhez tartozó válaszreakciók kiváltásához vezet (Paredes és mtsai., 2012). Ezek tekintetében feltételeztük, hogy az általunk vizsgált kísérleti elrendezésben tapasztalt rátermettség csökkenés hátterében is elsődlegesen a fehérjék aggregációja állhat, az evolúciós megoldások pedig az összecsapódott fehérjék mennyiségének csökkentése érdekében jöttek létre.

A translációs hibaráta és a fehérje aggregáció kapcsolatának vizsgálatára egy szakirodalmi forrásokban jól dokumentált, fluoreszcens riporter rendszert alkalmaztunk (Kaganovich és mtsai., 2008). Ennek segítségével hasonlítottuk össze $tRNS_{CAG}^{szerin}$ -t

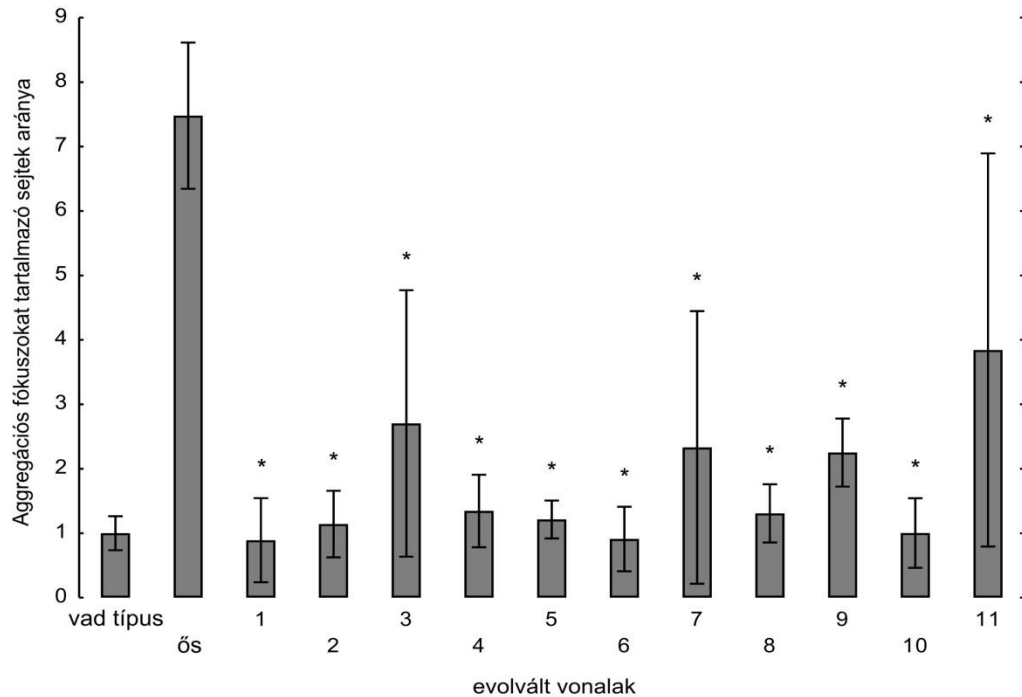
expresszáló ősi, valamint evolvált vonalakban és vad típusban a fehérje aggregáció mértékét. A módszer egy fluoreszcens mCherry jellel ellátott, összecsapódásra hajlamos humán fehérje, a von Hippel–Lindau protein (VHL) aggregációját vizsgálja. Természetes körülmények között vad típusú sejtekben a fehérje aggregációját a működő minőségellenőrző rendszerek meggátolják (Oromendia és mtsai., 2012). Ha azonban a minőségellenőrző rendszerek, például a dajkafehérjék hálózata egyéb okok miatt túlterhelt, az összecsapódó VHL molekulák aggregációs fókuszokat alkotnak a sejtekben. Ha a vizsgálat során a fluoreszcens jel ép marad, akkor fluoreszcens mikroszkóp segítségével könnyedén azonosíthatóak a vörös aggregációs fókuszokat tartalmazó sejtek. Ezt a riporter rendszert plazmid vektoron transzformáltuk vad típusú és tRNS_{CAG}^{szerin}-t expresszáló ősi vonalakba egyaránt. A sejteket fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgálva megállapítható volt, hogy a tRNS_{CAG}^{szerin} expressziója a VHL aggregációját idézte elő, melyek fluoreszcens fókuszok formájában jelentek meg. Ezzel szemben vad típus esetén a VHL nem aggregálódott, a vörös jel egyenletesen oszlott el a sejtekben (12. ábra).



12. ábra. A fluoreszcens VHL-mCherry jel eloszlása alacsony (A) és magas transzlációs hibarátájú sejtekben (B).

Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy hogyan hatott az evolúció a fehérje aggregációs rátára. Ehhez kiszámoltuk, hogy vad típusú, tRNS_{CAG}^{szerin}-t expresszáló ősi és evolvált populációkban a sejtek mekkora hányadában figyelhető meg a VHL-mCherry aggregációja. Eredményeink azt mutatták, hogy a tRNS_{CAG}^{szerin}-t expresszáló ősi

vonalban megfigyelhető magas aggregációs hajlamhoz képest az evolált vonalak szignifikánsan (Mann-Whitney U-teszt, p -érték $< 0,05$) alacsonyabb fehérje aggregációt mutattak. Néhány vonal esetén a vadhoz közeli szintre állt vissza a fehérje aggregáció mértéke (13. ábra). Méréseink alapján elmondható, hogy a magas transzlációs hiba okozta fehérje aggregáció mértéke az evolúció alatt csökkent.



13. ábra. A fehérje aggregációs ráta változása az evolúció alatt. A fehérje aggregáció mértékét vad típusú, valamint tRNS_{CAG}^{szerin}-t expresszáló ősi és evolált vonalakban mértük. Az aggregációs fókuszokat tartalmazó sejtek arányát a vad típusban mért arányra vonatkoztattuk. Az aggregációs fókuszokat tartalmazó sejtek arányát használtuk a fehérje aggregáció mértékének meghatározására. A hibásávok az átlag körüli 95%-os konfidencia intervallumot jelölik. *= $P < 0,05$ (Mann-Whitney U teszt).

5.5. A magas transzlációs hibarátához történő evolúciós adaptáció genetikai és molekuláris hátterének vizsgálata

5.5.1. Az adaptáció genetikai hátterének megismerése

A laboratóriumi evolúció időtartama alatt megfigyeltük a tRNS_{CAG}^{szerin}-t expresszáló vonalak magas transzlációs hibarátához történő alkalmazkodását. Ahhoz, hogy az adaptáció mechanizmusait felderíthessük, az evolúció során bekövetkező öröklődő genetikai változások megismerésére volt szükség, ennek érdekében meghatároztuk mind a 11 szignifikánsan javult evolúciós vonal teljes genom szekvenciáját. A 11 szekvenált vonalban összesen 431 független mutációs eseményt azonosítottunk, melyek közé az egyedi pontmutációk és a nagy genomi átrendeződések, duplikációk és deléciók tartoztak. Evolúciós vonalanként átlagosan 39,41 pontmutációt, 1 deléciót és 2 duplikációt figyeltünk meg. Mind a gének, mind működési egységek terén nagyfokú párhuzamos evolúciós mintázat jellemezte a vizsgált vonalakat. A nem szinoním mutációkat tartalmazó gének 26%-a legalább két evolúciós vonalban is mutálódott, illetve azonosítottunk olyan géneket is, melyeknek a vonalak többségében változott a szekvenciája (Függelék, 1. táblázat). A működési egységek tekintetében is jelentős volt a párhuzamos mutációs események száma. Példának okáért a riboszómális RNS érésben (*MRD1* [S000006316]), a transzkripció inicializációban és elongációban (*BDF1* [S000004391], *TFG2* [S000003237]) szerepet játszó gének, valamint az ubiquitin-proteaszóma rendszer (*SSM4* [S000001292], *HSM3* [S000000476]) elemei több esetben halmoztak fel mutációkat.

A pontmutációk mellett nagy kromoszómális átrendeződéseket (teljes kromoszómák, vagy kromoszóma részek duplikációját, illetve egyes kromoszóma szegmensek delécióját) is gyakran figyeltünk meg (1. táblázat). Összesen 33 ilyen eseményt azonosítottunk, az evolált vonalak többsége 4-5 nagy kromoszómális átrendeződésen ment keresztül az evolúció során. Az átrendeződések azonban mindössze 7 különböző típusú mutációs eseményre oszthatóak, melyek párhuzamosan több evolúciós vonalban is megjelentek. Ilyen esemény volt többek között az V. kromoszóma egyik kópiájának részleges deléciója (127 kb), a IV és VII kromoszóma részleges duplikációja is a gyakori mutációs események közé tartozott, mely a IV kromoszómán egy 540 kb-nyi, a VII kromoszómán pedig egy 238 kb-nyi szakaszt érintett. Az átrendeződési események minden esetben mobilis genetikai elemek által határolt régiókat érintettek, ez pedig arra

enged következtetni, hogy keletkezésük a mobilis elemek között létrejött homológ rekombinációval függ össze.

Kromoszóma	Régió	Aneuploidia	GO	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	
chrIII	Teljes	Triszómia	redox homeosztázis szabályozása												
			aminosavmetabolikus folyamatok szabályozása									•			
			riboszóma kis alegység összeszerelés												
chrIV	992kb-a végéig	Triszómia	szubsztrát-specifikus membrántranszport aktivitás		•	•	•	•	•		•	•	•	•	
chrV	450kb-a végéig	monoszómia	ubiquitin-specifikus proteasómális aktivitás	• *	•	•	•	•	•		•	•	•	•	
chrVII	57 4kb - 812 kb	Triszómia	proteasóma magi alegység összeszerelés												
			válasz a reaktív oxigén gyökökre	•											
			RNS polimeráz II transzkripció elonvációs aktivitás												
chrIX	Teljes	Triszómia	glükoneogenezis negatív regulációja												
			riboszóma kis alegység exportja a sejtmagból	•					•		•				
			RNS polimeráz II transzkripció termináció												
chrXII	Teljes	Triszómia	riboszóma biogenesis												
			riboszóma nagy alegység összeszerelés	•	•	•	•				•	•	•		•
chrXVI	810kb - 844kb	monoszómia	-											•	

1. táblázat. Az evolúciós vonalakban azonosított részleges és teljes kromoszóma deléciók és duplikációk. A táblázat az érintett kromoszómákat, az átrendeződések irányát és méretét, valamint a feldúsuló biológiai funkciókat ($p < 0,05$) tartalmazza. A funkcionális feldúsulás vizsgálatához a FunSpec nevű, internetes felületen működő élesztő klaszter azonosítót használtuk (Robinson és mtsai., 2002). * = chrV kromoszóma 450 kb-tól 498 kb-ig terjedő monoszómiája.

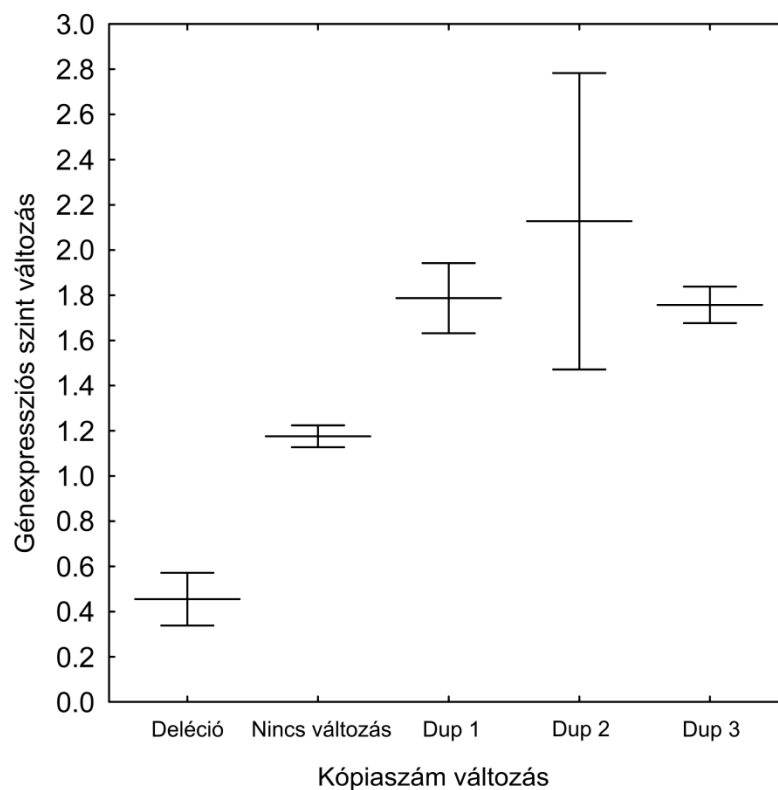
Az egyes típusú átrendeződési események egymástól független, ismétlődő megjelenése azt sugallja, hogy a létrejött genetikai változásoknak szerepe lehetett az adaptációs folyamatokban. Azért, hogy pontosabb képet kaphassunk az alkalmazkodás mutációs hátteréről, az átrendeződések által érintett géneket adatbázisokból kinyert információk

alapján csoportosítottuk. Az V kromoszóma kópiaszám csökkenést mutató szakaszán deubiquitinációs enzimek génjei találhatóak (az *UBP3* [S000000953] és az *UBP5* [S000000946]). A nagy léptékű duplikációs események által érintett genomi régiókban pedig szignifikánsan feldúsultak a riboszóma biogenezis génjei (mint például a *DRS1* [S000003931], a *SOF1* [S000003934] és a *RIX7* [S000003957]), az RNS feldolgozás génjei (például a *GRC3* [S000003958], a *NOC3* [S000003992] vagy a *SDO1* [S000004012]), valamint egy, a proteaszóma összeszerelésében szerepet játszó gén (*PRE9* [S000003367]).

5.5.2. A génexpressziós változások adaptációban betöltött szerepének vizsgálata

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, milyen génexpressziós változások állhatnak a megfigyelt adaptációs folyamatok hátterében, DNS microarray technika segítségével határoztuk meg két kiválasztott evolúciós vonal teljes génexpressziós mintázatát. Vizsgálataink elvégzéséhez két olyan evolúciós vonalat (1. és 4. vonal) választottunk ki, melyek genomi átrendeződési mintázatukban jól reprezentálják az evolúciós vonalak összességét. Feltételezhető, hogy a megfigyelt nagy átrendeződések jelentősen befolyásolták a génexpressziós válaszokat, így kézenfekvőnek tűnt olyan vonalakat vizsgálni, melyek hordozzák a gyakori mutációkat. A kiválasztott vonalak gén expressziójának mértékét exponenciális fázisú kultúrából határoztuk meg, majd a kapott értékeket viszonyítottuk az ősi állapotban mért génexpressziós szinthez. További vizsgálatainkat csak a legalább kétszeres expressziós változást mutató géneken végeztük el.

Eredményeink alapján a mRNS-szint változások egyértelműen tükrözik a gén kópiaszám változásokat. A kópiaszám csökkenést mutató régiókban a gének expressziós szintje szignifikánsan alacsonyabb (páros t-teszt, p-érték $< 10^{-6}$), míg kópiaszám emelkedés esetén szignifikánsan magasabb (páros t-teszt, p-érték $< 10^{-6}$) volt (14. ábra). Ez a mintázat torzítja a valós génexpressziós változások képét, ezért a továbbiakban csak az olyan gének vizsgálatára fókuszáltunk, melyek expressziós változásának hátterében nem az adott gén kópiaszám változása áll.



14. ábra. Génexpressziós változások a kópiaszám függvényében. Az ábrán az 1. evolált vonalban az őshöz képest mért mRNS expressziós változást ábrázoltuk. Az adatokat a kódoló gének elhelyezkedése alapján csoportosítottuk: deléció=gének a kópia-szám csökkentett kromoszóma szakaszokon, nincs változás=gének a kromoszómaszám változások által nem érintett genomi régiókban, Dup1=gének a duplikálódott VII kromoszómán, Dup2=gének a duplikálódott IX kromoszómán és Dup3=gének a duplikálódott XIII kromoszómán. A középvonalak az átlagot, a hibasávok pedig az átlag körüli 95%-os konfidencia intervallumot jelölik.

A két vizsgált vonal génexpressziós mintázatát összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy a kópiaszám változástól független génexpressziós mintázatok korrelálnak (Spearman korreláció, $r = 0.54$ p -érték $< 10^{-6}$). Ezt figyelembe véve a továbbiakban az expressziós profilok metszetét vizsgáltuk, amelyben azokra a génekre összpontosítottunk, melyek mindkét vonalban hasonló irányú változást mutattak. A két vonal esetén összesen 425 gén volt érintett, az őshöz képest 168 gén indukálódott, 257 gén pedig represszálódott. A gének funkcionális kategóriákba sorolásakor azt tapasztaltuk, hogy a riboszómális RNS feldolgozás, a riboszóma biogenezis és az aminosav bioszintézis útvonal géneinek expressziós szintje emelkedett az evolúció során (2. táblázat).

Evolúciós vonal	Változás iránya	GO	Az érintett gének száma
1. evolúciós vonal	indukció	riboszóma biogenesis	67
		rRNS feldolgozás	62
		riboszóma nagy alegység összeszerelés	18
	represszió	elektrontranszport lánc	17
		glikogén bioszintézis	7
4. evolúciós vonal	indukció	riboszóma biogenesis	25
		rRNA feldolgozás	21
		aminosav bioszintézis	11
		riboszóma nagy alegység összeszerelés	6
	represszió	oxidative stress válasz	22
		glikogén bioszintézis	7

2. táblázat. Az evolált vonalakban expressziós változást mutató gének funkcionális kategóriái. A funkcionális feldúsulás vizsgálatához a FunSpec nevű, internetes felületen működő élesztő klaszterezőt használtuk (Robinson és mtsai., 2002).

5.6. Az adaptáció molekuláris hátterének megismerése

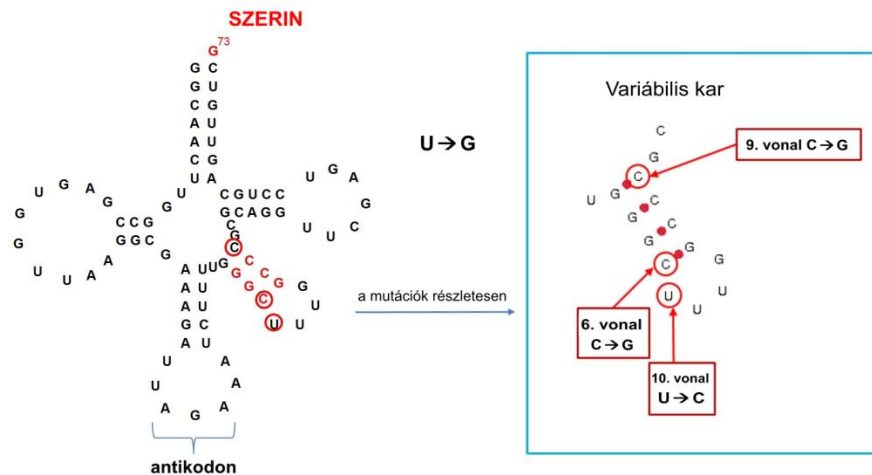
5.6.1. A translációs hibaráta változásának vizsgálata

A hibás fehérjék sejten belüli felhalmozódása számos negatív következménnyel járhat. A költség csökkentésének egyik módja a hibák előfordulási gyakoriságának mérséklése (Drummond és Wilke, 2009). Az általunk vizsgált misztranszlációs rendszerben ez azt jelentené, hogy a szelekció a translációs hibaráta csökkentésére irányulna. Ennek többféle módja létezik, történhet akár a sejtek tRNS összetételének változtatása, vagy akár a tRNS-ek aminosavval töltésének befolyásolása révén.

5.6.1.1. A translációs hibarátát befolyásoló mutációk azonosítása

Az evolált vonalak szekvenciáinak elemzésekor mutációkat azonosítottunk tRNS transzkripcióban (RNS polimeráz III), tRNS exportban (*SOLI* [S000005317]) valamint a tRNS minőségellenőrző folyamataiban és lebontásában (*TRF5* [S000005243]) szerepet játszó génekben (Függelék, 1. táblázat). Három evolúciós vonal esetén a tRNS_{AGA}^{szerin} variábilis hurkában is történtek mutációk (15. ábra, 3. táblázat). A tRNS

molekula variábilis hurkán található három G-C bázispár, mely a szeril-tRNS szintetáz enzim felismerő helye, továbbá a 73., úgynevezett „megkülönböztető” (discriminator) pozíójú guanin. Az azonosított mutációk akár a tRNS stabilitását és sejten belüli arányát is megváltoztathatták, valamint az említett tRNS aminosavval töltésének folyamatát is módosíthatták. A bekövetkező evolúciós változások eredménye pedig akár a translációs hibaráta csökkenése is lehetett.



15. ábra. A tRNS_{AGA}^{szerin}-ben azonosított mutációk. Három evolúciós vonalban (6. 9. és 10. vonal) jelentek meg egymástól független mutációk a tRNS variábilis karján. Az ábrán pirossal jelölt elemek a szeril-RNS szintetáz felismerő helyei (G73 és a GC bázis párok a variábilis karon). A molekulaserkezet előrejelzéséhez a tRNAscan-SE analízist használtuk (Schattner és mtsai., 2005).

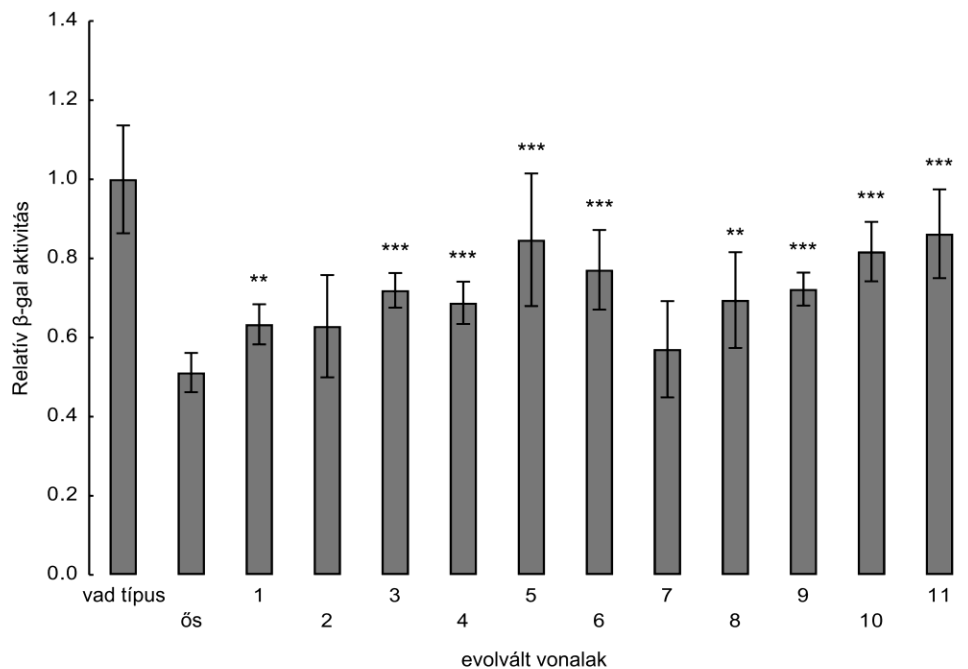
Evolúciós vonal	Kromoszóma	Pozíció	Referencia	Minta
6. evolált vonal	IV	1305677	C/C	C/G
9. evolált vonal	IV	1305685	C/C	C/G
10. evolált vonal	IV	1305678	C/T	T/T

3. táblázat. A tRNS_{AGA}^{szerin}-ben azonosított mutációk

5.6.1.2. A translációs hibaráta változása az evolúció során

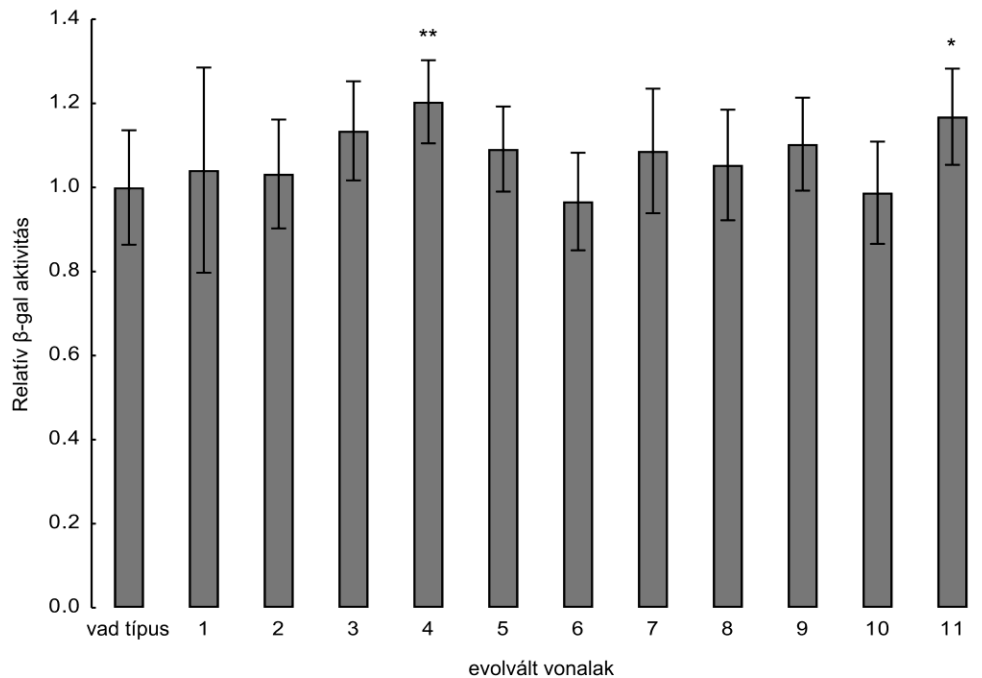
A translációs hibarátát potenciálisan módosító mutációk azonosítása után munkánkat a translációs hibaráta mérésével folytattuk. Célunk volt felderíteni, hogy hogyan és milyen mértékben változott a hibás aminosav beépülések aránya a laboratóriumi evolúció során. A translációs hibaráta mértékét a korábban már ismertetett β -galaktozidáz enzim aktivitás méréssel határoztuk meg (Paredes és mtsai., 2012).

Méréseink alapján az evolált $\text{tRNA}_{\text{CAG}}^{\text{szerin}}$ -t expresszáló vonalak az őshöz képest kis mértékben ugyan, de statisztikailag szignifikánsan (Mann-Whitney U-teszt, p -érték $< 0,01/0,001$) magasabb β -galaktozidáz aktivitással rendelkeztek (16. ábra).



16. ábra. A translációs hibaráta evolúciója. Az ábrán vad típusú, valamint $\text{tRNA}_{\text{CAG}}^{\text{szerin}}$ -t expresszáló ősi és evolált vonalakban mért β -galaktozidáz enzim aktivitás látható. A mért enzim aktivitásokat a vad típusban mért enzim aktivitásra vonatkoztatva ábráztuk, valamint kontrolláltunk a teljes β -galaktozidáz enzim fehérje mennyiségre is (Western blot-tal meghatározva). A hibásávok az átlag körüli 95%-os konfidencia intervallumot jelölik. **= $P < 0,01$, ***= $P < 0,001$ (Mann-Whitney U teszt).

Kontroll kísérletként az ősi és evolált vonalakban a tRNA_{CAG}^{szerin}-t hordozó plamidot üres vektorra cseréltük, ebben az esetben mindkét evolúciós időpontba egyaránt magas enzimaktivitást mértünk (17. ábra).



17. ábra. β-galaktozidáz enzim aktivitás alacsony transzlációs hibarátaájú ősi és evolált vonalakban. Az ősi és evolált vonalak tRNA_{CAG}^{szerin}-t hordozó plazmidját üres vektorra cseréltük. Az így létrehozott vonalakban mértük a β-galaktozidáz enzim aktivitást, mely értékeket a vad típusban mért enzim aktivitásra vonatkoztatva ábrázoltuk, valamint kontrolláltunk a teljes β-galaktozidáz enzim fehérje mennyiségre is (Western blot-tal meghatározva). A hibasávok az átlag körüli 95%-os konfidencia intervallumot jelölik. *= P<0,05, **= P<0,01 (Mann-Whitney U teszt).

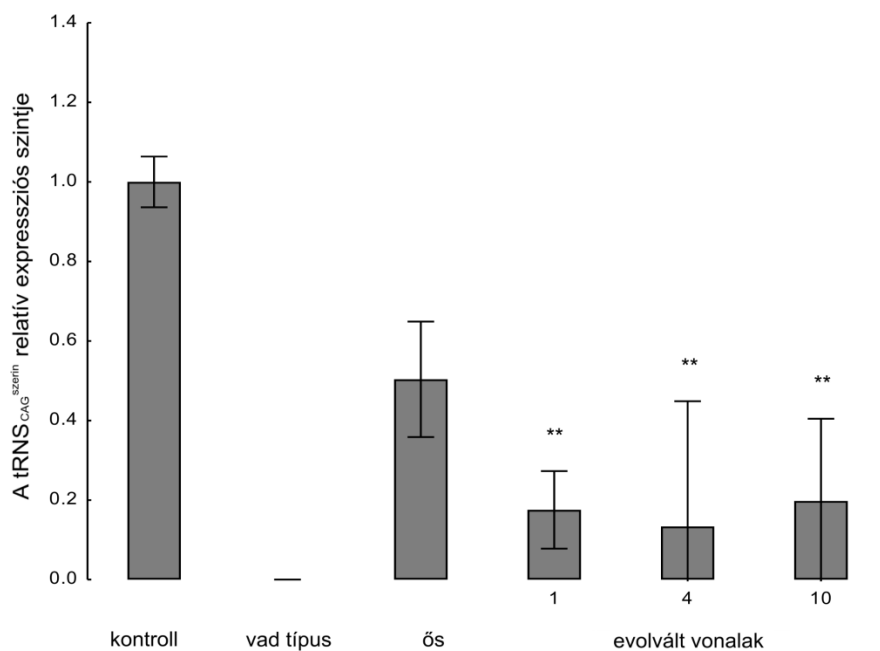
Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a laboratóriumi evolúció során kis mértékben ugyan, de csökkent a transzlációs hibaráta. Kontroll kísérletünk pedig igazolta, hogy a tRNA_{CAG}^{szerin} jelenléte előfeltétele a magas transzlációs hibarátnak.

5.6.1.3. A tRNA_{CAG}^{szerin} expressziós szintjének meghatározása

A transzlációs hibaráta mérések rámutattak, hogy az evolúció során kismértékben ugyan, de csökkent a hibás aminosavak beépülésének aránya. Ennek legvalószínűbb oka

a kétértelmű kódolásért felelős $tRNA_{CAG}^{szerin}$ expressziójának csökkenése. Feltevésünk igazolásáért Northern blot technika alkalmazásával határoztuk meg az ősi és három evolált vonalban a $tRNA_{CAG}^{szerin}$ expressziós szintjét, negatív kontrollként pedig üres, $tRNA_{CAG}^{szerin}$ -t nem expresszáló vad típust alkalmaztunk.

Méréseink kimutatták, hogy mind a három vizsgált evolált vonalban az ősi állapothoz képest szignifikánsan csökkent (két mintás t-próba, p-érték < 0,01) a mutáns tRNS expressziója (18. ábra). Ezek alapján feltételezzük, hogy a $tRNA_{CAG}^{szerin}$ csökkenő expressziója állhat a transzlációs hibaráta csökkenésének hátterében.



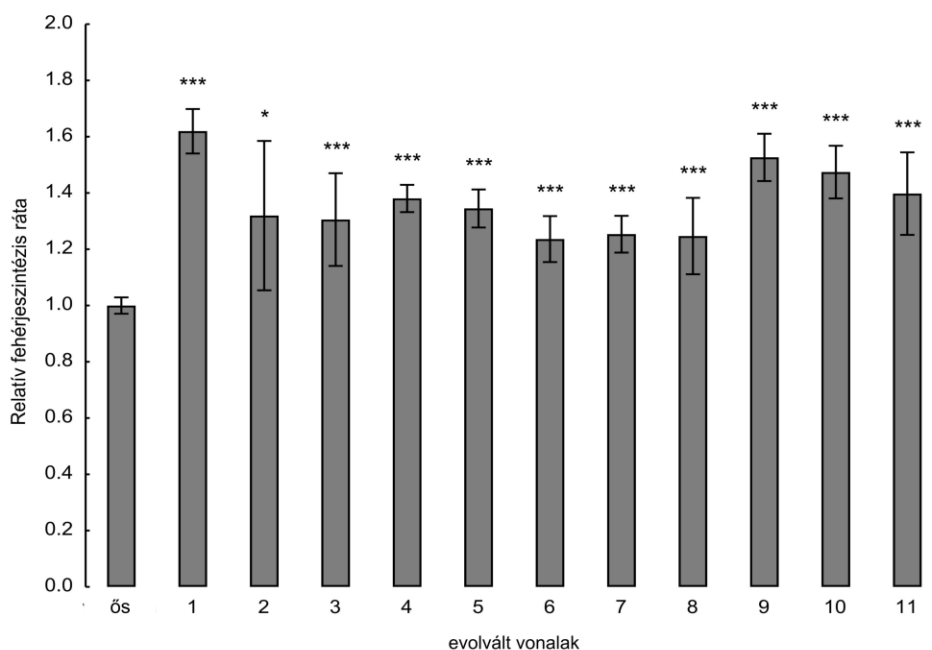
18. ábra. $tRNA_{CAG}^{szerin}$ expressziója ősi és evolált vonalakban. $tRNA_{CAG}^{szerin}$ expresszióját kontroll tRNS ($tRNA_{CCC}^{glicin}$) expressziós szintjéhez viszonyítottuk, majd a kapott értékeket *Candida albicans* SN148 törzsben mért expressziós szintre vonatkoztatva ábrázoltuk. A hibasávok az átlag körüli 95%-os konfidencia intervallumot jelölik. **= P<0,01 (Két mintás t-próba).

5.6.2. A fehérjeszintézis ráta mérése

Az evolúciós vonalak szekvenciáinak vizsgálatokor a pontmutációk és a nagy kromoszóma átrendeződések szintjén is több, a riboszóma biogenezisben, a riboszóma érésben, és a rRNS feldolgozási folyamatban közreműködő gént érintő mutációt azonosítottunk. A génexpressziós mintázatok elemzésekor pedig azt tapasztaltuk, hogy

a riboszóma biogenezis, összeszerelődés, és az aminosav bioszintézis génjeinek mRNA szintje megemelkedett. A továbbiakban azt terveztük vizsgálni, hogy a megfigyelt változások befolyásolják-e a fehérjeszintézis mértékét.

A fehérjeszintézis rátájának mérését a szakirodalomban már jól ismert $[^{14}\text{C}(\text{U})]$ -L-aminosav keveréket használó „Pulse-labeling” módszerrel végeztük (Alamgir és mtsai., 2008; Schwartz és Parker, 1999). A módszer lényege, hogy a vizsgálandó sejteket ^{14}C izotóppal jelölt aminosavakkal inkubálják, a fehérjeszintézis rátájára pedig a láncokba újonnan beépült izotóppal jelölt aminosavak mennyiségéből lehet következtetni. A fehérjeszintézis rátájának mérését mind ősi, mind evolált genetikai háttéren elvégeztük. Annak érdekében, hogy csak a mutációk fehérjeszintézisre gyakorolt hatását vizsgáljuk, és a magas translációs hibarata által okozott növekedési hátrány ne befolyásolja a mérési eredményeket, a $\text{tRNA}_{\text{CAG}}^{\text{szerin}}$ -t hordozó plazmidot üres vektorra cseréltük mind az ősi, mind az evolált vonalakban. Így a különböző evolúciós idejű vonalak között mért különbségek kizárólag az eltérő mutációs háttérből adódnak. Méréseink során az evolált vonalakban az ősi állapothoz képest szignifikánsan magasabb (kétmintás t-próba, p-érték $< 0,05/0,01/0,001$) translációs rátát mutattunk ki (19. ábra).



19. ábra. A fehérjeszintézis ráta evolúciója. Az ősi és evolált vonalak $\text{tRNA}_{\text{CAG}}^{\text{szerin}}$ -t hordozó plazmidját üres vektorra cseréltük. Az ősi és evolált vonalakban mértük a radioaktívan jelölt aminosavak beépülését, a kapott értékeket az ősen mért beépülési arányra vonatkoztatva ábrázoltuk. A hibaszávok az átlag körüli 95%-os konfidencia intervallumot jelölik. * = $P < 0,05$ ** = $P < 0,01$ *** = $P < 0,001$ (kétmintás t-próba).

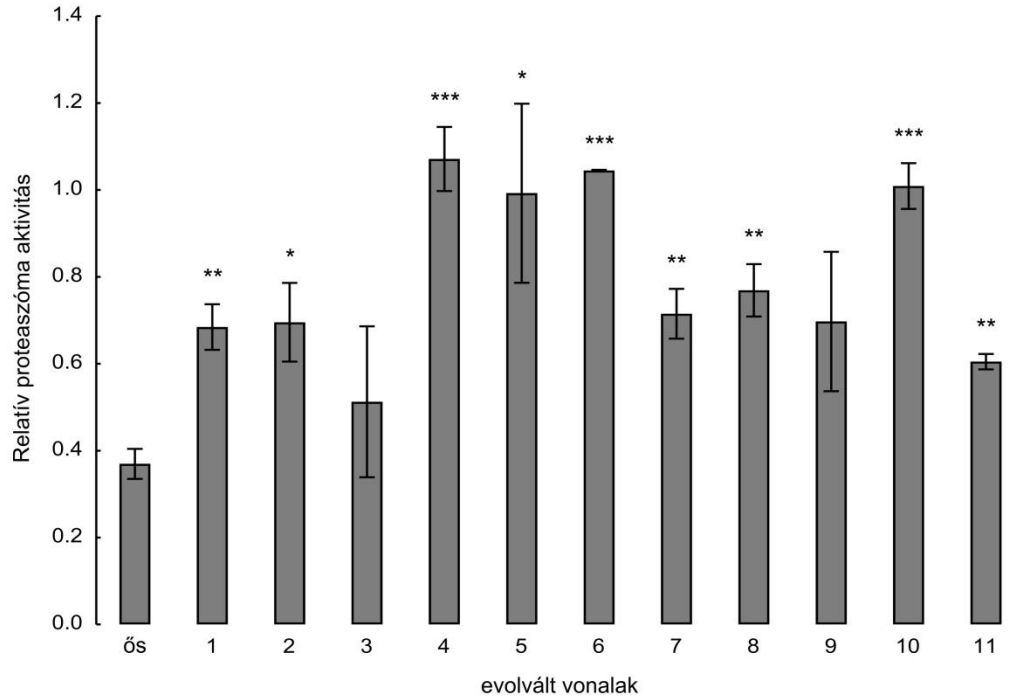
5.6.3. A proteaszóma aktivitás mérése

Az előbbieken vizsgáltuk azt, hogy mi lehetett a translációs hibák növekedési rátát csökkentő hatásainak fő komponense. Eredményeink azt mutatták, hogy a magas translációs hibaráta növeli az aggregálódó fehérjék sejten belüli arányát. Azt is vizsgáltuk, hogy az adaptációs folyamat alatt hogyan változik az aggregálódó fehérjék aránya. Ennek alapján kimutattuk, hogy az alkalmazkodás során az evolvált vonalakban csökkent az aggregálódó fehérjék sejten belüli aránya. Közismert, hogy a sejtekben keletkező fehérje aggregátumok lebontását a proteaszóma végzi. Ennek ismeretében azt kívántuk vizsgálni, hogy az evolúció során tapasztalt csökkenő fehérje aggregációs ráta milyen kapcsolatban áll a proteaszómák aktivitásával.

A tRNA_{CAG}^{szerin} -t expresszáló evolúciós vonalak genom szekvenciáinak elemzése egy erős párhuzamos evolúciós jelenségre irányította a figyelmünket. A vizsgált vonalak több mint 90%-ában megfigyeltük, hogy az V. kromoszóma részleges deléciójával két proteaszómális lebontáshoz kapcsolható gén (az *UBP3* és az *UBP5*) kópiaszáma csökkent az evolúció során. A megfigyelt mutációk a továbbiakban az adaptáció és a proteaszóma aktivitás összefüggéseinek vizsgálatára sarkalltak minket.

Az ősi és evolvált vonalak proteaszóma aktivitásának mérésére egy korábban már leírt, fluorogén peptid szubsztrát alkalmazásán alapuló módszert választottunk (Demasi és mtsai., 2003). Ezzel a módszerrel a 20S proteaszóma kimotripszin-szerű aktivitása határozható meg. Vad típusú, valamint ősi és evolvált tRNA_{CAG}^{szerin} -t expresszáló vonalak exponenciális fázisú kultúrájából fehérje kivonatot készítettünk, és ezt inkubáltuk a fluorogén szubsztrátot (s-LLVY-MCA) tartalmazó reakcióeleggyel. A proteaszóma enzimaktivitásával arányos mértékben bontja a szubsztrát molekulákat. A keletkezett termék megfelelő hullámhosszon (365 nm) megvilágítva fluoreszcens jelet bocsát ki, melynek erősségéből következtethetünk az enzimaktivitás mértékére.

Az ősi és evolvált magas translációs hibarátajú vonalak proteaszóma aktivitását ilyen módon összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy az őshöz képest az evolúciós vonalakban 1,4-2,8-szor magasabb proteaszómális aktivitás volt mérhető, ez a vonalak többségénél statisztikailag szignifikáns (kétmintás t-próba, p-érték < 0,05/0,01/0,001) emelkedést jelentett (20. ábra).

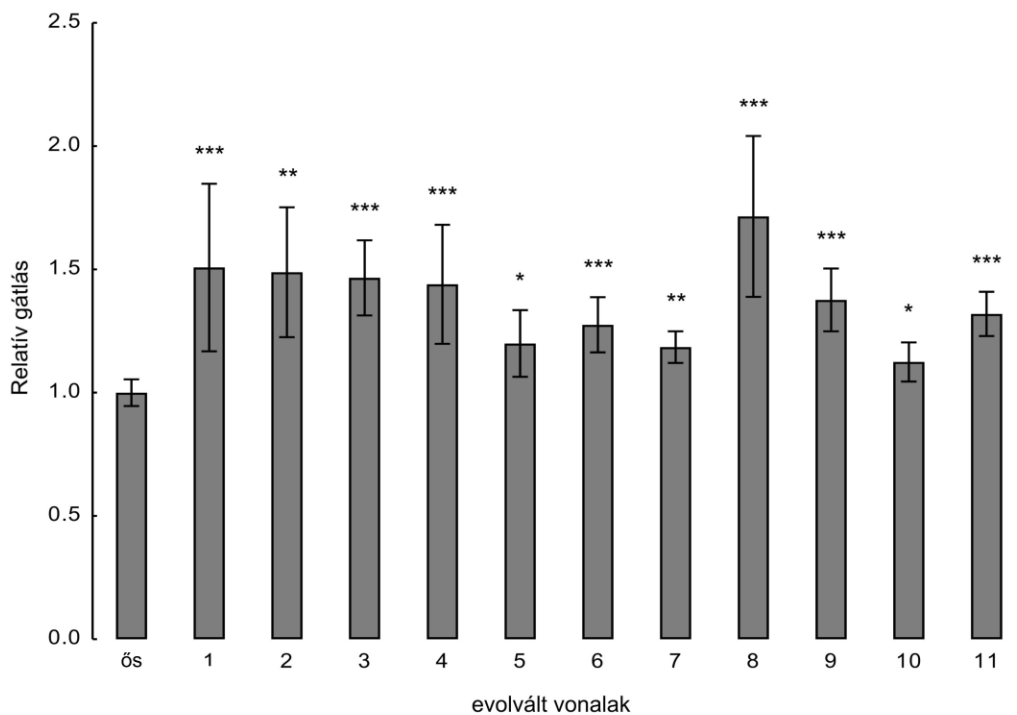


20. ábra. A proteasóma aktivitás változása az evolúció alatt. A magas transzlációs hibaráttájú ősi és evolvált vonalak proteasómális aktivitás értékeit vad típusú tRNA_{CAG}^{szerin}-t nem expresszáló törzs aktivitására vonatkoztatva ábrázoltuk. A hibásávok az átlag körüli 95%-os konfidencia intervallumot jelölik. *= P<0,05 **= P<0,01 ***= P<0,001 (Kétmintás t-próba).

5.6.4. Az adaptáció és a cikloheximid érzékenység kapcsolatának vizsgálata

Korábban megállapítottuk, hogy az evolúciós kópiaszám változás a vizsgált vonalak több mint 90%-ában érintette az *UBP3* gént (5.6.3. fejezet). Ez a gén egy deubiquitináló enzimet kódol, mely a proteasómális lebontásra kijelölt fehérjékről távolítja el az ubiquitineket, ezáltal növelve a sejtekben szabadon felhasználható ubiquitinek mennyiségét (Öling és mtsai., 2014). Így ha a génkópiaszám vesztés következtében csökken az Ubp3p fehérje mennyisége, akkor ez a sejtek szabad ubiquitin készletének csökkenésével jár, ezzel párhuzamosan pedig nő a proteasómális lebontási útra terelt fehérjék aránya (Öling és mtsai., 2014). A szabad ubiquitin készlet nélkülözhetetlen olyan fehérjeszintézis gátló szerek, mint a cikloheximid melletti túléléshez (Hanna és mtsai., 2003). Az említett összefüggések alapján az evolvált vonalak fokozott érzékenységét vártuk. Elméletünk tesztelésére ősi és evolvált vonalak érzékenységét vizsgáltuk 0.06 µg/ml koncentrációjú cikloheximidet tartalmazó folyadék kultúrában.

A vizsgált fehérjeszintézis gátló szerrel szembeni érzékenységre a populációk növekedési rátájából következtettünk, melyet optikai denzitás mérésen alapuló módszer segítségével határoztuk meg. Annak érdekében, hogy a növekedési rátát ne befolyásolja a magas transzlációs hibaráta, és csak a genomi mutációk érzékenyítő hatását vizsgáljuk, a tRNS_{CAG}^{szerin}-t hordozó plazmidot üres vektorra cseréltük mind az ősi, mind az evolált vonalakban. Az így létrehozott vonalakat vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a cikloheximid az evolúciós vonalak növekedését az őshöz képest szignifikánsan nagyobb mértékben gátolta (Mann-Whitney U teszt, p-érték < 0,05/0,01/0,001) (21. ábra), ez az evolált vonalak fokozottabb érzékenysége utal. Eredményeink így megfeleltek a csökkent Ubp3p és a cikloheximid érzékenység összefüggésében vártaknak.

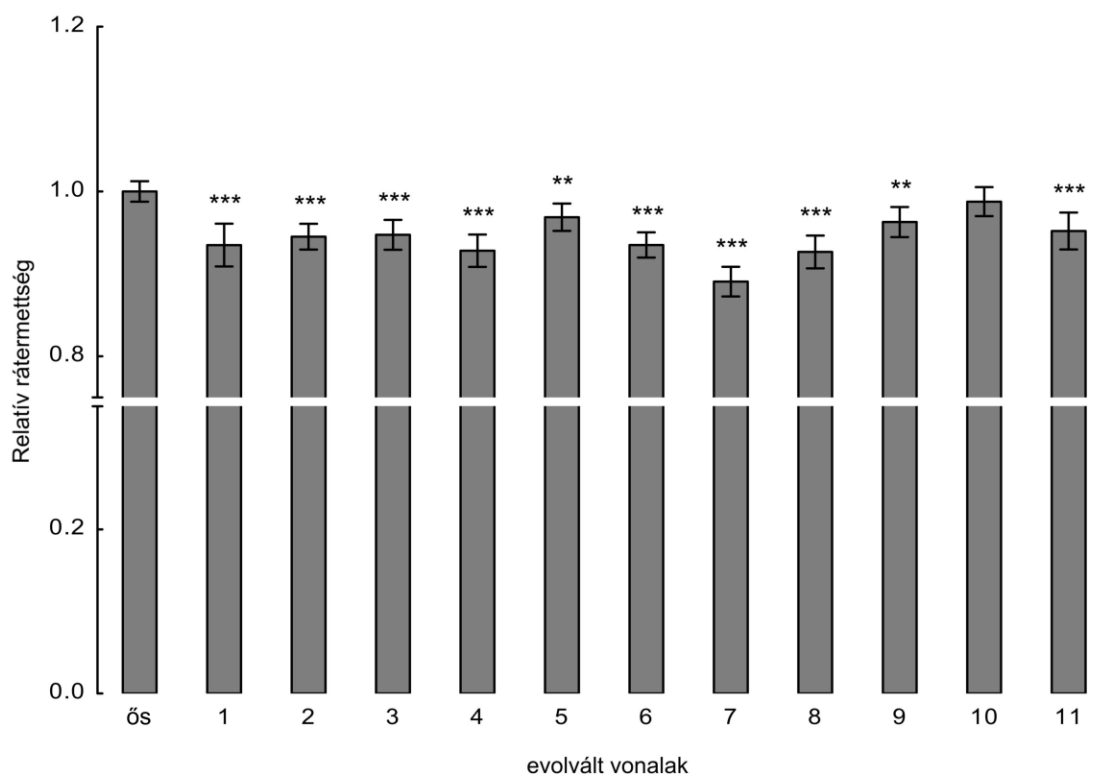


21. ábra. Ősi és evolált vonalak gátlása cikloheximiddel. Az ősi és evolált vonalak tRNA_{CAG}^{szerin}-t hordozó plazmidját üres vektorra cseréltük. 0.06 µg/ml cikloheximid jelenlétében mértük a vonalak növekedési rátáját. A gátlás mértékét a stresszmentes környezetben mért növekedési rátára normalizáltuk, és az értékeket a vad típusban számolt értékére vonatkoztatva ábrázoltuk. A hibasávok az átlag körüli 95%-os konfidencia intervallumot jelölik. *= P<0,05 **= P<0,01 ***= P<0,001 (Kétmintás t-próba)

5.7. Az adaptáció mellékhatásainak azonosítása

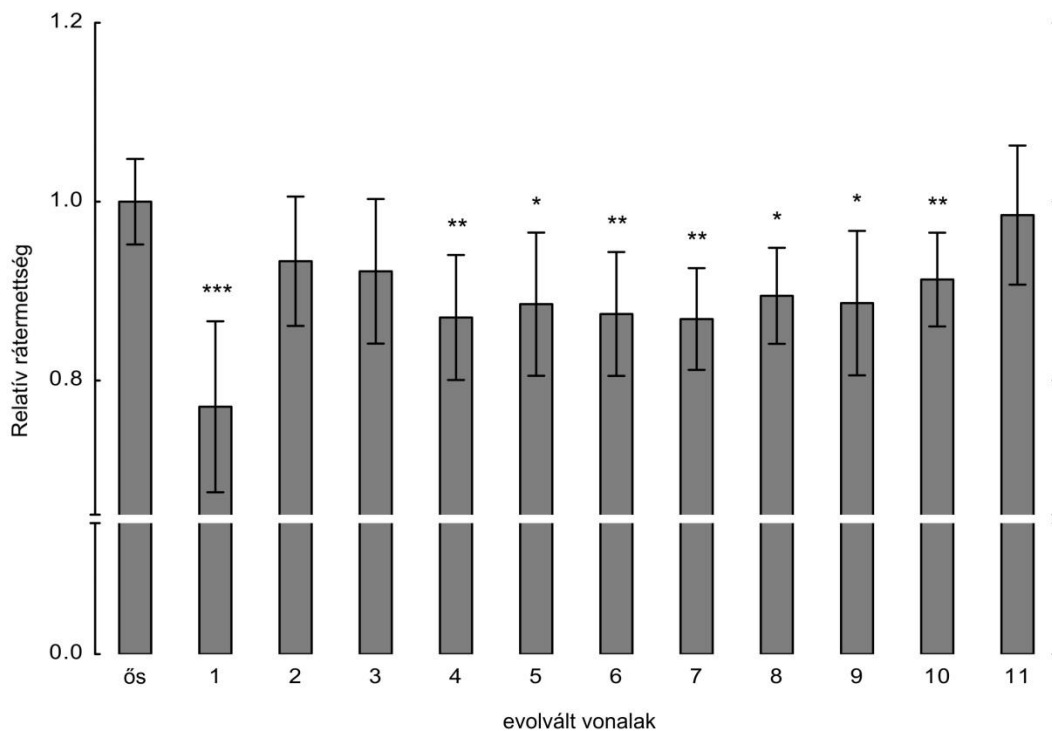
5.7.1. Az életképesség vizsgálta tápanyag limitáció mellett

Vizsgálatainkkal az előzőekben kimutattuk, hogy a magas transzlációs hibarátahoz történő alkalmazkodás eredményeként az evolált vonalakban megemelkedett a transzláció és proteaszómális fehérje lebontás rátája. Ismert, hogy ezen sejtfolyamatok csak energia befektetés révén valósulhatnak meg, emelkedett szintjük ezért energetikai értelemben még költségesebb lehet a sejtek számára. Tápanyagban szegény környezeti feltételek között ez a költség tovább nőhet, hiszen a sejtek nem képesek kielégíteni a megnövekedett energiaigényt, ami így életképesség csökkenéshez vezethet. Feltevéseink igazolására ősi és evolált vonalak rátermettségét vizsgáltuk tápanyagban szegény környezeti körülmények között. A populációk növekedési rátáját felére csökkentett szénforrás tartalmú (SC-leucin+1% glükóz), valamint negyedére csökkentett aminosav tartalmú (SC-leucin+0,25% aminosav keverék) tápoldatban mértük, optikai denzitás mérésen alapuló módszer segítségével. Azért, hogy a magas transzlációs hibaráta növekedésre gyakorolt hatásait mellőzzük és csak a fokozott energiaigény tápanyagszegény körülmények melletti hatásait vizsgálhassuk, a tRNS_{CAG}^{szerin}-t hordozó plazmidot üres vektorra cseréltük mind az ősi, mind az evolált vonalakban. Az így létrehozott vonalak növekedési rátáját szénforrásban szegény környezetben mérve az evolált vonalak az őshöz képest alacsonyabb növekedési rátát mutattak (22. ábra), ez a különbség egy vonal kivételével statisztikailag szignifikáns is volt (Mann-Whitney U-teszt, p-érték < 0,05/0,01/0,001).



22. ábra. Ősi és evolált vonalak rátermettsége szénforrásban szegény környezeti feltételek mellett. Az ősi és evolált vonalak tRNA_{CAG}^{szerin}-t hordozó plazmidját üres vektorra cseréltük. A szénforrásban szegény feltételek között mért növekedési rátákat az ősi növekedési rátájára vonatkoztatva ábrázoltuk. A hibásávok az átlag körüli 95%-os konfidencia intervallumot jelölik. *= P<0,05 **= P<0,01 ***= P<0,001 (Mann-Whitney U teszt)

Aminosavban szegény körülmények között is mértük az ősi és evolált vonalak növekedési rátáját. Eredményeink alapján az evolált vonalak az őshöz képest növekedési hátrányba kerültek aminosav szegény környezetben (23. ábra). Az evolált vonalak többségében ez a hátrány szignifikáns mértékű volt (Mann-Whitney U-teszt, p-érték < 0,05/0,01/0,001).



23. ábra. Ősi és evolált vonalak rátermettsége aminosavban szegény környezeti feltételek mellett. Az ősi és evolált vonalak tRNA_{CAG}^{szerin}-t hordozó plazmidját üres vektorra cseréltük. A aminosavban szegény feltételek között mért növekedési rátákat az ősi növekedési rátájára vonatkoztatva ábrázoltuk. A hibaszávok az átlag körüli 95%-os konfidencia intervallumot jelölik. *= P<0,05 **= P<0,01 ***= P<0,001 (Mann-Whitney U teszt)

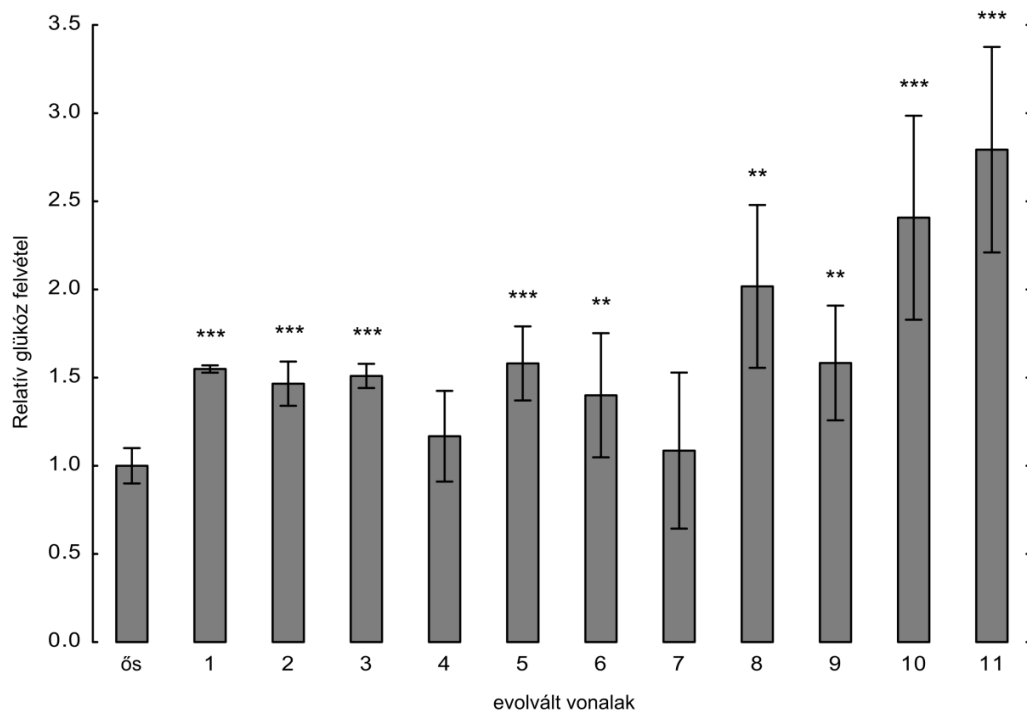
A fenti mérési eredményeink tehát igazolták, hogy a felgyorsult transláció és az emelkedett lebontási ráta fokozott energiaigénye tápanyagszegény környezetben a sejtek rátermettségének csökkenését vonja maga után.

5.7.2. A glükóz felvétel mérése

Az adaptáció általunk megismert mechanizmusai, a növekvő translációs és lebontási ráta fokozott energia igényvel rendelkező folyamatok. Ez az energetikai költség egy újabb szelekciós nyomásként jelentkezhetett az evolúció során, hiszen ahhoz, hogy a sejtek megmarthassák életképességüket, alkalmazkodniuk kellett a megváltozott belső körülményekhez. A továbbiakban azt kívántuk felderíteni, hogy milyen evolúciós megoldás tette lehetővé a sejtekben növekvő energiaigény kielégítését. Ennek érdekében vizsgáltuk, hogy az alkalmazkodási periódus alatt növelték-e a sejtek a

környezetből felvett cukor mennyiségét. A sejtek által felvett glükóz mennyiségét egy közvetett módszer segítségével határoztuk meg, mely során a tápoldat glükóz tartalmát mértük (Torres és mtsai., 2007). A kísérletek elvégzéséhez az ősi és evolált vonalakban a tRNS_{CAG}^{szerin}-t hordozó plazmidot üres vektorra cseréltük, hogy kizárólag az evolúciós változások glükóz felvételre gyakorolt hatását vizsgálhassuk. Erre azért volt szükség, mert a magas transzlációs hibaráta önmagában csökkenti a növekedési rátát, és így a glükóz felvételt is befolyásolja.

Az ősi és evolált populációkat tápoldatban növesztettük, miközben növekedésüket nyomon követtük, és enzimatikus módszerrel mértük a tápoldatból fogyó glükóz mennyiségét. Eredményeink azt mutatták, hogy az ősi populációhoz képest az evolált vonalak több glükóz molekulát vettek fel sejtenként (24. ábra). Az evolált vonalak többségénél szignifikánsan magasabb (kétmintás t-próba, p-érték < 0,05/0,01/0,001) glükóz felvételi rátát mértünk.

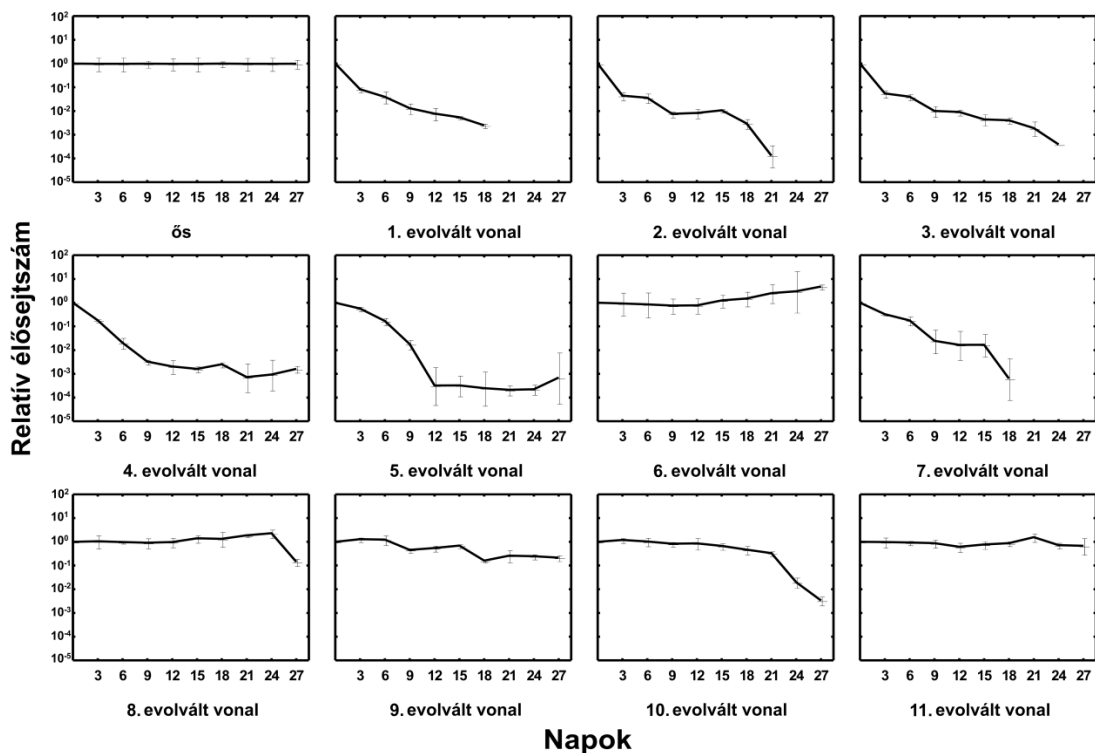


24. ábra. A glükóz felvétel mértéke ősi és evolált vonalakban. A glükóz felvétel méréséhez az ősi és evolált vonalak tRNS_{CAG}^{szerin}-t hordozó plazmidját üres vektorra cseréltük. A mért glükóz felvételi értékeket az ősből mért értékre vonatkoztatva ábrázoltuk. A hibaszávok az átlag körüli 95%-os konfidencia intervallumot jelölik. *= P<0,05 **= P<0,01 ***= P<0,001 (Kétmintás t-próba).

5.7.3. A kronológiai élettartam mérése

Mint minden adaptációs folyamat, így a magas transzlációs hibarátához történő alkalmazkodás is költség-haszon elvek mentén valósulhatott meg. Az evolált vonalak képessé váltak a transzlációs hibák által okozott károk mérséklésére egyéb, külső stressztől mentes környezetben. Feltételezéseink szerint az alkalmazkodási folyamatoknak mellékhatása is létezik, mely jelentheti azt, hogy az evolált vonalak bizonyos élettani sajátágaikban alulmúlják az ősi populációt. Figyelmünket ezután az adaptációs mellékhatások felderítésére irányítottuk.

Hiteles kronológiai élettartam mérési módszerrel (Fabrizio és mtsai., 2010) vizsgáltuk ősi és evolált vonalak élettartamát teljes tápanyag megvonás mellett. Azért, hogy az adaptáció élettartamra gyakorolt hatását közvetlenül vizsgálhassuk, a különböző evolúciós idejű magas transzlációs hibarátájú vonalak tRNS_{CAG}^{szerin}-t expresszáló vektorját üres plazmidra cseréltük. Az így létrehozott törzseket tápanyag mentes közegben, steril vízben tartottuk, és az élő sejtszámot időről időre agar lemezre történő szélesztéssel meghatároztuk, így követtük nyomon a kultúrák öregedését. A populációk élő sejtszámának csökkenését vizsgálva megállapítottuk, hogy a 11 evolált vonalból 8 az őshöz képest gyorsabban öregedett (25. ábra). Az evolúció során csökkent a populációk kronológiai élettartama, ami az adaptáció mellékhatásaként értelmezhető.



25. ábra. Ősi és evolvált vonalak túlélése teljes tápanyag megvonás mellett.

5.7.4. A ribofágia mértékének meghatározása

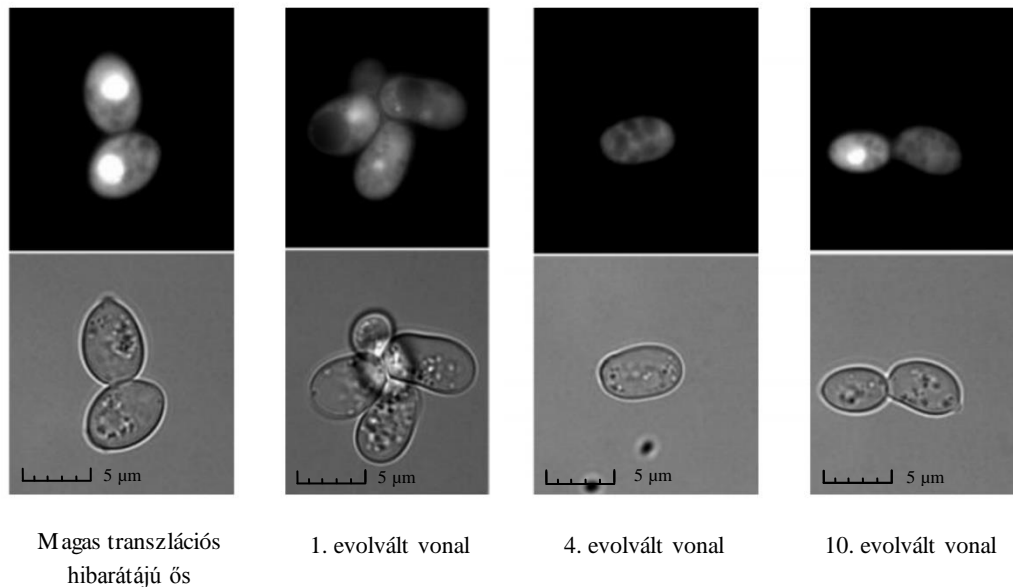
Az előzőekben az evolúciós vonalak többségénél a kronológiai élettartam csökkenését figyeltük meg, melyet az adaptáció melléktermékeként azonosítottunk. A továbbiakban olyan módszert kerestünk, mellyel a magas translációs hibarátához való adaptáció és a mellékhatásként megjelent gyorsabb öregedés közötti kapcsolatokat feltárhatja.

Ismert, hogy tápanyagban szegény környezeti feltételek között az érett riboszómák autofágia révén szelektív lebontásra kerülnek (Kraft és mtsai., 2008). A transláció jelentős energetikai költsége miatt a sejtek így szabályozzák a szükségleteiknek megfelelő riboszómák mennyiségét. Ezt a jelenséget ribofágiának nevezik (Korolchuk és mtsai., 2010; Kraft és mtsai., 2008). A ribofágiához nélkülözhetetlen az *UBP3* gén expressziója (Kraft és mtsai., 2008), így feltételeztük, hogy az evolvált vonalakban megfigyelt *UBP3* kópiaszám csökkenés befolyásolta az érett riboszómák lebontását. A ribofágia mértékének számszerűsítéséhez egy szakirodalomban jól dokumentált, fluoreszcens mikroszkópiát használó módszert választottunk (Kraft és mtsai., 2008).

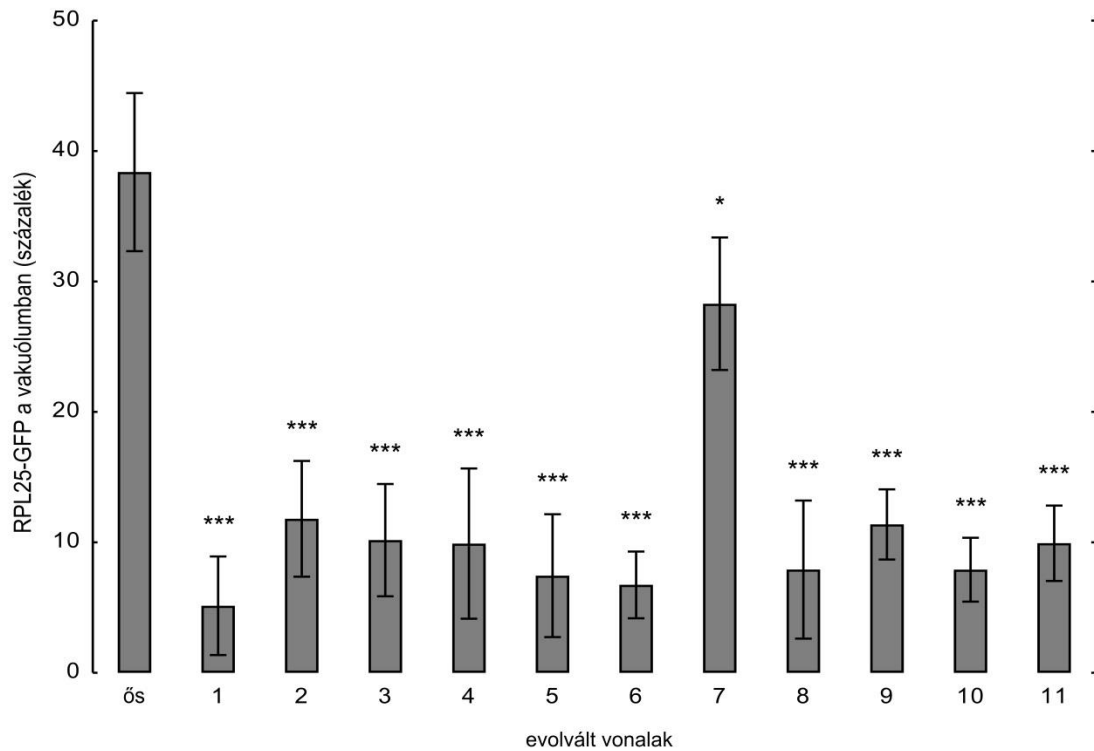
A módszer segítségével egy fluoreszcensen jelölt riboszómális fehérje (Rpl25p-GFP) sejten belüli eloszlása követhető tápanyagban gazdag-, illetve szegény körülmények

között. A jel sejten belüli eloszlása a működő, illetve már aegységeire bontott riboszómák arányáról ad információt. Ha a környezet tápanyagban gazdag, akkor a riporter fehérje egyenletesen oszlik el a sejtekben, jelezve, hogy hol vannak a működő riboszómák. Ha azonban a sejtek tápanyagban szegény környezetbe kerülnek, a vakuólumban halmozódnak fel a fluoreszcensen jelölt fehérjék, ezzel jelezve, hogy az érett riboszómák lebontása folyamatban van (Kraft és mtsai., 2008).

A módszer segítségével tápanyagszegény körülmények között követtük az Rpl25p-GFP lokalizációját $tRNS_{CAG}^{szerin}$ -t expresszáló ősi és evolált vonalakban. Eredményeink azt mutatták, hogy az őshöz képest mind a 11 evolált vonalban szignifikánsan (Mann-Whitney U teszt, p -érték $< 0,05/0,001$) csökkent a vakuólumban található riporter fehérjék mennyisége (26. és 27. ábra).



26. ábra. A fluoreszcens Rpl25p-GFP eloszlása magas translációs hibarátájú ősi és evolált vonalakban.



27. ábra. Vakuólum specifikus fluoreszcens jel aránya magas transzlációs hibarátájú ősi és evolvált vonalakban. A hibásávok az átlag körüli 95%-os konfidencia intervallumot jelölik. ***= $P < 0,001$ (Mann-Whitney U teszt)

A kapott mintázat alapján az látszik, hogy mind a 11 evolvált vonalban csökkent a ribofágia mértéke, azonban ez csak 10 vonal esetén magyarázható az *UBP3* gén alacsonyabb kópiaszámával, hiszen a 7. evolúciós vonalban nem volt megfigyelhető ez a mutáció. A 7. vonalban mért vakuoláris riporter lokalizáció arány a többi evolúciós vonallal összevetve szignifikáns különbséget mutatott (Mann-Whitney U teszt, p -érték $< 0,05$).

6. Az eredmények megvitatása

A translációs hibák ugyan változatos módon károsíthatják a normális életfolyamatokat, azonban a sejtek az életképességet csökkentő hatások egy részét képesek tompítani. Jelen dolgozat témájául szolgáló munka során elsősorban a káros hatásokra összpontosítottunk.

Munkánk során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. *Saccharomyces cerevisiae* sejtekben laboratóriumi evolúció során mérsékelhető-e a mesterségesen megemelt translációs hibaráta okozta rátermettség csökkenés?
2. A translációs hibák okozta rátermettség csökkenés hátterében milyen okok állhatnak?
3. Milyen genetikai és sejtéletani változások teszik lehetővé az emelkedett translációs hibaráttal szembeni alkalmazkodást?
4. Az emelkedett translációs hibaráttal szembeni alkalmazkodással párhuzamosan milyen evolúciós mellékhatások azonosíthatók?

6.1. A magas translációs hibaráta okozta rátermettség csökkenés laboratóriumi evolúció alatt gyorsan kompenzálható

A translációs hibák rátermettségre gyakorolt hatásainak vizsgálatához egy korábban, létrehozott *Saccharomyces cerevisiae* alapú modellt használtunk (Santos és mtsai., 1996, 1999). *Candida albicans* tRNS_{CAG}^{szerin} génjének egyszeres kópiaszámú plazmidról történő expressziójával diploid pékélesztő sejtekben mesterségesen megemeltük a translációs hibaráttát. Az új mutáns tRNS expressziójával a CUG pozíciókba az eredeti leucin mellett szerin beépülése is lehetségessé vált, ezzel a CUG kodonok kétértelmű meghatározását idéztük elő. Korábbi tömegspektrometriai mérések alapján a *Candida* tRNS_{CAG}^{szerin} expressziója pékélesztőben a CUG pozíciók 1,4%-ban eredményezett hibás szerin beépülést, így az alkalmazott genetikai konstrukcióval akár 1400-szorosára emelhető a translációs hibaráta (Stansfield és mtsai., 1998). Kísérleti modellünket vizsgálva β -galaktozidáz enzim aktivitás méréssel igazoltuk, hogy a *Candida albicans* tRNS_{CAG}^{szerin} génjének pékélesztőben történő kifejeztetése a vad típushoz képest szignifikáns mértékben emeli a translációs hibaráttát (7. ábra).

A $tRNS_{CAG}^{szerin}$ -t expresszáló magas hibarátájú törzs növekedési rátáját vad típusú törzshöz viszonyítva azt tapasztaltuk, hogy a magas translációs hibaráta 40%-os rátermettség csökkentést okozott (8. ábra első két oszlop). Ezt követően egy megközelítőleg 250 generációig tartó laboratóriumi evolúciót végeztünk 11 alacsony és 11 magas translációs hibarátájú vonallal. Az evolúciót követően megállapítottuk, hogy a kezdeti növekedési rátához képest mind a 11 párhuzamosan evolváló vonalban szignifikánsan, 13,3%–51,7% közötti mértékben emelkedett a növekedési ráta (8. ábra). Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy a magas translációs hibaráta okozta kezdeti rátermettség csökkenés már egy viszonylag rövid idejű alkalmazkodási periódus alatt is részben kompenzálható. Több független bizonyíték is alátámasztja, hogy a tapasztalt rátermettség növekedés valóban a magas translációs hibarátához való alkalmazkodás eredménye:

1. Az evolúciós kísérletben részt vevő vad típusú, alacsony hibarátájú vonalak növekedési rátája mindössze 3,7%-kal emelkedett (9. ábra). Ez azt jelzi, hogy a tápoldathoz való alkalmazkodás elhanyagolható mértékben játszik csak szerepet az adaptációs folyamatokban.
2. A magas translációs hibarátáért felelős $tRNS_{CAG}^{szerin}$ -t hordozó plazmidok szekvenciája változatlan maradt az evolúció során (10. ábrán illusztrálva: $tRNA_{CAG}^{szerin}$ gén szekvenciái), ez azt igazolja, hogy az evolúció során tapasztalt rátermettség növekedés nem a vektoron megjelenő inaktíváló mutációk eredménye.
3. A magas translációs hibaráta mellett evolválódott vonalakban a $tRNS_{CAG}^{szerin}$ -t hordozó plazmidokat üres vektorra cseréltük, az így létrehozott vonalak többségénél az alacsony translációs hibarátájú őshöz képest szignifikánsan alacsonyabb növekedési rátát mértünk (11. ábra). Ez alapján megállapítottuk, hogy a létrejött evolúciós adaptációs mechanizmusok csak a magas translációs hibaráta jelenléte mellett előnyösek, egyéb körülmények között negatívan befolyásolják a rátermettséget.

6.2. A magas translációs hibaráta elsősorban a fehérjék aggregációján keresztül okoz rátermettség csökkenést

A magas translációs hibaráta rátermettség csökkentő hatása a fehérjék hibás feltekeredése, összecsapódása, és a létrejött fehérje-aggregátumok sejtkárosító hatása révén is megvalósulhat (Drummond és Wilke, 2009). Ez az elmélet már kísérleti úton is bizonyítást nyert, miszerint $tRNS_{CAG}^{szerin}$ expressziója élesztőben proteotoxikus stresszhez, és az ehhez tartozó válaszreakciók kiváltásához vezet (Paredes és mtsai., 2012). Ezek tekintetében kívántuk felderíteni a translációs hibaráta és a fehérje aggregáció kapcsolatát. Egy fluoreszcens, aggregációra hajlamos riporter fehérje (VHL-mCherry) sejteken belüli eloszlását vizsgálva következtettünk a fehérje aggregáció mértékének laboratóriumi evolúció alatti változására. Méréseink alapján elmondható, hogy az ősi állapotban a magas translációs hibaráta szignifikánsan növelte a fehérje aggregáció mértékét, az evolúciót követően azonban mind a 11 evolúciós vonalban az aggregáció mértékének szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető (12. ábra). Ezek alapján elmondhatjuk, hogy az evolúció elsősorban a fehérje aggregáció csökkentésére irányult. A fehérje egyensúly fenntartása valóban nélkülözhetetlen a sejtek túlélésének szempontjából (Hartl és mtsai., 2011). A képződött hibás fehérjék megfelelő konformációba segítése vagy lebontása a dajkafehérjék és a proteasóma együttes működése révén valósul meg (Powers és Balch, 2013). Ha ezek a minőségellenőrző rendszerek túlterheltek, az a hibás fehérjék felhalmozódásához és aggregálódásához vezethet (Hipp és mtsai., 2014).

Az evolúciós vonalakban megfigyelt nagy kiterjedésű részleges és teljes kromoszóma duplikációk (1. táblázat) akár a fehérje aggregációs ráta növekedését is okozhatnák, hiszen ezekről a genomi régiókról nagyobb mennyiségben termelődő fehérjék a translációs minőségellenőrző rendszerek túlterhelését eredményezhetik (Oromendia és mtsai., 2012). A növekvő mértékű fehérje aggregáció pedig negatívan befolyásolná az életképességet. Korábbi kutatások azonban kimutatták, hogy az *UBP6* deubiquitináló enzim génjében bekövetkezett inaktíváló mutációk növelik az aneuploid élesztő törzsek (olyan haploid törzsek, melyek bizonyos kromoszómák tekintetében diploidok) életképességét a mutációt nem hordozó aneuploid törzsekhez képest (Torres és mtsai., 2010). Torres és munkatársai feltételezik, hogy megfigyelt kompenzáló hatás hátterében a mutációk következtében emelkedő proteasómális lebontási aktivitás állhat (Torres és mtsai., 2010). Ennek tükrében valószínűsíthjük, hogy az evolúciós vonalakban a

deubiquitináz enzim gének (*UBP3* és *UBP6*) csökkent kópiaszáma, valamint az ezzel párhuzamosan megfigyelt emelkedett fehérje-lebontási aktivitás együttesen segítette csökkenteni a fehérje aggregációs ráta mértékét, ezzel megakadályozva a minőségellenőrző rendszerek túltelítődését és az ezzel járó életképesség csökkenését. Emellett a részleges duplikációk a riboszómális gének kópiaszám növelése révén a transláció felgyorsításában vesznek részt, ezért hatásuk evolúciós szempontból inkább előnyösnek, mint hátrányosnak tekinthető.

6.3. A magas translációs hibarátahoz való alkalmazkodás kialakulása laboratóriumi körülmények között

A translációs hibákkal szemben kialakult védekező mechanizmusoknak két fajtája ismert: az egyik csoportba a hibák megjelenési arányának csökkentésére irányuló, míg a másik csoportba a már meglévő hibák által okozott káros hatások mérséklését célzó folyamatok tartoznak (Drummond és Wilke, 2008). Funkcionális genomikai és biokémiai módszereket alkalmaztunk annak eldöntésére, hogy pékéslesztőben a mesterségesen megemelt translációs hibarátahoz történő alkalmazkodás a hibaráta csökkentése, a hibák által okozott káros hatások mérséklése, esetleg mindkettő révén valósult-e meg.

6.4. Az adaptációs folyamatokban a translációs hibaráta csökkentése csak kisebb mértékben játszik szerepet

A magas translációs hibarátahoz történő evolúciós alkalmazkodás egyik módja a translációs hibák megjelenési arányának csökkentése (Drummond és Wilke, 2009). Az evolúciós vonalak genomszekvenciáinak vizsgálatakor azonosítottunk olyan mutációkat (tRNS transzkripcióban, tRNS exportban, tRNS minőségellenőrzésben- és lebontásban fontos génekben, valamint a tRNS_{AGA}^{szerin} génben) (Függelék, 1. táblázat), melyek a tRNS stabilitásnak-, sejten belüli arányának-, és aminosavval való töltésének megváltoztatásán keresztül akár a translációs hibaráta is csökkenthető. Biokémiai teszt (β -galaktozidáz enzim módszer) segítségével megállapítottuk, hogy az evolúció során kis mértékben ugyan, de csökkent a tRNS_{CAG}^{szerin}-t expresszáló vonalakban a translációs hibaráta mértéke (16. ábra). A translációs hibarátaért felelős tRNS_{CAG}^{szerin} expresszióját három kiválasztott evolált vonalban mérve a mutáns tRNS

expressziójának szignifikáns csökkenését tapasztaltuk (18. ábra). Ez arra enged következtetni, hogy a tapasztalt hibaráta csökkenés háttérében a tRNS_{CAG}^{szerin} expressziójának csökkenése is állhat. Fontos azonban kijelenteni, hogy sem a translációs hibaráta, sem a mutáns tRNS expressziójának csökkenése nem volt olyan mértékű, hogy ezt tekinthessük az adaptáció fő mechanizmusának.

6.5. A translációs hibákkal szembeni toleranciát az evolúció alatt felgyorsuló fehérje körforgás biztosítja

A sejtek evolúciósan kifejleszthetnek védekező mechanizmusokat a gyakran megjelenő translációs hibák káros hatásainak mérséklésére. Ilyenkor nem a hibák megjelenési aránya, csupán a rendszer károkkal szembeni érzékenysége csökken (Drummond és Wilke, 2009), ezzel a robusztussága emelkedik. Munkánkban a funkcionális genomika és a biokémia eszközeit egyesítve vizsgáltuk, hogy a rendszer laboratóriumi evolúció alatt kialakult robusztussága áll-e a mesterségesen megemelt translációs hibarátához történő alkalmazkodás háttérében.

Biokémiai módszerek segítségével kimutattuk, hogy a magas translációs hibarátájú vonalakban az evolúció során szignifikánsan emelkedett a translációs ráta (19. ábra) és a proteaszómális degradáció mértéke is (20. ábra). A translációs ráta emelkedését radioaktívan jelölt aminosavak beépülési arányának mérésével határoztuk meg, a proteaszómális lebontás emelkedését pedig s-LLVY-MCA fluorogén szubsztrátot alkalmazva mutattuk ki.

A felépítő és lebontó folyamatok szintjének emelkedésével gyorsul a fehérjék körforgása (Ryazanov és Nefsky, 2002). Méréseink alapján arra következtettünk, hogy a translációs hibákkal szembeni robusztusságot az evolúció alatt felgyorsuló fehérje körforgás biztosította. Ezt a megállapítást korábbi vizsgálatok is alátámasztják, miszerint a gyorsabban képződő és lebontódó, azaz rövidebb fél-életidejű fehérjék kisebb eséllyel vesznek fel rossz térszerkezetet, mint a hosszabb fél-életidejű fehérjék (De Baets és mtsai., 2011). Tekintettel arra, hogy kísérletünkben az evolúció elsősorban a fehérje aggregáció csökkentésére irányult, a fehérje körforgás felgyorsítása megfelelő evolúciós eszköznek bizonyult. A translációs és lebontási ráta emelkedésével lehetőség nyílt arra, hogy a rossz térszerkezetű, ezért aggregálódó fehérjék sejten belüli aránya csökkenjen a fehérjetermelés folytonossága mellett, ezáltal biztosítva a sejtek működéséhez szükséges effektív fehérjetartalmat.

A fehérje aggregáció csökkentése dajkafehérjék közreműködése révén az egyedi fehérje molekulák feltekeredésének hatékonyabbá tételével is megvalósulhatott volna. Az evolvált vonalak genomszekvenciáinak vizsgálatakor azonban nem azonosítottunk mutációkat a dajkafehérjék génjeiben (Függelék, 1. táblázat), továbbá a génextpressziós változások (2. táblázat) sem utaltak arra, hogy a feltekeredés hatékonyságának növelése következett volna be. Tekintettel arra, hogy élesztőben a CUG pozíciók jelentős része a fehérjék belsejében, konzervált helyeken található (Rocha és mtsai., 2011), és az ezeket a pozíciókat érintő kettős kódolás két kémiai különböző aminosav beépülését teszi lehetővé, a misztranszláció olyan súlyos térszerkezetbeli változásokat eredményezhet, melyek kijavítására a dajkafehérjék rendszere már nem elegendő. Ennek tükrében a dajkafehérje-rendszert érintő mutációk kevés előnnyel járnának, ez pedig magyarázhatja az ilyen típusú mutációk hiányát az evolúciós vonalakban. Eredményeink alapján valószínűsítjük, hogy az aggregálódó fehérjék eltávolítása evolúciósan hatékonyabb módszer, mint az egyes térszerkezeti hibák helyrehozása.

Megfigyeléseink szerint a magas transzlációs hibarátához való alkalmazkodás nagy genomi átrendeződéseket indukált az evolvált vonalakban (1. táblázat). Ez nem egyedi jelenség, a misztranszláció genom szerkezetre gyakorolt hatásairól korábbi tanulmányok is beszámoltak már (Bezerra és mtsai., 2013). Az általunk megfigyelt mutációs események egymástól független, ismétlődő megjelenése és életképességre gyakorolt előnyös hatásai nem lehetnek véletlenszerűek (Chen és mtsai., 2012; Sheltzer és Amon, 2011; Tang és Amon, 2013), ez pedig az adaptív evolúcióban betöltött szerepüket valószínűsíti. Egész kromoszóma szegmensek duplikációjával elérhetővé vált teljes fehérje komplexeket kódoló gének, illetve akár alrendszerek génjeinek kópiaszám emelése. A riboszóma biogenezisben, összeszerelésben, és az RNS feldolgozásban részt vevő gének kópiaszámának együttes emelkedése biztosíthatta a genetikai hátterét a felgyorsuló fehérjeszintézisnek.

Az evolvált vonalak több mint 90%-ában megfigyeltük két, deubiquitinációban szerepet játszó enzim kópiaszám csökkenését (1. táblázat). Ezek az enzimek a proteasómális lebontásra kijelölt fehérjékről távolítják el az ubiquitin molekulákat, ezáltal térítve el őket a lebontási útról (Öling és mtsai., 2014). A részleges kromoszóma deléciónak következtében csökkenő enzim mennyiség növelheti a proteasómális lebontási útra terelt fehérjék arányát (Öling és mtsai., 2014). Ez a jelenség magyarázhatja, hogy miért láttunk emelkedést az evolvált vonalak proteasómális lebontási rátájában. Összegezve, a megfigyelt nagy kromoszómális átrendeződések biztosíthatták a felgyorsult fehérje

körforgás genetikai hátterét, és ezzel a translációs hibákkal szembeni robusztusság kialakulását. Elméletünket bizonyítja, hogy más kutatócsoportok is kimutatták már, hogy a nagy kromoszómális átrendeződések segítik a mikróbák környezeti stresszhez való alkalmazkodását (Rancati és mtsai., 2008; Selmecki és mtsai., 2009; Yona és mtsai., 2012). Érdekes, hogy több evolúciós vonalban azonosítottunk funkcióvesztéssel járó mutációkat egy hiszton gének átírását szabályozó fehérjében (*HIR2* [S000005564]) (Függelék, 1. táblázat). Ennek inaktivációja gátolja a heterokromatin terjedéséhez köthető géncsendesítést és növeli a kromoszóma instabilitást (Kaufman és mtsai., 1998; Sharp és mtsai., 2002). Annak felderítésére, hogy a megfigyelt *HIR2* mutációknak van-e köztük a viszonylag nagyszámú kromoszóma átrendeződési esemény megjelenéséhez, további vizsgálatokra van szükség.

Az evolált vonalak szekvenciáinak vizsgálata alapján a CTG bázishármasok vad típusú szekvenciát mutattak. A mutációk hiánya nem feltétlen meglepő, hiszen a misztranszláció párhuzamosan több ezer kodont érinthet, ezek külön-külön viszont viszonylag kis mértékben járulnak hozzá az életképesség változásához. Az általunk alkalmazott szelektív nyomás erőssége és a rendelkezésre álló rövid alkalmazkodási idő az egyes CTG kodonok translációs hibarátájának csökkentése helyett egy jóval általánosabb evolúciós megoldás kifejlesztését indokolta.

A genomon megfigyelt mutációk vizsgálatán felül érdekesnek tartottuk azok génexpresszióra gyakorolt hatásainak vizsgálatát is. Két jellemző mutációs mintázattal rendelkező evolúciós vonalban vizsgáltuk a kromoszóma átrendeződések által nem érintett gének expressziós szintjét. A gének funkcionális kategóriákba sorolásakor azt tapasztaltuk, hogy az evolúció során a riboszómális RNS feldolgozás, a riboszóma biogenezis és az aminosav bioszintézis útvonal géneinek expressziós szintje emelkedett meg (2. táblázat). Ezek az eredmények azt valószínűsítik, hogy a kromoszóma átrendeződések mellett génexpressziós változások is elősegíthették a magas translációs hibarátához való alkalmazkodást, a fehérjeszintézis rátájának emelésén keresztül.

A pontos mechanizmusok, melyek lehetővé tették a riboszómális gének indukcióját az evolált vonalakban, nem ismertek. Fontos azonban megjegyezni, hogy a riboszómális fehérjéket kódoló gének szabályozása összehangoltan zajlik, melynek egyik fő irányítója az *IHF1* transzkripciós faktor (S000004213) (Rudra és mtsai., 2005). Az *IHF1* génje a XII kromoszómán található, mely az evolúciós vonalak többségében teljes duplikáción esett át (1. táblázat), ezzel pedig a transzkripciós faktor génkópiaszáma is

emelkedett. Lehetséges, hogy az *IHF1* dózisban bekövetkező változás következménye a riboszómális gének indukciója.

6.6. A translációs hibákkal szembeni robusztusság kialakulásának mellékterméke a sejtek megnövekedett energiaigénye

Vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy az evolvált vonalak translációs hibákkal szembeni robusztusságát a felgyorsuló fehérje körforgás biztosítja. A transláció és a fehérje lebontás emelkedett szintje fokozott energetikai költséget jelent a sejtek számára. Tápanyagban szegény környezeti feltételek között ez a költség tovább nőhet, hiszen a sejtek nem képesek kielégíteni a megnövekedett energiaigényt, ami így életképesség csökkenéshez vezethet. Eredményeink igazolták, hogy az evolvált vonalak életképessége tápanyagban szegény környezetben, korlátozott szénforrás illetve aminosav ellátottság mellett csökkent (22. és 23. ábra). Ezek alapján megállapítható, hogy az adaptációt biztosító felgyorsult fehérje körforgás mellékhatásaként valóban olyan mértékű energetikai költség keletkezik, ami tápanyagban szegény környezeti feltételek mellett nem elégíthető ki.

A felgyorsult fehérje körforgás energiaigényének fedezése egy újabb szelekciós nyomást jelentett a sejtek számára, hiszen ahhoz, hogy megtarthassák életképességüket, alkalmazkodniuk kellett a megváltozott belső körülményekhez. Vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy az evolvált vonalak az evolúció során növelték a környezetből felvett glükóz mennyiségét (24. ábra). A glükóz felvételi ráta emelkedésének hátterében több mutáció is azonosítható. A 11 evolvált vonalból 9 vonalban duplikálódott a IV kromoszóma 540 kb hosszú szakasza. Ebben a régióban három, hexóz transzportban felelős gén is található, a *HXT3* [S000002753], *HXT6* [S000002751], és *HXT7* [S000002750], melyek kópiaszáma a duplikáció következtében emelkedett (1. táblázat). Korlátozott glükóz ellátottsági viszonyok között korábban is megfigyelték már élesztő populációkban a IV kromoszóma ezen régiójának kópiaszám emelkedését (Brown és mtsai., 1998; Dunham és mtsai., 2002), ez pedig alátámasztja az evolúciós vonalak növekvő szénforrás igényére tett feltételezéseinket. Hét evolvált vonal esetén további mutációkat is azonosítottunk egy glükóz éhezést érzékelő membrán fehérjében (*MTL1* [S000003255]) (Függelék, 1. táblázat). A biokémiai és funkcionális genomikai vizsgálatok eredményei egybehangzóan sugallják, hogy az evolvált vonalaknak több szénforrásra van szükségük a normális sejtműködés fenntartásához. Természetesen a

felvett glükóz nem csak mint energia, hanem mint építőelem is hasznosulhat a sejtosztódás során. Vizsgálataink nem terjedtek ki arra, hogy a felvett glükózt mely folyamatokban és milyen formában hasznosul, feltételezéseink szerint azonban legalább részben a felgyorsult fehérje körforgás energiaigényének fedezésére fordítódik.

Korábban már megállapítottuk, hogy az adaptáció mellékhatásaként az evolúciós vonalak korlátozott tápanyag ellátottság mellett csökkent rátermettséget mutatnak (22. és 23. ábra). További adaptációs mellékhatások felderítésének érdekében megvizsgáltuk, hogyan viselkednek az evolált vonalak teljes éhezési körülmények mellett. A kronológiai élettartamra vonatkozó vizsgálataink segítségével megállapítottuk, hogy az evolált vonalak populációi teljes éhezési körülmények között az őshöz képes gyorsabban haltak ki (25. ábra). A megfigyelt gyors élettartam csökkenés hátterében összetett folyamatok állhatnak, ezek részletes felderítésére nem tértünk ki vizsgálataink során. A megismert szekvencia adatok és korábbi vizsgálatok eredményei alapján csak feltételezéseket tehetünk, melyek szerint az élettartam drasztikus csökkenése részben az ubiquitin-proteaszóma rendszert érintő mutációk eredménye. Az evolált vonalakban többségében megfigyeltük az *UBP3* gén kópiaszám csökkenését. Ismert, hogy az *UBP3* gén expressziója nélkülözhetetlen az érett riboszómák lebontásához (Kraft és mtsai., 2008). Az *UBP3* génben megjelenő mutációkkal az érett riboszómák lebontásának gátlása valósulhatott meg. Az érett riboszómák lebontása, azaz a ribofágia (Korolchuk és mtsai., 2010; Kraft és mtsai., 2008) pedig fontos szerepet tölt be tápanyagszegény környezeti feltételek mellett a fehérjeszintézis optimalizációs folyamataiban, hiszen segítségével képesek a sejtek a rendelkezésükre álló energiamennyiség és a transzlációs szükségleteik figyelembevételével a riboszómák mennyiségét szabályozni (Kraft és mtsai., 2008). Eredményeink alapján a magas transzlációs hibarátához történő alkalmazkodás mellékhatásaként az evolúciós vonalak elvesztették azon képességüket, hogy érett riboszómáikat lebontani tudják (26. és 27. ábra), ez pedig éhezési körülmények között jelentős élettartam csökkenéshez, és a populációk gyors kihalásához vezet.

7. Gyakorlati következtetések

Eredményeinkből számos fontos következtetés vonható le, melyek további kutatásoknak nyithatnak utat. Munkánk bizonyítja, hogy a kromoszómális átrendeződések gyors evolúciós megoldást jelenthetnek (Chen és mtsai., 2012; Sheltzer és Amon, 2011; Tang és Amon, 2013). Kromoszómák, vagy kromoszóma szegmensek duplikációival teljes fehérje komplexeket kódoló gének, illetve akár alrendszerek génjeinek kópiaszám emelése is lehetségessé válik, így ezek segítségével akár kisméretű populációk is képesek viszonylag nagy fenotípusos változásokkal alkalmazkodni a megváltozott körülményekhez (Tang és Amon, 2013). Megjegyzendő, hogy a kromoszómális átrendeződések káros mellékhatásai miatt azonban valószínűleg csak átmeneti megoldást jelenthetnek az alkalmazkodás során, nagyobb evolúciós léptékben pontosabb, célzottabb pontmutációk útján megvalósuló folyamatokra van szükség (Yona és mtsai., 2012).

Eredményeinkkel bemutattuk, hogy a magas transzlációs hibarátához való alkalmazkodás egyik módja lehet a fehérje körforgás felgyorsulása, mely az aggregálódó fehérjék mennyiségének csökkentésével növeli a sejtek életképességét. Korábban egysejtűeknél és többsejtű élőlényeknél is bizonyították már, hogy a sejtek öregedésével lassul a fehérjék körforgása. Az öregedés során a fehérjeszintézis- és lebontási képleteket ért hatások összegződnek, ez vezet a fehérje körforgás lelassulásához (Ryazanov és Nefsky, 2002). A lassuló fehérje körforgás következtében a sejtekben felhalmozódnak a károsodott fehérjék, amik öngerjesztő módon további sejtkárosító hatásokkal rendelkeznek, és az öregedést tovább gyorsítják (Ryazanov és Nefsky, 2002). Munkánk rávilágít arra, hogy a transzlációs minőségellenőrzés és az ubiquitin-proteaszóma rendszer összehangoltan működnek, és erős hatást gyakorolhatnak a sejtek élettartamára.

Eredményeink a genetikai kód evolúciós elméleteiben fellelhető ellentmondások feloldásában is segíthetnek (Santos és mtsai., 2004). A genetikai kód átrendeződése az evolúció során több alkalommal is bekövetkezett, az általánostól eltérő genetikai kódolási rendszereket számos élőlényben megfigyelhetünk. A *Candida albicans* és néhány rokonában ez az átrendeződés azonban nem ment teljesen végbe, a CUG kodonok kettős kódolása (szerin és leucin) a mai napig megfigyelhető (Miranda és

mtsai., 2006). A témakörrel foglalkozó kutatók között nincs egységes tudományos álláspont arra, hogy pontosan hogyan mehetett végben a CUG kodonok átrendeződése (Massey és mtsai., 2003). Annyi azonban bizonyosnak látszik, hogy az átrendeződés átmeneti állapotokon keresztül zajlott, melyek során a CUG kodonok már nem csak leucint, hanem szerint is meghatároztak. A kétértelmű kódolás elmélet ellenzői szerint az átmeneti kódolási állapot a Candidák számára akár végzetes fehérje szerekezeti és működésbeli károkat idézett volna elő. Eredményeink ezzel szemben rámutatnak, hogy ez a kétértelmű kódolási koránt sem végzetes a sejtek számára, az evolúció gyors megoldási lehetőségeket biztosít a misztranszláció tolerálására.

Vizsgálataink során a transzlációs hibaráta káros hatásaira, és az azok mérséklésére kialakult megoldásokra összpontosítottunk. Azt azonban érdemes megjegyezni, hogy a magas transzlációs hibaráta olyan belső stresszválaszokat („unfolded protein response” - UPR) vált ki, melyek egyéb, hirtelen fellépő stresszhatásokkal szemben is védelmet biztosíthatnak (Ribas de Pouplana és mtsai., 2014; Santos és mtsai., 1999). A továbbiakban érdemes volna vizsgálni, hogy a magas transzlációs hibarátahoz való alkalmazkodás hogyan befolyásolja az egyéb környezeti stresszhez való alkalmazkodást. A transzlációs hibákkal szembeni robusztusság és a transzlációs hibák által kiváltott elő-adaptációs folyamatok között erős negatív összefüggést feltételezünk, a viszonyok pontos megismerése akár kutatásaink egyik új irányát is jelentheti.

8. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném megköszönni témavezetőmnek, **Dr. Pál Csabának** szakmai irányítását, ötleteit és hasznos tanácsait, melyekkel irányította utamat. Hálásan köszönöm, hogy a csoportjában eltöltött évek alatt stabil munkakörnyezetet teremtett, és minden lehetőséget megadott, hogy a legjobbat hozzam ki magamból.

Köszönöm együttműködő partnereinknek, **Manuel A. S. Santosnak** és **Ana Rita Bezerrának** a problémakör felvetését, és a kísérleti modellrendszer felállítását. Rendkívül hálás vagyok Ana Ritának a biokémiai vizsgálatok elvégzésében nyújtott segítségért. Az ő szakmai tapasztalatai és meglátásai nélkül a kézirat sem készülhetett volna el.

Külön köszönet illeti korábbi mentoromat, **Dr. Szamecz Bélát**, amiért kezdőként a laborban eltöltött néhány év alatt olyan sokat tanulhattam tőle. Mindig készségesen segített, biztatott és támogatott.

Köszönöm az élesztős labor összes volt és jelenlegi tagjának, **Dr. Farkas Zoltánnak**, **Dr. Daraba Andreeának**, **Almási Karolának**, **Bódi Zoltánnak**, és **Borka Andrásné Emikének** a szakmai és technikai segítséget, valamint hogy mindig vidám hangulatot teremtettek a laborban.

Köszönöm **Dr. Gácsér Attilának** és **Dr. Glatz Attilának**, hogy elvállalták a házi dolgozatom bírálatát és hasznos kritikáikkal és megjegyzéseikkel hozzájárultak a dolgozat értékének növeléséhez.

Hálás vagyok **családomnak** és **barátaimnak**, amiért mindig mellettem álltak, bíztak bennem és támogattak.

9. Szakirodalmi hivatkozások

- Adams, J. (2003). The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat. Rev.* 29 *Suppl 1*, 3–9.
- Akashi, H. (1994). Synonymous Codon Usage in *Drosophila Melanogaster*: Natural Selection and Translational Accuracy. *Genetics* 136, 927–935.
- Alamgir, M., Eroukova, V., Jessulat, M., Xu, J., and Golshani, A. (2008). Chemical-genetic profile analysis in yeast suggests that a previously uncharacterized open reading frame, YBR261C, affects protein synthesis. *BMC Genomics* 9, 583.
- Allan Drummond, D., and Wilke, C.O. (2009). The evolutionary consequences of erroneous protein synthesis. *Nat. Rev. Genet.* 10, 715–724.
- Anfinsen, C.B. (1972). The formation and stabilization of protein structure. *Biochem. J.* 128, 737–749.
- Arava, Y., Boas, F.E., Brown, P.O., and Herschlag, D. (2005). Dissecting eukaryotic translation and its control by ribosome density mapping. *Nucleic Acids Res.* 33, 2421–2432.
- Arce, J., Sturgis, J.N., and Duneau, J.-P. (2009). Dissecting membrane protein architecture: An annotation of structural complexity. *Biopolymers* 91, 815–829.
- Archetti, M. (2004). Selection on codon usage for error minimization at the protein level. *J. Mol. Evol.* 59, 400–415.
- Archetti, M. (2006). Genetic robustness and selection at the protein level for synonymous codons. *J. Evol. Biol.* 19, 353–365.
- Bacher, J.M., Crécy-Lagard, V. de, and Schimmel, P.R. (2005). Inhibited cell growth and protein functional changes from an editing-defective tRNA synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 1697–1701.
- Barciszewski, J., and Clark, B.F.C. (2012). *RNA Biochemistry and Biotechnology* (Springer Science & Business Media).
- Barnett, D.W., Garrison, E.K., Quinlan, A.R., Strömberg, M.P., and Marth, G.T. (2011). BamTools: a C++ API and toolkit for analyzing and managing BAM files. *Bioinformatics* 27, 1691–1692.
- Barrett, L.W., Fletcher, S., and Wilton, S.D. (2012). Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 69, 3613–3634.
- Barton, N.H., and Keightley, P.D. (2002). Understanding quantitative genetic variation. *Nat. Rev. Genet.* 3, 11–21.

- Ben-Shem, A., Loubresse, N.G. de, Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2011). The Structure of the Eukaryotic Ribosome at 3.0 Å Resolution. *Science* 334, 1524–1529.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L. (2002). *Biochemistry* (W H Freeman).
- Bezerra, A.R., Simões, J., Lee, W., Rung, J., Weil, T., Gut, I.G., Gut, M., Bayés, M., Rizzetto, L., Cavalieri, D., et al. (2013). Reversion of a fungal genetic code alteration links proteome instability with genomic and phenotypic diversification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 11079–11084.
- Björk, G.R., Ericson, J.U., Gustafsson, C.E., Hagervall, T.G., Jönsson, Y.H., and Wikström, P.M. (1987). Transfer RNA modification. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 263–287.
- Bloom, J., Amador, V., Bartolini, F., DeMartino, G., and Pagano, M. (2003). Proteasome-mediated degradation of p21 via N-terminal ubiquitylation. *Cell* 115, 71–82.
- Bloom, J.D., Silberg, J.J., Wilke, C.O., Drummond, D.A., Adami, C., and Arnold, F.H. (2005). Thermodynamic prediction of protein neutrality. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 606–611.
- Borrel, G., Harris, H.M.B., Tottey, W., Mihajlovski, A., Parisot, N., Peyretailade, E., Peyret, P., Gribaldo, S., O’Toole, P.W., and Brugère, J.-F. (2012). Genome Sequence of “Candidatus Methanomethylophilus alvus” Mx1201, a Methanogenic Archaeon from the Human Gut Belonging to a Seventh Order of Methanogens. *J. Bacteriol.* 194, 6944–6945.
- Botstein, D., and Fink, G.R. (2011). Yeast: An Experimental Organism for 21st Century Biology. *Genetics* 189, 695–704.
- Branden, C., and Tooze, J. (1991). *Introduction to protein structure* (Garland Pub.).
- Brenner, S., Jacob, F., and Meselson, M. (1961). An Unstable Intermediate Carrying Information from Genes to Ribosomes for Protein Synthesis. *Nature* 190, 576–581.
- Brettschneider, J., Tredici, K.D., Lee, V.M.-Y., and Trojanowski, J.Q. (2015). Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 109–120.
- Brown, T.A. (2002). *Genomes* (Oxford: Wiley-Liss).
- Brown, C.J., Todd, K.M., and Rosenzweig, R.F. (1998). Multiple duplications of yeast hexose transport genes in response to selection in a glucose-limited environment. *Mol. Biol. Evol.* 15, 931–942.
- Campbell, N. (1996). *Biology: Concepts and Connections* (Benjamin-Cummings Publishing Company).

- Cao, S., and Yan, L. (2013). Construction of a high-quality yeast two-hybrid (Y2H) library and its application in identification of interacting proteins with key vernalization regulator TaVRN-A1 in wheat. *BMC Res. Notes* 6, 81.
- Chen, G., Rubinstein, B., and Li, R. (2012). Whole chromosome aneuploidy: Big mutations drive adaptation by phenotypic leap. *BioEssays* 34, 893–900.
- Cherry, J.M., Adler, C., Ball, C., Chervitz, S.A., Dwight, S.S., Hester, E.T., Jia, Y., Juvik, G., Roe, T., Schroeder, M., et al. (1998). SGD: Saccharomyces Genome Database. *Nucleic Acids Res.* 26, 73–79.
- Cooper, G.M. (2000). *The Cell: A Molecular Approach* (ASM Press).
- Crick, F. (1970). Central Dogma of Molecular Biology. *Nature* 227, 561–563.
- Crick, F.H. (1968). The origin of the genetic code. *J. Mol. Biol.* 38, 367–379.
- Crick, F.H.C., Barnett, L., Brenner, S., and Watts-Tobin, R.J. (1961). General Nature of the Genetic Code for Proteins. *Nature* 192, 1227–1232.
- Curran, J.F., and Yarus, M. (1986). Base substitutions in the tRNA anticodon arm do not degrade the accuracy of reading frame maintenance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 6538–6542.
- Dabrowski, M., Bukowy-Bieryllo, Z., and Zietkiewicz, E. (2015). Translational readthrough potential of natural termination codons in eucaryotes – The impact of RNA sequence. *RNA Biol.* 12, 950–958.
- Darwin, C. (1859). *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, Or, The Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life* (J. Murray).
- De Angioletti, M., Lacerra, G., Sabato, V., and Carestia, C. (2004). Beta+45 G --> C: a novel silent beta-thalassaemia mutation, the first in the Kozak sequence. *Br. J. Haematol.* 124, 224–231.
- De Baets, G., Reumers, J., Delgado Blanco, J., Dopazo, J., Schymkowitz, J., and Rousseau, F. (2011). An Evolutionary Trade-Off between Protein Turnover Rate and Protein Aggregation Favors a Higher Aggregation Propensity in Fast Degrading Proteins. *PLoS Comput Biol* 7, e1002090.
- Demasi, M., Silva, G.M., and Netto, L.E.S. (2003). 20 S Proteasome from *Saccharomyces cerevisiae* Is Responsive to Redox Modifications and Is S-Glutathionylated. *J. Biol. Chem.* 278, 679–685.
- Dikic, I., and Robertson, M. (2012). Ubiquitin ligases and beyond. *BMC Biol.* 10, 22.
- Douglas, A.G.L., and Wood, M.J.A. (2011). RNA splicing: disease and therapy. *Brief. Funct. Genomics* 10, 151–164.
- Drummond, D.A., and Wilke, C.O. (2008). Mistranslation-Induced Protein Misfolding as a Dominant Constraint on Coding-Sequence Evolution. *Cell* 134, 341–352.

- Dunham, M.J., Badrane, H., Ferea, T., Adams, J., Brown, P.O., Rosenzweig, F., and Botstein, D. (2002). Characteristic genome rearrangements in experimental evolution of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 16144–16149.
- Elliott, D., and Lodomery, M. (2015). *Molecular Biology of RNA* (Oxford University Press).
- Ellis, N., and Gallant, J. (1982). An estimate of the global error frequency in translation. *Mol. Gen. Genet.* *MGG 188*, 169–172.
- Fabrizio, P., Hoon, S., Shamalnasab, M., Galbani, A., Wei, M., Giaever, G., Nislow, C., and Longo, V.D. (2010). Genome-Wide Screen in *Saccharomyces cerevisiae* Identifies Vacuolar Protein Sorting, Autophagy, Biosynthetic, and tRNA Methylation Genes Involved in Life Span Regulation. *PLoS Genet* *6*, e1001024.
- Fisher, R.A. (1930). *The Genetical Theory Of Natural Selection* (At The Clarendon Press).
- Fitzpatrick, D.A., Logue, M.E., Stajich, J.E., and Butler, G. (2006). A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC Evol. Biol.* *6*, 99.
- Freeland, S.J., and Hurst, L.D. (1998). The genetic code is one in a million. *J. Mol. Evol.* *47*, 238–248.
- Giaever, G., and Nislow, C. (2014). The Yeast Deletion Collection: A Decade of Functional Genomics. *Genetics* *197*, 451–465.
- Gietz, R.D., and Schiestl, R.H. (2007). High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat. Protoc.* *2*, 31–34.
- Gillespie, J.H. (1984). Molecular Evolution Over the Mutational Landscape. *Evolution* *38*, 1116–1129.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., et al. (1996). Life with 6000 genes. *Science* *274*, 546, 563–567.
- Goldsmith, M., and Tawfik, D.S. (2009). Potential role of phenotypic mutations in the evolution of protein expression and stability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 6197–6202.
- Gomes, A.C., Miranda, I., Silva, R.M., Moura, G.R., Thomas, B., Akoulitchev, A., and Santos, M.A. (2007). A genetic code alteration generates a proteome of high diversity in the human pathogen *Candida albicans*. *Genome Biol.* *8*, R206.
- Gosavi, N., Lee, H.-J., Lee, J.S., Patel, S., and Lee, S.-J. (2002). Golgi Fragmentation Occurs in the Cells with Prefibrillar α -Synuclein Aggregates and Precedes the Formation of Fibrillar Inclusion. *J. Biol. Chem.* *277*, 48984–48992.
- Govindarajan, S., and Goldstein, R.A. (1998). On the thermodynamic hypothesis of protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 5545–5549.

- Griffiths, A.J., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C., Gelbart, W.M., Griffiths, A.J., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C., and Gelbart, W.M. (2000). *An Introduction to Genetic Analysis* (W. H. Freeman).
- Guo, H.H., Choe, J., and Loeb, L.A. (2004). Protein tolerance to random amino acid change. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 9205–9210.
- Hagberg, B.A., Blennow, G., Kristiansson, B., and Stibler, H. (1993). Carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes: peculiar group of new disorders. *Pediatr. Neurol.* *9*, 255–262.
- Hanna, J., Leggett, D.S., and Finley, D. (2003). Ubiquitin Depletion as a Key Mediator of Toxicity by Translational Inhibitors. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 9251–9261.
- Hao, B., Gong, W., Ferguson, T.K., James, C.M., Krzycki, J.A., and Chan, M.K. (2002). A New UAG-Encoded Residue in the Structure of a Methanogen Methytransferase. *Science* *296*, 1462–1466.
- Hartl, F.U., Bracher, A., and Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* *475*, 324–332.
- Heitzler, J., Maréchal-Drouard, L., Dirheimer, G., and Keith, G. (1992). Use of a dot blot hybridization method for identification of pure tRNA species on different membranes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* *1129*, 273–277.
- Hicke, L. (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 195–201.
- Hipp, M.S., Park, S.-H., and Hartl, F.U. (2014). Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases. *Trends Cell Biol.* *24*, 506–514.
- Hirokawa, N., and Takemura, R. (2003). Biochemical and molecular characterization of diseases linked to motor proteins. *Trends Biochem. Sci.* *28*, 558–565.
- Ho, C.H., Magtanong, L., Barker, S.L., Gresham, D., Nishimura, S., Natarajan, P., Koh, J.L.Y., Porter, J., Gray, C.A., Andersen, R.J., et al. (2009). A molecular barcoded yeast ORF library enables mode-of-action analysis of bioactive compounds. *Nat. Biotechnol.* *27*, 369–377.
- Huh, W.-K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., and O’Shea, E.K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* *425*, 686–691.
- Hurst, L.D. (1992). Intragenomic Conflict as an Evolutionary Force. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* *248*, 135–140.
- Ibba, M., and Söll, and D. (1999). Quality Control Mechanisms During Translation. *Science* *286*, 1893–1897.
- Ikeda, F., and Dikic, I. (2008). Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. “Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects” review series. *EMBO Rep.* *9*, 536–542.

- Itoh, Y., Sekine, S., Suetsugu, S., and Yokoyama, S. (2013). Tertiary structure of bacterial selenocysteine tRNA. *Nucleic Acids Res.* *41*, 6729–6738.
- Jørgensen, F., and Kurland, C.G. (1990). Processivity errors of gene expression in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* *215*, 511–521.
- Jukes, T.H., and Osawa, S. (1990). The genetic code in mitochondria and chloroplasts. *Experientia* *46*, 1117–1126.
- Kaganovich, D., Kopito, R., and Frydman, J. (2008). Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. *Nature* *454*, 1088–1095.
- Kapp, L.D., and Lorsch, J.R. (2004). The Molecular Mechanics of Eukaryotic Translation. *Annu. Rev. Biochem.* *73*, 657–704.
- Kauffman, S., and Levin, S. (1987). Towards a general theory of adaptive walks on rugged landscapes. *J. Theor. Biol.* *128*, 11–45.
- Kaufman, P.D., Cohen, J.L., and Osley, M.A. (1998). Hir Proteins Are Required for Position-Dependent Gene Silencing in *Saccharomyces cerevisiae* in the Absence of Chromatin Assembly Factor I. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 4793–4806.
- Kim, Y.E., Hipp, M.S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F.U. (2013). Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annu. Rev. Biochem.* *82*, 323–355.
- Kimura, M. (1983). *The Neutral Theory of Molecular Evolution* (Cambridge University Press).
- Kirschner, M. (1999). Intracellular proteolysis. *Trends Cell Biol.* *9*, M42-45.
- Klinge, S., Voigts-Hoffmann, F., Leibundgut, M., Arpagaus, S., and Ban, N. (2011). Crystal Structure of the Eukaryotic 60S Ribosomal Subunit in Complex with Initiation Factor 6. *Science* *334*, 941–948.
- Knight, R.D., Freeland, S.J., and Landweber, L.F. (2001). Rewiring the keyboard: evolvability of the genetic code. *Nat. Rev. Genet.* *2*, 49–58.
- Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Wierzbowski, J., Cottarel, G., and Collins, J.J. (2008). Mistranslation of Membrane Proteins and Two-Component System Activation Trigger Antibiotic-Mediated Cell Death. *Cell* *135*, 679–690.
- Koonin, E.V., and Novozhilov, A.S. (2009). Origin and evolution of the genetic code: the universal enigma. *Iubmb Life* *61*, 99–111.
- Korolchuk, V.I., Menzies, F.M., and Rubinsztein, D.C. (2010). Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. *FEBS Lett.* *584*, 1393–1398.
- Korostelev, A.A. (2011). Structural aspects of translation termination on the ribosome. *RNA* *17*, 1409–1421.

- Kozak, M. (1983). Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes, and organelles. *Microbiol. Rev.* *47*, 1–45.
- Kraft, C., Deplazes, A., Sohrmann, M., and Peter, M. (2008). Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. *Nat. Cell Biol.* *10*, 602–610.
- Kramer, E.B., and Farabaugh, P.J. (2007). The frequency of translational misreading errors in *E. coli* is largely determined by tRNA competition. *RNA* *13*, 87–96.
- Kunkel, T.A., and Bebenek, K. (2000). DNA Replication Fidelity. *Annu. Rev. Biochem.* *69*, 497–529.
- Kyriacou, S.V., and Deutscher, M.P. (2008). An Important Role for the Multienzyme Aminoacyl-tRNA Synthetase Complex in Mammalian Translation and Cell Growth. *Mol. Cell* *29*, 419–427.
- LaRiviere, F.J., Wolfson, A.D., and Uhlenbeck, O.C. (2001). Uniform binding of aminoacyl-tRNAs to elongation factor Tu by thermodynamic compensation. *Science* *294*, 165–168.
- Lee, J.W., Beebe, K., Nangle, L.A., Jang, J., Longo-Guess, C.M., Cook, S.A., Davisson, M.T., Sundberg, J.P., Schimmel, P., and Ackerman, S.L. (2006). Editing-defective tRNA synthetase causes protein misfolding and neurodegeneration. *Nature* *443*, 50–55.
- Li, H., and Durbin, R. (2010). Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* *26*, 589–595.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., and Subgroup, 1000 Genome Project Data Processing (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* *25*, 2078–2079.
- Ling, J., Reynolds, N., and Ibba, M. (2009). Aminoacyl-tRNA Synthesis and Translational Quality Control. *Annu. Rev. Microbiol.* *63*, 61–78.
- Ling, J., O’Donoghue, P., and Söll, D. (2015). Genetic code flexibility in microorganisms: novel mechanisms and impact on physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* *13*, 707–721.
- Liu, C.-W., Li, X., Thompson, D., Wooding, K., Chang, T., Tang, Z., Yu, H., Thomas, P.J., and DeMartino, G.N. (2006). ATP Binding and ATP Hydrolysis Play Distinct Roles in the Function of 26S Proteasome. *Mol. Cell* *24*, 39–50.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, A.C., Krieger, M., Scott, P.M., Darnell, J., and Zipursky, S.L. (2003). *Molecular Cell Biology* (W. H. Freeman).
- Luzio, J.P., Pryor, P.R., and Bright, N.A. (2007). Lysosomes: fusion and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 622–632.
- Malys, N., and McCarthy, J.E.G. (2011). Translation initiation: variations in the mechanism can be anticipated. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *68*, 991–1003.

- Markiewicz, P., Kleina, L.G., Cruz, C., Ehret, S., and Miller, J.H. (1994). Genetic studies of the lac repressor. XIV. Analysis of 4000 altered *Escherichia coli* lac repressors reveals essential and non-essential residues, as well as “spacers” which do not require a specific sequence. *J. Mol. Biol.* *240*, 421–433.
- Massey, S.E., Moura, G., Beltrão, P., Almeida, R., Garey, J.R., Tuite, M.F., and Santos, M.A.S. (2003). Comparative Evolutionary Genomics Unveils the Molecular Mechanism of Reassignment of the CTG Codon in *Candida* spp. *Genome Res.* *13*, 544–557.
- Maynard Smith, J. (1970). Natural Selection and the Concept of a Protein Space. *Nature* *225*, 563–564.
- Miranda, I., Silva, R., and Santos, M.A.S. (2006). Evolution of the genetic code in yeasts. *Yeast* *23*, 203–213.
- Nangle, L.A., Motta, C.M., and Schimmel, P. (2006). Global Effects of Mistranslation from an Editing Defect in Mammalian Cells. *Chem. Biol.* *13*, 1091–1100.
- Noller, H.F., Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Baucom, A., and Cate, J.H.D. (2002). Translocation of tRNA during protein synthesis. *FEBS Lett.* *514*, 11–16.
- Obrig, T.G., Culp, W.J., McKeehan, W.L., and Hardesty, B. (1971). The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *J. Biol. Chem.* *246*, 174–181.
- Öling, D., Eisele, F., Kvint, K., and Nyström, T. (2014). Opposing roles of Ubp3-dependent deubiquitination regulate replicative life span and heat resistance. *EMBO J.* *33*, 747–761.
- Olzsha, H., Schermann, S.M., Woerner, A.C., Pinkert, S., Hecht, M.H., Tartaglia, G.G., Vendruscolo, M., Hayer-Hartl, M., Hartl, F.U., and Vabulas, R.M. (2011). Amyloid-like aggregates sequester numerous metastable proteins with essential cellular functions. *Cell* *144*, 67–78.
- Onuchic, J.N., Socci, N.D., Luthey-Schulten, Z., and Wolynes, P.G. (1996). Protein folding funnels: the nature of the transition state ensemble. *Fold. Des.* *1*, 441–450.
- Oromendia, A.B., Dodgson, S.E., and Amon, A. (2012). Aneuploidy causes proteotoxic stress in yeast. *Genes Dev.* *26*, 2696–2708.
- Orr, H.A. (1998). The Population Genetics of Adaptation: The Distribution of Factors Fixed during Adaptive Evolution. *Evolution* *52*, 935–949.
- Orr, H.A. (1999). The evolutionary genetics of adaptation: a simulation study. *Genet. Res.* *74*, 207–214.
- Osawa, S., and Jukes, T.H. (1989). Codon reassignment (codon capture) in evolution. *J. Mol. Evol.* *28*, 271–278.
- Osawa, S., Jukes, T.H., Watanabe, K., and Muto, A. (1992). Recent evidence for evolution of the genetic code. *Microbiol. Rev.* *56*, 229–264.

- Pakula, A.A., and Sauer, R.T. (1989). Genetic analysis of protein stability and function. *Annu. Rev. Genet.* *23*, 289–310.
- Pape, T., Wintermeyer, W., and Rodnina, M. (1999). Induced fit in initial selection and proofreading of aminoacyl-tRNA on the ribosome. *EMBO J.* *18*, 3800–3807.
- Paredes, J.A., Carreto, L., Simões, J., Bezerra, A.R., Gomes, A.C., Santamaria, R., Kapushesky, M., Moura, G.R., and Santos, M.A. (2012). Low level genome mistranslations deregulate the transcriptome and translome and generate proteotoxic stress in yeast. *BMC Biol.* *10*, 55.
- Pauling, L. (1960). *The Nature of the Chemical Bond: An Introduction to Modern Structural Chemistry* (Ithaca, NY: Cornell University Press).
- Pestova, T.V., Kolupaeva, V.G., Lomakin, I.B., Pilipenko, E.V., Shatsky, I.N., Agol, V.I., and Hellen, C.U. (2001). Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 7029–7036.
- Pickart, C.M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* *70*, 503–533.
- Plant, E.P., Nguyen, P., Russ, J.R., Pittman, Y.R., Nguyen, T., Quesinberry, J.T., Kinzy, T.G., and Dinman, J.D. (2007). Differentiating between Near- and Non-Cognate Codons in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE* *2*.
- Poole, E., and Tate, W. (2000). Release factors and their role as decoding proteins: specificity and fidelity for termination of protein synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* *1493*, 1–11.
- Poulin, F., and Sonenberg, N. (2000). Mechanism of Translation Initiation in Eukaryotes.
- Powers, E.T., and Balch, W.E. (2013). Diversity in the origins of proteostasis networks — a driver for protein function in evolution. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 237–248.
- Rabl, J., Leibundgut, M., Ataide, S.F., Haag, A., and Ban, N. (2011). Crystal Structure of the Eukaryotic 40S Ribosomal Subunit in Complex with Initiation Factor 1. *Science* *331*, 730–736.
- Rakwalska, M., and Rospert, S. (2004). The Ribosome-Bound Chaperones RAC and Ssb1/2p Are Required for Accurate Translation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* *24*, 9186–9197.
- Ramakrishnan, V. (2002). Ribosome Structure and the Mechanism of Translation. *Cell* *108*, 557–572.
- Rancati, G., Pavelka, N., Fleharty, B., Noll, A., Trimble, R., Walton, K., Perera, A., Staehling-Hampton, K., Seidel, C.W., and Li, R. (2008). Aneuploidy Underlies Rapid Adaptive Evolution of Yeast Cells Deprived of a Conserved Cytokinesis Motor. *Cell* *135*, 879–893.

- Reynolds, N.M., Ling, J., Roy, H., Banerjee, R., Repasky, S.E., Hamel, P., and Ibba, M. (2010). Cell-specific differences in the requirements for translation quality control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 4063–4068.
- Ribas de Pouplana, L., Santos, M.A.S., Zhu, J.-H., Farabaugh, P.J., and Javid, B. (2014). Protein mistranslation: friend or foe? *Trends Biochem. Sci.* *39*, 355–362.
- Robinson, M.D., Grigull, J., Mohammad, N., and Hughes, T.R. (2002). FunSpec: a web-based cluster interpreter for yeast. *BMC Bioinformatics* *3*, 35.
- Rocha, R., Pereira, P.J.B., Santos, M.A.S., and Macedo-Ribeiro, S. (2011). Unveiling the structural basis for translational ambiguity tolerance in a human fungal pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 14091–14096.
- Rodnina, M.V., and Wintermeyer, W. (2009). Recent mechanistic insights into eukaryotic ribosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* *21*, 435–443.
- Rother, M., and Krzycki, J.A. (2010). Selenocysteine, Pyrrolysine, and the Unique Energy Metabolism of Methanogenic Archaea. *Archaea* *2010*.
- Ruan, B., Palioura, S., Sabina, J., Marvin-Guy, L., Kochhar, S., LaRossa, R.A., and Söll, D. (2008). Quality control despite mistranslation caused by an ambiguous genetic code. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 16502–16507.
- Rudra, D., Zhao, Y., and Warner, J.R. (2005). Central role of Ifh1p–Fhl1p interaction in the synthesis of yeast ribosomal proteins. *EMBO J.* *24*, 533–542.
- Ruusala, T., Andersson, D., Ehrenberg, M., and Kurland, C.G. (1984). Hyper-accurate ribosomes inhibit growth. *EMBO J.* *3*, 2575–2580.
- Ryazanov, A.G., and Nefsky, B.S. (2002). Protein turnover plays a key role in aging. *Mech. Ageing Dev.* *123*, 207–213.
- Saeed, A.I., Bhagabati, N.K., Braisted, J.C., Liang, W., Sharov, V., Howe, E.A., Li, J., Thiagarajan, M., White, J.A., and Quackenbush, J. (2006). [9] TM4 Microarray Software Suite. In *Methods in Enzymology*, A.K. and B. Oliver, ed. (Academic Press), pp. 134–193.
- Salas-Marco, J., and Bedwell, D.M. (2005). Discrimination between defects in elongation fidelity and termination efficiency provides mechanistic insights into translational readthrough. *J. Mol. Biol.* *348*, 801–815.
- Sanders, C.L., Lohr, K.J., Gambill, H.L., Curran, R.B., and Curran, J.F. (2008). Anticodon loop mutations perturb reading frame maintenance by the E site tRNA. *RNA* *14*, 1874–1881.
- Santos, M.A., Perreau, V.M., and Tuite, M.F. (1996). Transfer RNA structural change is a key element in the reassignment of the CUG codon in *Candida albicans*. *EMBO J.* *15*, 5060–5068.

- Santos, M.A., Ueda, T., Watanabe, K., and Tuite, M.F. (1997). The non-standard genetic code of *Candida* spp.: an evolving genetic code or a novel mechanism for adaptation? *Mol. Microbiol.* *26*, 423–431.
- Santos, M.A.S., Cheesman, C., Costa, V., Moradas-Ferreira, P., and Tuite, M.F. (1999). Selective advantages created by codon ambiguity allowed for the evolution of an alternative genetic code in *Candida* spp. *Mol. Microbiol.* *31*, 937–947.
- Santos, M.A.S., Moura, G., Massey, S.E., and Tuite, M.F. (2004). Driving change: the evolution of alternative genetic codes. *Trends Genet.* *20*, 95–102.
- Santos, M.A.S., Gomes, A.C., Santos, M.C., Carreto, L.C., and Moura, G.R. (2011). The genetic code of the fungal CTG clade. *C. R. Biol.* *334*, 607–611.
- Schattner, P., Brooks, A.N., and Lowe, T.M. (2005). The tRNAscan-SE, snoscan and snoGPS web servers for the detection of tRNAs and snoRNAs. *Nucleic Acids Res.* *33*, W686–W689.
- Schimmel, P., Giegé, R., Moras, D., and Yokoyama, S. (1993). An operational RNA code for amino acids and possible relationship to genetic code. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *90*, 8763–8768.
- Schmitt, M.E., Brown, T.A., and Trunpower, B.L. (1990). A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* *18*, 3091–3092.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* *9*, 671–675.
- Schneider-Poetsch, T., Ju, J., Eyler, D.E., Dang, Y., Bhat, S., Merrick, W.C., Green, R., Shen, B., and Liu, J.O. (2010). Inhibition of Eukaryotic Translation Elongation by Cycloheximide and Lactimidomycin. *Nat. Chem. Biol.* *6*, 209–217.
- Schultz, D.W., and Yarus, M. (1994). Transfer RNA Mutation and the Malleability of the Genetic Code. *J. Mol. Biol.* *235*, 1377–1380.
- Schwartz, D.C., and Parker, R. (1999). Mutations in Translation Initiation Factors Lead to Increased Rates of Deadenylation and Decapping of mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 5247–5256.
- Selmecki, A.M., Dulmage, K., Cowen, L.E., Anderson, J.B., and Berman, J. (2009). Acquisition of Aneuploidy Provides Increased Fitness during the Evolution of Antifungal Drug Resistance. *PLoS Genet* *5*, e1000705.
- Sharp, J.A., Franco, A.A., Osley, M.A., and Kaufman, P.D. (2002). Chromatin assembly factor I and Hir proteins contribute to building functional kinetochores in *S. cerevisiae*. *Genes Dev.* *16*, 85–100.
- Sharp, S.J., Schaack, J., Cooley, L., Burke, D.J., and Söll, D. (1985). Structure and transcription of eukaryotic tRNA genes. *CRC Crit. Rev. Biochem.* *19*, 107–144.

- Sheltzer, J.M., and Amon, A. (2011). The aneuploidy paradox: costs and benefits of an incorrect karyotype. *Trends Genet.* 27, 446–453.
- Silva, R.M., Paredes, J.A., Moura, G.R., Manadas, B., Lima-Costa, T., Rocha, R., Miranda, I., Gomes, A.C., Koerkamp, M.J., Perrot, M., et al. (2007). Critical roles for a genetic code alteration in the evolution of the genus *Candida*. *EMBO J.* 26, 4555–4565.
- Smith, W.W., Jiang, H., Pei, Z., Tanaka, Y., Morita, H., Sawa, A., Dawson, V.L., Dawson, T.M., and Ross, C.A. (2005). Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial cell death pathways mediate A53T mutant alpha-synuclein-induced toxicity. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3801–3811.
- Soto, C. (2003). Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 49–60.
- Sothly, C., and Csermely, P. (2003). Aging and molecular chaperones. *Exp. Gerontol.* 38, 1037–1040.
- Stansfield, I., Jones, K.M., Herbert, P., Lewendon, A., Shaw, W.V., and Tuite, M.F. (1998). Missense translation errors in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 282, 13–24.
- Stefani, M. (2007). Generic cell dysfunction in neurodegenerative disorders: role of surfaces in early protein misfolding, aggregation, and aggregate cytotoxicity. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* 13, 519–531.
- Sugita, T., and Nakase, T. (1999). Non-universal usage of the leucine CUG codon and the molecular phylogeny of the genus *Candida*. *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 79–86.
- Suzuki, T., Ueda, T., and Watanabe, K. (1997). The “polysemous” codon--a codon with multiple amino acid assignment caused by dual specificity of tRNA identity. *EMBO J.* 16, 1122–1134.
- Szamecz, B., Boross, G., Kalapis, D., Kovács, K., Fekete, G., Farkas, Z., Lázár, V., Hrtyan, M., Kemmeren, P., Groot Koerkamp, M.J.A., et al. (2014). The Genomic Landscape of Compensatory Evolution. *PLoS Biol* 12, e1001935.
- Tang, Y.-C., and Amon, A. (2013). Gene Copy-Number Alterations: A Cost-Benefit Analysis. *Cell* 152, 394–405.
- Tartaglia, G.G., Pechmann, S., Dobson, C.M., and Vendruscolo, M. (2007). Life on the edge: a link between gene expression levels and aggregation rates of human proteins. *Trends Biochem. Sci.* 32, 204–206.
- Thomas, M.J., Platas, A.A., and Hawley, D.K. (1998). Transcriptional Fidelity and Proofreading by RNA Polymerase II. *Cell* 93, 627–637.
- Torres, E.M., Sokolsky, T., Tucker, C.M., Chan, L.Y., Boselli, M., Dunham, M.J., and Amon, A. (2007). Effects of Aneuploidy on Cellular Physiology and Cell Division in Haploid Yeast. *Science* 317, 916–924.

- Torres, E.M., Dephoure, N., Panneerselvam, A., Tucker, C.M., Whittaker, C.A., Gygi, S.P., Dunham, M.J., and Amon, A. (2010). Identification of Aneuploidy-Tolerating Mutations. *Cell* 143, 71–83.
- Vendruscolo, M., and Tartaglia, G.G. (2008). Towards quantitative predictions in cell biology using chemical properties of proteins. *Mol. Biosyst.* 4, 1170–1175.
- Vickery, H.B. (1950). The Origin of the Word Protein. *Yale J. Biol. Med.* 22, 387–393.
- Volles, M.J., Lee, S.J., Rochet, J.C., Shtilerman, M.D., Ding, T.T., Kessler, J.C., and Lansbury, P.T. (2001). Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Biochemistry (Mosc.)* 40, 7812–7819.
- Warner, J.R., Knopf, P.M., and Rich, A. (1963). A MULTIPLE RIBOSOMAL STRUCTURE IN PROTEIN SYNTHESIS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 49, 122–129.
- Warringer, J., and Blomberg, A. (2003). Automated screening in environmental arrays allows analysis of quantitative phenotypic profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 20, 53–67.
- Warringer, J., Ericson, E., Fernandez, L., Nerman, O., and Blomberg, A. (2003). High-resolution yeast phenomics resolves different physiological features in the saline response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 15724–15729.
- Wilke, C.O., and Drummond, D.A. (2006). Population Genetics of Translational Robustness. *Genetics* 173, 473–481.
- Willensdorfer, M., Bürger, R., and Nowak, M.A. (2007). Phenotypic Mutation Rates and the Abundance of Abnormal Proteins in Yeast. *PLoS Comput. Biol.* 3.
- Williams, I., Richardson, J., Starkey, A., and Stansfield, I. (2004). Genome-wide prediction of stop codon readthrough during translation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 32, 6605–6616.
- Wiltrout, E., Goodenbour, J.M., Fréchin, M., and Pan, T. (2012). Misacylation of tRNA with methionine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* gks805.
- Winklhofer, K.F., Tatzelt, J., and Haass, C. (2008). The two faces of protein misfolding: gain- and loss-of-function in neurodegenerative diseases. *EMBO J.* 27, 336–349.
- Witte, O.N., Kabarowski, J.H., Xu, Y., Le, L.Q., and Zhu, K. (2005). Retraction. *Science* 307, 206.
- Woese, C.R. (1965). On the evolution of the genetic code. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 54, 1546–1552.
- Wood, E.J. (1996). *Structure in protein chemistry: By J Kyte.* Pp 606. Garland Publishing, New York & London. 1995. \$62 ISBN 0-8153-1701-8. *Biochem. Educ.* 24, 68–69.

Wright, S. (1932). The roles of mutation, inbreeding, crossbreeding, and selection in evolution. *1*:356–366.

Yona, A.H., Manor, Y.S., Herbst, R.H., Romano, G.H., Mitchell, A., Kupiec, M., Pilpel, Y., and Dahan, O. (2012). Chromosomal duplication is a transient evolutionary solution to stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 21010–21015.

Zaher, H.S., and Green, R. (2009). Quality control by the ribosome following peptide bond formation. *Nature* *457*, 161–166.

Zhang, J., and Yang, J.-R. (2015). Determinants of the rate of protein sequence evolution. *Nat. Rev. Genet.* *16*, 409–420.

Zhang, Y., Romero, H., Salinas, G., and Gladyshev, V.N. (2006). Dynamic evolution of selenocysteine utilization in bacteria: a balance between selenoprotein loss and evolution of selenocysteine from redox active cysteine residues. *Genome Biol.* *7*, R94.

Zhou, P. (2004). Determining protein half-lives. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *284*, 67–77.

Zwanzig, R., Szabo, A., and Bagchi, B. (1992). Levinthal's paradox. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 20–22.

Saját publikációk jegyéke

1. A doktori eljárás alapját képező 2 db közlemény

Kalapis D, Bezerra A R, Farkas Z, Horvath P, Bódi Z, Daraba A, Szamecz B, Gut I, Bayes M, Santos MA, Pál Cs Evolution of Robustness to Protein Mistranslation by Accelerated Protein Turnover PLOS BIOLOGY Nov 6;13(11):e1002291 (2015) IF: 8.66

Szamecz B, Boross G, Kalapis D, Kovács K, Fekete G, Farkas Z, Lázár V, Hrtyan M, Kemmeren P, Groot Koerkamp M J, Rutkai E, Holstege F C, Papp B & Pál Cs The genomic landscape of compensatory evolution PLOS BIOLOGY Aug 26; 12(8):e1001935 (2014) IF: 9.34

2. Referált folyóiratban megjelent közlemények

2.1 A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények

Kalapis D, Bezerra A R, Farkas Z, Horvath P, Bódi Z, Daraba A, Szamecz B, Gut I, Bayes M, Santos MA, Pál Cs Evolution of Robustness to Protein Mistranslation by Accelerated Protein Turnover PLOS BIOLOGY Nov 6;13(11):e1002291 (2015) IF: 8.66

2.2 Egyéb közlemények

Szamecz B, Boross G, Kalapis D, Kovács K, Fekete G, Farkas Z, Lázár V, Hrtyan M, Kemmeren P, Groot Koerkamp M J, Rutkai E, Holstege F C, Papp B & Pál Cs The genomic landscape of compensatory evolution PLOS BIOLOGY Aug 26; 12(8):e1001935 (2014) IF: 9.34

3. Egyéb szakmai anyagok – poszter előadások

Kalapis D, Bezerra A R, Farkas Z, Horvath P, Bódi Z, Daraba A, Szamecz B, Gut I, Bayes M, Santos MA, Pál Cs Evolution of Robustness to Protein Mistranslation by Accelerated Protein Turnover Genome Evolution Conference, 2016. November 1-3., Rehovot, Izrael

Kalapis D, Bezerra A R, Farkas Z, Horvath P, Bódi Z, Daraba A, Szamecz B, Gut I, Bayes M, Santos MA, Pál Cs Evolution of Robustness to Protein Mistranslation by Accelerated Protein Turnover, . EMBO Conference: Experimental Approaches to Evolution and Ecology, 2016. Október 19-23., Heidelberg, Németország.

Kalapis D, Bezerra A R, Farkas Z, Horvath P, Bódi Z, Daraba A, Szamecz B, Gut I, Bayes M, Santos MA, Pál Cs *Evolution of Robustness to Protein Mistranslation by Accelerated Protein Turnover*. 27^o International conference on yeast genetics and molecular biology, 2015. Szeptember 6-12., Levico Terme, Trentino, Olaszország

Kalapis D, Bezerra A R, Farkas Z, Horvath P, Bódi Z, Daraba A, Szamecz B, Gut I, Bayes M, Santos MA, Pál Cs *Evolution of Robustness to Protein Mistranslation by Accelerated Protein Turnover*. The annual meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution, 2015. Július 12-16., Bécs, Ausztria

Kalapis D, Bezerra A R, Farkas Z, Horvath P, Bódi Z, Daraba A, Szamecz B, Gut I, Bayes M, Santos MA, Pál Cs *Evolution of Robustness to Protein Mistranslation by Accelerated Protein Turnover*. EMBO Conference: Experimental Approaches to Evolution and Ecology, 2014. Október 12-14., Heidelberg, Németország.

Szamecz B, Boross G, **Kalapis D**, Nagy I, Horváth B Kovács K, Papp B and Pál Cs *Rapid compensatory adaptation following gene loss in *Saccharomyces cerevisiae**. Hungarian Molecular Life Sciences, 2013. Április 5-7., Siófok, Magyarország

Összefoglalás

A transláció egyike az élő szervezetekben lejátszódó alapvető felépítő folyamatoknak. A fehérjék az élőlények sejtjeinek fontos építőkövei, ezért a transláció pontos menete a sejtek életműködéseinek szempontjából kiemelt jelentőségű. Ismert azonban, hogy a fehérjék képződése nem hibamentes folyamat, ez pedig hatással van az élőlények életképességére, és számos betegség kialakulásával is összefüggésbe hozható.

A fehérjék képződésének minden részfolyamatában bekövetkezhetnek hibák. Friss kutatások azt is kimutatták, hogy előfordulási gyakoriságuk 3-5 nagyságrenddel meghaladja a DNS másolási hibák előfordulási gyakoriságát. Felmerül a kérdés, hogy ha a translációs rendszer ilyen nagy hibázási valószínűséggel dolgozik, hogyan képesek mégis a sejtek normális életműködéseiket fenntartani?

A folyamatok irányát tekintve a translációs hibákkal szemben kialakult védekező rendszerek két csoportja ismert; a hibák megjelenési arányának csökkentésére irányuló, valamint a már meglévő hibák által okozott káros hatások mérséklését célzó folyamatok. Jelenleg keveset tudunk arról, hogy ezen védekező mechanizmusok közül melyek és milyen arányban járulnak hozzá a normális sejtműködést biztosító fehérjetartalom kialakításához. Munkánk célja volt felderíteni azokat az alapelveket, melyek mentén a sejtek képesek alkalmazkodni a translációs hibák okozta káros hatásokhoz. Vizsgálatainkat pékélesztő modellszervezeten végeztük, melyben a translációs hibák egy speciális fajtájának, a kétértelmű aminosav kódolásnak a hatásait elemeztük.

Munkánk során az evolúcióbiológia, a biokémia, és funkcionális genomika eszközeit ötvözve a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. *Saccharomyces cerevisiae* sejtekben laboratóriumi evolúció során mérsékelhető-e a mesterségesen megemelt translációs hibaráta okozta rátermettség csökkenés?
2. A translációs hibák okozta rátermettség csökkenés hátterében milyen okok állhatnak?
3. Milyen genetikai és sejtélettani változások teszik lehetővé az emelkedett translációs hibaráttal szembeni alkalmazkodást?

4. Az emelkedett transzlációs hibarátával szembeni alkalmazkodással párhuzamosan milyen evolúciós mellékhatások azonosíthatók?

A transzlációs hibák rátermettségre gyakorolt hatásainak vizsgálatához egy korábban létrehozott *Saccharomyces cerevisiae* alapú modellt használtunk. *Candida albicans* tRNS_{CAG}^{szerin} génjének egyszeres kópiaszámú plazmidról történő expressziójával diploid pékélesztő sejtekben mesterségesen megemeltük a transzlációs hibarátát. Az új mutáns tRNS kifejeződésével a CUG pozíciókba az eredeti leucin mellett szerin beépülése is lehetségessé vált. Korábbi tömegspektrometriás mérések igazolták, hogy az alkalmazott genetikai konstrukcióval és a CUG kodonok kétértelmű meghatározásával a transzlációs hibarata 1400-szoros emelkedése idézhető elő.

A tRNS_{CAG}^{szerin}-t expresszáló magas transzlációs hibarátájú törzs növekedési rátáját vad típusú törzshöz viszonyítva a magas transzlációs hibarata 40%-os rátermettség csökkentést okozott. Ezt követően egy megközelítőleg 250 generációig tartó laboratóriumi evolúciót végeztünk 11 alacsony és 11 magas transzlációs hibarátájú vonallal. Az evolúciót követően megállapítottuk, hogy a kezdeti növekedési rátához képest mind a 11 párhuzamosan evolváló vonal növekedési rátája szignifikánsan, 13,3%–51,7% közötti mértékben emelkedett. Ezek az adatok arra engedtek következtetni, hogy a magas transzlációs hibarata okozta kezdeti rátermettség csökkenés már egy viszonylag rövid idejű alkalmazkodási periódus alatt is részben kompenzálható.

A továbbiakban a transzlációs hibák okozta rátermettség csökkenés hátterében álló okok felderítésére összpontosítottunk. Ismert, hogy a magas transzlációs hibarata rátermettség csökkentő hatása a fehérjék hibás feltekeredése, összecsapódása, és a létrejött fehérje-aggregátumok sejtkárosító hatása révén is megvalósulhat. Ezek tekintetében vizsgáltuk a transzlációs hibarata és a fehérje aggregáció kapcsolatát. Egy fluoreszcens, aggregációra hajlamos riporter fehérje (VHL-mCherry) sejteken belüli eloszlását vizsgálva következtettünk a fehérje aggregáció mértékének laboratóriumi evolúció alatti változására. Méréseink alapján megállapítottuk, hogy az ősi állapotban a magas transzlációs hibarata szignifikánsan növelte a fehérje aggregáció mértékét. Az evolúciót követően azonban mind a 11 evolúciós vonalban az aggregáció mértékének szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető. Ezek alapján arra következtettünk, hogy a laboratóriumi evolúció alatt a szelekció elsősorban a fehérje aggregáció csökkentésére irányult.

A továbbiakban vizsgáltuk, hogy milyen genetikai és sejtélettani változások teszik lehetővé az emelkedett translációs hibarátával szembeni alkalmazkodást. Ehhez biokémiai és funkcionális genomikai módszereket egyaránt alkalmaztunk. Biokémiai teszt segítségével megállapítottuk, hogy az evolúció során kis mértékben ugyan, de csökkent a tRNS_{CAG}^{szerin}-t expresszáló vonalakban a translációs hibarata mértéke. Ennek legvalószínűbb oka az adaptáció alatt a translációs hibarátáért felelős tRNS_{CAG}^{szerin} expressziójának csökkenése. Véleményünk szerint azonban sem a translációs hibarata, sem a mutáns tRNS expressziójának csökkenése nem volt olyan mértékű, hogy ezt tekinthessük az adaptáció fő mechanizmusának. Vizsgálatainkat tovább folytatva kimutattuk, hogy a magas translációs hibarátájú vonalakban az evolúció során szignifikánsan emelkedett a fehérjeszintézis rátája és a proteaszómális lebontás mértéke is. A fehérjeszintézis ráta emelkedését radioaktívan jelölt aminosavak beépülési arányának mérésével határoztuk meg, a proteaszómális lebontási ráta emelkedését pedig s-LLVY-MCA fluorogén szubsztrátot alkalmazva mutattuk ki. Méréseink alapján így arra következtettünk, hogy a translációs hibákkal szembeni robusztusságot az evolúció alatt elsősorban a felgyorsuló fehérje körforgás biztosította.

Az adaptáció genetikai hátterének megismeréshez teljes genom szekvenálást végeztünk mind a 11 evolúciós vonalon. A szekvenciaadatokat elemezve megfigyeltük, hogy a magas translációs hibarátához való alkalmazkodás nagy genomi átrendeződéseket indukált az evolált vonalakban. A megjelent nagy genomi átrendeződések többek között riboszóma-biogenezisben, -összeszerelésben, és az RNS feldolgozásban részt vevő gének kópiaszámának együttes emelkedését eredményezték. Ezen változások feltételezhetően a felgyorsuló fehérjeszintézis genetikai hátterét biztosíthatták. Az evolált vonalak több mint 90%-ában két, deubiquitinációban szerepet játszó enzim gén (*UBP3*, *UBP5*) kópiaszám csökkenését is azonosítottuk. Ezek a gének a fehérjék lebontási útról való eltérítésében játszanak szerepet, a csökkenő dózisuk pedig növelheti a proteaszómális lebontási útra terelt fehérjék arányát, mely magyarázatul szolgálhat az evolált vonalakban megfigyelt magasabb proteaszómális lebontási rátára.

A genomi mutációk vizsgálatán felül azok génexpresszióra gyakorolt hatásait is vizsgáltuk. Két, jellemző mutációs mintázattal rendelkező evolúciós vonalban a kromoszóma átrendeződések által nem érintett gének expressziós szintjét vizsgálva megállapítottuk, hogy a laboratóriumi evolúció során emelkedett a riboszómális RNS feldolgozás, a riboszóma biogenezis és az aminosav bioszintézis útvonal egyes

génjeinek expressziós szintje. Ezek az eredmények valószínűsítik, hogy a kromoszóma átrendeződések mellett génexpressziós változások is elősegíthették a magas translációs hibarátahoz való alkalmazkodást, a fehérjeszintézis rátájának emelésén keresztül.

Munkánkban a translációs hibákkal szembeni robusztusság kialakulásának melléktermékeit is vizsgáltuk. Ismert, hogy mind a fehérjeszintézis, mind a proteaszómális lebontás nagy energiaigényű folyamat. A sejtek glükózfelvételi rátájának mérésével igazoltuk, hogy a evolúciós vonalakban felgyorsuló fehérje körforgás megnövekedett energiaigényének fedezésére a sejtek növelték a tápoldatból felvett cukor mennyiségét. Kimutattuk továbbá, hogy a felgyorsult fehérjeszintézis és az emelkedett fehérje-lebontási ráta a megnövekedett energiaigény következtében tápanyagszegény környezetben a sejtek rátermettségének csökkenését és az evolált populációk kronológiai élettartamának csökkenését vonta maga után. A magas translációs hibarátahoz történő alkalmazkodás mellékhatásaként az evolúciós vonalakban csökkenő mértékű riboszóma lebontási folyamatokat azonosítottunk, melyek az éhezési körülmények között megfigyelt jelentős életképesség csökkenéshez, és a populációk gyors kihalásához vezethettek.

Jelen munka bizonyítja, hogy a felgyorsult fehérje körforgás a magas translációs hibarátahoz történő alkalmazkodás egy gyors, és hatékony módja, kiemelkedően magas energetikai költsége miatt azonban csak tápanyagban gazdag környezeti feltételek között nyújthat valós megoldást. Dolgozatomnak nem célja azt állítani, hogy a felgyorsult fehérje körforgás az egyetlen lehetséges védekező mechanizmus a magas translációs hibaráta káros hatásaival szemben. Könnyen elképzelhető, hogy a különböző környezeti körülmények és tápanyag ellátottsági feltételek között élő fajok különböző natív translációs hibarátaival rendelkeznek, és ezzel párhuzamosan akár más jellegű védekező mechanizmusokat is kialakíthattak.

Summary

Protein synthesis is one of the major cellular processes. As proteins are essential building blocks of the cells, the fidelity of translation has a substantial impact on cell survival. Errors in protein synthesis can reduce the organisms' viability and they serve as an onset of genetic diseases.

Errors can occur during the whole process of protein synthesis, from the incorporation of amino acids to protein folding, even during posttranslational modification. Recent studies have indicated, that error rates during protein production are three to five orders of magnitude higher than during DNA-replication. We asked if protein production is such error prone, how can organisms still maintain the homeostasis of cellular processes?

Two type of quality-control mechanisms exist based on the direction of processes: one that reduce the rate at which errors occur (error prevention) and one that limits the harmful effects if an error has already been made (error mitigation). Although the major types of quality control processes have been identified, the relative contribution of these pathways to safeguarding the integrity of biological information is remained largely unknown.

Our aim was to investigate this problem systematically by taking advantage of a previously engineered bakers' yeast strain, on which we analyzed the effects of ambiguous amino acid decoding, as a specific type of mistranslation.

We integrated evolutionary biology, biochemical and functional genomics tools to answer the following questions:

1. Can fitness loss due to mistranslation be compensated in *Saccharomyces cerevisiae* cells during a laboratory evolutionary experiment?
2. What are the underlying mechanisms of fitness loss caused by mistranslation?
3. What type of genetic- and physiological changes are involved in the adaptation to mistranslation?
4. What are the evolutionary side-effects of adaptation to mistranslation?

We used a previously engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain as a model to investigate the effects of mistranslation on cellular fitness.

We expressed the *Candida albicans* tRNA_{CAG}^{Ser} gene from a single copy vector in diploid bakers' yeast cells in order to increase the mistranslation rate experimentally. The engineered construct misincorporates serine at leucine sites encoded by the CUG codon. A previous quantitative mass-spectrometry study indicates that the expression of tRNA_{CAG}^{Ser} construct generates a 1400-fold increase in mistranslation at CUG sites on a proteome-wide scale.

Measuring the growth rate of yeast populations expressing the tRNA_{CAG}^{Ser} construct indicated that elevated mistranslation rate reduced the fitness of yeast populations by 40% compared to wild type populations with low mistranslation rate.

Next we initiated a laboratory evolutionary experiment with strains having low and high mistranslation rate, 11-11 parallel replicates each, for approximately 250 generations. After the evolution, significant fitness improvement (13.3%-51.7%) was detected in all the parallel evolved lines with high mistranslation rate compared to the ancestral state. These results indicate that fitness defect due to mistranslation can rapidly be mitigated during a relatively short period of laboratory evolution.

Henceforth, we focused on the underlying mechanisms of fitness loss caused by mistranslation. It is known, that fitness cost of mistranslation could partly be due to protein misfolding, protein aggregation, and consequent induction of cellular toxicity. To shed light on the possible link between mistranslation and protein aggregation, we used a fluorescent reporter system. We measured the distribution of a fluorescently tagged aggregation prone human protein (VHL, von Hippel-Lindau) to infer the changes in protein aggregation propensity during the course of laboratory evolution. We demonstrated, that elevated mistranslation rate increased the rate of protein aggregation in the ancestral state. In contrast, all the 11 parallel evolved lines showed significantly reduced protein aggregation propensity. These results indicate that reducing the rate of protein aggregation was one of the main targets for natural selection during laboratory evolution.

We also applied biochemical and functional genomics tools to identify the genetic and physiological changes involved in the adaptation to mistranslation. With the help of a state-of-the-art biochemical assay, we detected a small, but significant decrease in the misreading activity of the tRNA_{CAG}^{Ser}. We suspect that the reduction in tRNA_{CAG}^{Ser} expression might be responsible for this pattern. However we hypothesize that neither the reduction of mistranslation rate nor the reduction of tRNA_{CAG}^{Ser} expression are exclusively responsible for adaptation.

We demonstrated that both the translation and proteasomal degradation rate was significantly increased in the evolved lines with high mistranslation rate compared to the ancestor. We quantified the rate of protein synthesis by measuring the incorporation of radioactively labelled amino acids. To quantify the rate of chymotrypsin-like proteasomal activity, we used a fluorogenic peptide substrate. Based on the abovementioned results we could conclude that the evolutionary adjustment of proteome homeostasis to mistranslation was achieved through acceleration of protein turnover, a process determined by the combined rates of protein synthesis and ubiquitin-proteasome system mediated degradation.

We also performed whole genome sequencing on the 11 parallel evolved lines in order to reveal the genetic basis of adaptation to mistranslation. The genomic analysis demonstrated that adaptation to mistranslation induced large-scale chromosomal duplication and deletion events in the evolved lines. These large-scale genomic changes simultaneously altered the dosage of genes involved in ribosomal biogenesis, ribosome assembly, and rRNA processing and could function as a genetic basis for accelerated protein synthesis. In more than 90 % of the evolved lines we also identified copy number loss in two genes encoding deubiquitinating enzymes (*UBP3*, *UBP5*). These genes are involved in the deubiquitilation of the proteins diverting them away from the proteasome system. Accordingly, reduced dosage of these genes can increase the fraction of proteins destined for destruction, resulting in an increased protein degradation rate.

We also investigated the effect of genomic mutations on gene expression levels. We focused on two evolved lines, both of which carried typical large-scale chromosomal rearrangements. The analysis included only those genomic segments which were unaffected by copy number changes during the course of laboratory evolution. We observed increased expression of genes involved in ribosomal RNA processing, ribosome biogenesis and amino acid biosynthesis. These results also support the role of accelerated protein synthesis in the adaptation to mistranslation.

We also investigated the evolutionary side-effects of adaptation to mistranslation. As both translation and proteasomal degradation are highly energy consuming processes, accelerated protein turnover must imply a higher energetic cost to the cells. Measuring the glucose uptake of the ancestor and the evolved lines, we demonstrated that, evolved cells generally internalized more glucose molecules than the ancestor cells in order to fulfil the energetic demand of accelerated protein turnover. We

also demonstrated that - due to the increased energetic demand - evolved lines generally showed decreased fitness and reduced chronological lifespan upon nutrient limitation. As an evolutionary trade-off, adaptation to mistranslation reduced the capacity of evolved lines to degrade mature ribosomes. This might lead to the loss of viability and faster extinction rate of the evolved populations under starvation.

This work provides several lines of evidence that accelerated protein turnover is a fast and effective method for adaptation to mistranslation. However, due to its high energetic demand, this strategy might be only feasible in nutrient-rich environments, such as our experimental settings. Therefore it is, this work does not state that accelerated protein turnover is the only safeguarding mechanism against the detrimental effects of mistranslation. Translation fidelity may vary across environments and organisms might have evolved different defence mechanisms against protein synthesis errors.

Függelék

Szisztematikus név	Standard név	GO kategória	Mutációs események száma
YMR317W	YMR317W	Nem jellemzett	15
YIL169C	YIL169C	Nem jellemzett	9
YGR023W	MTL1	Sejtválasz glükóz éhezésre	7
YPL216W	YPL216W	DNS-függő transzkripció	5
YGR246C	BRF1	RNS polimeráz III transzkripció preiniciációs komplex összeszerelés	4
YBR272C	HSM3	Proteaszóma regulációs alegység összeszerelés	3
YDR340W	.	Bizonytalan	3
YKR040C	.	Bizonytalan	3
YOR038C	HIR2	DNS-függő transzkripció, heterokromatin remodeling	3
YCL069W	VBA3	Aminosav transzport	2
YER179W	DMC1	Reciprok meiotikus rekombináció	2
YKR105C	VBA5	Aminosav transzport	2
YNL039W	BDP1	RNS polimeráz III transzkripció preiniciációs komplex összeszerelés	2
YNL172W	APC1	Kilépés a meióziséből	2
YBR073W	RDH54	Meiotikus testvér kromatid szegregáció	1
YCL010C	SGF29	DNS-függő transzkripció	1
YCR024C-B	YCR024C-B	Nem jellemzett	1
YCR097W	HMRA1	DNS-függő transzkripció szabályozás	1
YDL076C	RXT3	DNS-függő transzkripció	1
YDL164C	CDC9	DNA ligation involved in DNA repair	1
YDL183C	YDL183C	Kálium ion transzport	1
YDR195W	REF2	snoRNS 3'-vég átírás	1
YDR395W	SXM1	mRNS transzport	1
YDR444W	YDR444W	Nem jellemzett	1
YDR512C	EMI1	Mitochondriális légzési lánc komplex összeszerelés	1
YFL037W	TUB2	Fehérje polimerizáció	1
YFR027W	ECO1	Telomer szerveződés	1
YFR036W-A	.	Bizonytalan	1
YGL195W	GCN1	Transzláció elongáció szabályozás	1
YGL206C	CHC1	Endocitózis	1
YGR005C	TFG2	DNS-függő transzkripció szabályozás	1
YGR044C	RME1	DNS-függő transzkripció szabályozás	1
YHL041W	.	Bizonytalan	1
YHR086W	NAM8	Magi mRNA splicing pozitív regulátora, spliceozómán keresztül	1
YILO29W-A	.	Bizonytalan	1
YIL030C	SSM4	Doa10p ubiquitin ligáz komplex	1
YIL041W	GVP36	Vakuólum szerveződés	1
YIL115C	NUP159	mRNS transzport	1

YJL129C	TRK1	Kálium ion transport	1
YJR023C	.	Bizonytalan	1
YKR007W	MEH1	Mikroautofágia	1
YKR090W	PXL1	Sejt polaritás fenntartása	1
YKR099W	BAS1	DNS-függő transzkripció szabályozás	1
YLL001W	DNM1	Fehérje homooligomerizáció	1
YLL032C	YLL032C	Lehetséges riboszóma kölcsönható partner	1
YLR399C	BDF1	DNS hibajavítás	1
YMR075C-A	.	Bizonytalan	1
YMR290W-A	.	Bizonytalan	1
YNL299W	TRF5	U4 snRNS 3'-vég átírás	1
YNR034W	SOL1	tRNS export a sejtmagból	1
YNR074C	AIF1	Apoptózis pozitív regulátora	1
YOL075C	YOL075C	Transzport	1
YOL086W-A	YOL086W-A	Válasz DNS károsító szignálra	1
YOR151C	RPB2	DNS-függő transzkripció szabályozás	1
YPL243W	SRP68	SRP-függő kotranszlációs fehérje irányítás a sejtmembránba, jelző szekvencia felismerés	1
YPR112C	MRD1	Processzóma (Riboszóma összeszerelés intermedier) kis alegysége	1
YPR194C	OPT2	Fehérje transzport	1

1. Táblázat. Nem-szinoním pontmutációkat hordozó gének listája. A táblázat összesítve tartalmazza azon gének listáját, melyek kódoló szekvenciájában legalább egy evolúciós vonalban nem-szinoním pontmutáció következett be. A táblázat negyedik oszlopa ad információt arról, hogy hány evolúciós vonalban azonosítottunk nem szinoním pontmutációt az adott génben.