

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

***A Drosophila 26S proteaszóma p54 alegységének lehetséges
extraproteaszómális szerepe***

Kiss Petra Veronika

Témavezető: Dr. Udvardy Andor

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi Kar

Biológia Doktori Iskola

MTA SZBK Biokémia Intézet

Szeged

2007.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
Bevezetés, irodalmi áttekintés	5
Történeti áttekintés	5
A 26S proteaszóma	7
A 20S proteaszóma	8
A 19S regulátor komplex	11
Az ubikvitináció	16
A p54 alegység	17
Egyéb ubikvitin receptorok	20
Zn ²⁺ - kötő fehérjék és a Zn ²⁺ szerepe a sejtben	25
Célkitűzések	27
Anyagok és módszerek	28
Eredmények	40
Az eredmények összefoglalása	75
Az eredmények tárgyalása	77
Irodalomjegyzék	84
Összefoglaló	108
Summary	114
Köszönetnyilvánítás	119

Rövidítések jegyzéke

AAA ATPáz: számos celluláris aktivitással asszociált ATP-áz (ATPases associated with various cellular activities)

AAA: AAA ATPáz domén

APC/C: anafázis előremozdító komplex/cikloszóma (anaphase promoting complex/cyclosome)

ATP: adenzin 5'-trifoszfát (adenosine 5'-triphosphate)

ATP-áz: adenzin 5'-trifoszfátáz

BAG: a Bcl2 fehérjével kapcsolódó atanogén domén (Bcl2-associated athanogene domain)

Bp: bázispár

CAD: konzervált ATPáz domén (conserved ATPase domain)

CBD: kitin-kötő domén (chitin binding domain)

cDNS: komplementer DNS (complementary DNA)

CHAPS-3: [(3-kolamidopropil)dimetilammonio]-1-propánszulfonát hidrát ((3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate)

CHIP: a Hsc70 fehérjével kölcsönható fehérje (Hsc70 interacting protein)

COP9: konstitutív fotomorfozogenézis 9 (constitutive photomorphogenesis 9)

CP: a proteaszóma katalitikus alkomplexuma, másnéven 20S proteaszóma (core particle)

C-terminális: karboxi-terminális (carboxy-terminal)

DEAE: dietil-amino-etanol (diethylamino ethanol)

DNS: dezoxiribonukleinsav

Dph1 és hPLIC: a sarjadzó élesztő Dsk2 fehérje hasadó élesztő és emberi homológjának elnevezése

DSS: diszükcinimidil-szuberát

DTT: ditiotritol

DUB: deubikvitináló enzim

E1: ubikvitin aktiváló enzim

E2: ubikvitin konjugáló enzim

E3 :ubikvitin-protein ligáz

E4: ubikvitin lánc elongációs faktor

eIF3: eukarióta iníciációs faktor 3

ERAD: endoplazmatikus retikulumhoz kapcsolódó degradációs útvonal (endoplasmic reticulum associated degradation)

GFP: zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein)

HRP: torma peroxidáz (horseradish peroxidase)

I κ B: az NF κ B α inhibítora (inhibitor of NF κ B α)

Id1: egy DNS-kötést gátló fehérje (inhibitor of DNA-binding 1)

IPG: immobilizált pH grádiens (immobilized pH gradient)

JAMM: Jab1/MPN domén-asszociált metalloizopeptidáz motívum

kb, kbp: kilobázispár

kDa: kilodalton

mAb: monoklonális ellenanyag (monoclonal antibody)
 MALDI-TOF MS: egyfajta tömegspektrométeren végzett tömegspektrometria (matrix-assisted laser-desorption ionisation-time-of-flight mass-spectrometry)
 MDA: megadalton
 MHC I: fő hisztokompatibilitási komplex I (major histocompatibility complex I)
 NFκB: transzkripció faktor (nuclear factor κB)
 Npl4: a Cdc48 fehérje kofaktora
 N-terminális: amino-terminális (amino-terminal)
 Ntn: N-terminális nukleofil
 PAGE: poliakrilamid gélelektroforézis
 PB1: a szekvesztoszóma C-terminális doménje, melynek szerkezete hasonló az ubikvitinéhez
 PBS: foszfáttal pufferelt sóoldat (phosphate buffered saline)
 PCR: polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
 PIPs: proteaszómával kölcsönható fehérjék (proteasome interacting proteins)
 PMSF: szerin proteáz gátló, fenil-metán-szulfonil-fluorid (phenylmethanesulphonyl fluoride vagy phenylmethylsulphonyl fluoride)
 PSD: post source decay
 PUbS1: poliubikvitin-kötő hely-1 (poly-Ub binding site 1)
 Pus1: a sarjadzó élesztő Rpn10 fehérje hasadó élesztő homológjának elnevezése
 PVDF: polivinilidén-difluorid
 Rhp23 és hRad23: a sarjadzó élesztő Rad23 fehérje hasadó élesztő és emberi homológjának elnevezése
 RNP: ribonukleoprotein
 RNS: ribonukleinsav
 RP: a proteaszóma szabályozó alkompexuma, másnéven 19S komplex (regulatory particle)
 Rpn: regulátor partikulum nem ATP-áz (regulatory particle non-ATPase)
 Rpt: regulátor partikulum AAA ATP-áz (regulatory particle triple A ATPase)
 RT-PCR: reverz transzkripció kapcsolt PCR (reverse transcription coupled PCR)
 SDS: nátrium-dodecyl-szulfát (sodium dodecyl sulfate)
 SUMO: kis, ubikvitinhez hasonló módosító fehérje (small ubiquitin-related modifier)
 UAS: a Gal4-UAS rendszerben az indukálni kívánt géntől 5' irányban elhelyezkedő aktiváló transzkripció faktor kötő hely (upstream activating sequence)
 Ub: ubikvitin (ubiquitin)
 UBA: ubikvitin-útvonallal asszociált (ubiquitin-pathway-associated)
 Ubc: ubikvitin konjugáló enzim (ubiquitin conjugating enzyme)
 UBL: ubikvitin-szerű (ubiquitin-like)
 UBX: ubikvitin szabályozó X (ubiquitin regulatory X)
 Ubx3/Shp1/p47: a Cdc48 fehérje kofaktora
 UCH: ubikvitin C-terminális hidroláz
 Ufd1: a Cdc48 fehérje kofaktora
 UIM: ubikvitinnel kölcsönható motívum (ubiquitin interaction motif)
 VCP: vazolint tartalmazó fehérje (vasolin containing protein) vagy Cdc48 vagy p97
 VWA: von Willebrand A típusú domén
 w/v: vegyes százalék, tömeg/térfogat (weight/volume)

Bevezetés

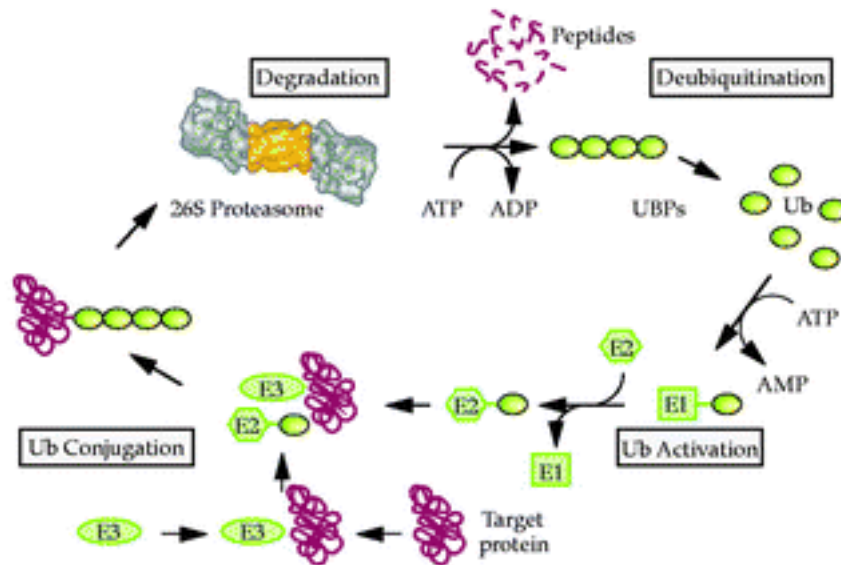
Történeti áttekintés

Az 1980-as évek előtt a biológiai kutatás középpontjában annak vizsgálata állt, hogyan fordítódik le a DNS információtartalma a fehérjék nyelvére (1, 2). Egészen idáig fenntartotta magát ugyanis az a nézet, hogy a legtöbb intracelluláris fehérje hosszú életű, így a fehérjék lebomlásának vizsgálata, elhanyagolt kutatási terület maradt. Az 1980-as években azonban két, egymást kiegészítő felfedezés történt. Egyrészt, Avram Hershko és tanítványa Aaron Ciechanover, valamint a velük együtt dolgozó Irwin Rose, 1978 és 1983 között felfedezték, hogy néhány fehérje, melyeket egy retikulocita kivonathoz adtak, kovalensen hozzákapcsolódott egy másik, 76 aminosavból álló fehérjéhez, az úgynevezett ubikvitinhez és, hogy ezeket az ubikvitinált fehérjéket az extraktumban lévő ATP-függő proteáz processzíven lebontotta (3, 4).

Hershko és kollégái azután azonosították azokat az enzimeket - melyeket E1 (ubikvitin aktiváló enzim), E2 (ubikvitin konjugáló enzim) és E3 (ubikvitin-protein ligáz) enzimeknek neveztek el - melyek az ubikvitinnek fehérjékhez történő kapcsolását végzik (5).

Az ATP-függő proteáz jellemzését, melyet ma 26S proteaszómának nevezünk, és amely az ubikvitinált fehérjék lebontását végzi, számos laboratórium együttesen végezte az 1990-es években (6).

1984 és 1990 között Alexander Varshavsky és kollégái felderítették az ubikvitin-proteaszóma rendszer (1. ábra) első biológiai funkcióit és a rendszer specificitásának forrását, azaz a rövid életű fehérjékben megtalálható degradációs jeleket, melyek lehetővé teszik ubikvitinnel történő megjelölésüket. Emlős sejtekkel és élesztővel (*Saccharomyces cerevisiae*) végzett genetikai, biokémiai és sejtbiológiai vizsgálatok során felfedezték, hogy az ubikvitin-rendszer alapvető fontosságú az élő sejtekben lévő fehérjék nagy részének lebontásához, szükséges a sejt életképességéhez, valamint fontos szerepe van a sejtciklusban, a fehérjeszintézisben, a transzkripció szabályozásában és a stresszre adott válaszreakciókban (7-17).



1. ábra: Az ubikvitin-proteaszóma útvonal.

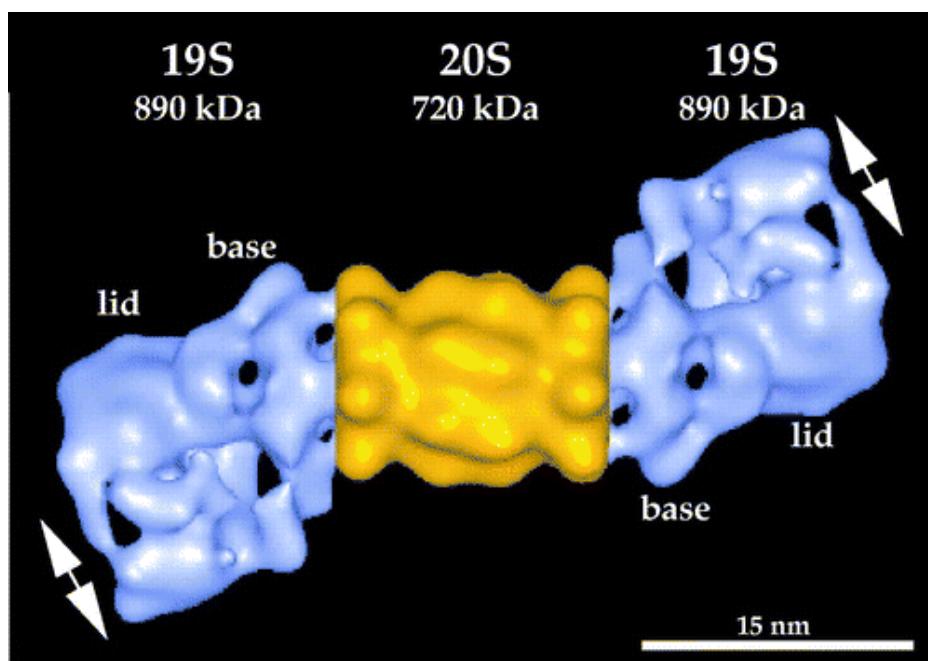
Voges és munkatársai, Annu. Rev. Biochem. 1999, 68:1015-1068, módosítva

Ezek az egymást kiegészítő felfedezések vezettek három, mindaddig ismeretlen tény feltáráshoz. Egyrészt, hogy az intracelluláris fehérjelebontás magában foglal egy újfajta fehérjemódosítást: az ubikvitin konjugációt (3-5). Másrészt, hogy az ubikvitin kapcsolódásának szelektivitását a rövid életidejű fehérjékben lévő degradációs szignálok (degronok) biztosítják (8,9,14,17). Végül pedig, hogy az ubikvitin-függő folyamatok a sejtfiziológia legfontosabb regulációs eseményei közé tartoznak (7,10-13,15,18), elsősorban az intracelluláris fehérjék szintjének szabályozása által. Korábban úgy gondolták, hogy ezt a folyamatot szinte kizárólag a transzkripció és a transláció kontrollálja.

Ennek eredményeképp az ubikvitinációval és az ubikvitin-proteaszóma rendszerrel foglalkozó tudományterület a 80-as évek óta nagymértékben kiterjedésedett, és manapság az orvosi-biológiai tudomány egyik legnagyobb területévé vált.

A 26S proteaszóma

Az eukarióta sejtekben a legtöbb citoszolikus és nukleáris fehérje, az ubiquitin-proteaszóma útvonalon bomlik le. A 26S proteaszóma (2. ábra), mely a fehérjelebontást katalizálja, egy hatalmas molekuláris gépezetnek fogható fel, mely 2,5 MDa molekulatömegű, és körülbelül 31 különböző alegységből áll (19).



2. ábra: A *Drosophila* 26S proteaszóma háromdimenziós struktúrájának modellje, mely annak elektronmikroszkópos képén alapul és a *Thermoplasma* 20S proteaszóma kristály struktúrájának felhasználásával készült.

Voges és munkatársai, Annu. Rev. Biochem. 1999, 68:1015-1068

A 26S proteaszóma egy hordó alakú proteolitikus ún. mag komplexből (CP) vagy másnéven 20S proteaszómából épül fel, amihez egyik vagy mindkét végén az ubiquitinált fehérjék felismeréséért felelős 19S regulátor komplexek (RP) kapcsolódnak. A regulátor komplexek végzik ezen kívül az ubiquitinált célfehérjék kitekerését és a 20S komplexbe történő betáplálását, ahol azok oligopeptidekké degradálódnak. Míg a CP szerkezete, alegységeiből

történő felépülése és enzimatis mechanizmusa részletesen ismert, addig a RP funkcionális szerveződése jóval kevésbé felderített. Noha a 19S komplex alegységeinek legtöbbjét már azonosították, specifikus funkciót eddig csak néhányukhoz sikerült hozzárendelni. A 26S proteaszóma alacsony felbontású elektronmikroszkópos képét már sikerült meghatározni, de a 19S komplex alegységeinek precíz elrendeződése még nem tisztázott.

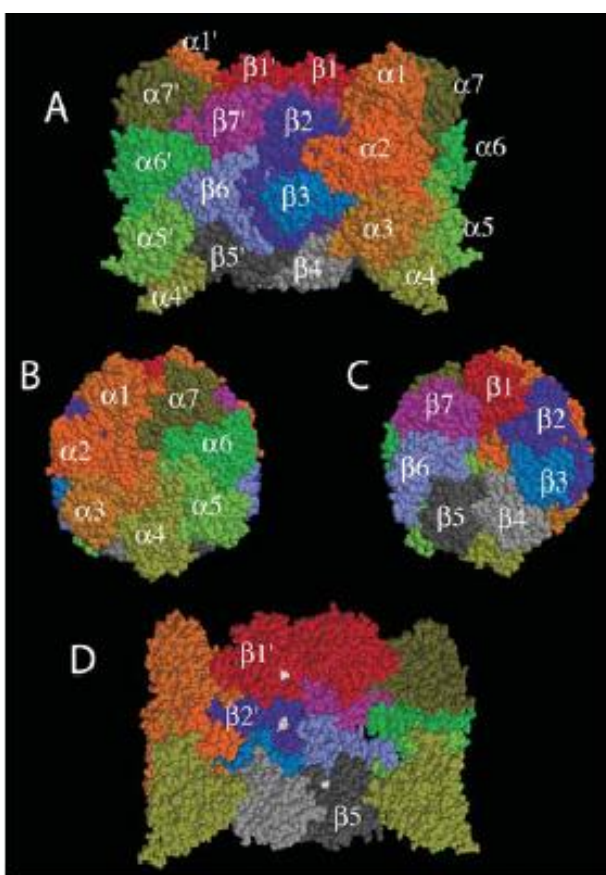
A 20S proteaszóma

A 20S proteaszómát (3. ábra) elsőként 1968-ban figyelték meg elektronmikroszkópban, humán eritrocita lizátumokban, és cylinder alakú szerkezete miatt elnevezték „cilindrin”-nek, de funkcióját akkor még nem ismerték (20). 1980-ban egy 700 kDa molekulatömegű kation-érzékeny neutrális proteázt izoláltak szarvasmarha hipofizisból (21), mely a korabeli közlemények szerint három-öt fajta, egyenként 24-28 kDa molekulatömegű alegységből épült fel, és képes volt peptid szubsztrátokat hidrofób, savas és bázikus helyeken hasítani (22, 23). E felfedezéstől függetlenül egy 600 kDa-os cső alakú komplexből álló alkalikus proteázt izoláltak ponty izomszövetből, mely komplex 15 nm hosszú és 10 nm átmérőjű volt és négy egymás fölött elhelyezkedő gyűrűből épült fel (24). Egy henger alakú, 22S-sel ülepedő részecskét hasonló méretekkel *Xenopus laevis* oociták citoplazmájából és magjából is tisztítottak (25), valamint hasonló részecskéket azonosítottak ezzel egy időben patkány izomszövetből (26) és májból (27).

Ezzel párhuzamosan egy „proszómának” vagy 19S ribonukleoproteinnek (RNP) nevezett részecskét is találtak számos eukariótában (28). Ez a részecske hasonlónak tűnt méretben és alegységösszetételét tekintve a multikatalitikus proteáz komplexhez, de úgy tűnt, hogy RNS-hez kapcsolódik, ezért feltételezték, hogy a génexpresszió szabályozásában van szerepe (29). Az 1988-as évben azonban bebizonyosodott, hogy a multikatalitikus proteáz komplex és a proszóma azonosak (30, 31). Egyezményes névként a proteaszóma – egész pontosan a 20S proteaszóma – nevet választották, mely egyaránt utal a komplex proteolitikus aktivitására és összetett szerkezetére (30).

Első leírásuktól kezdve azt gondolták, hogy a 20S proteaszómák csak eukarióta sejtekben találhatóak meg. 1989-ben különböző prokariótákból származó kivonatokat teszteltek, vajon tartalmaznak-e nagy molekulatömegű proteázokat (32). Az eukarióta 20S proteaszómához

nagyon hasonló felépítésű, kimotriptikus aktivitással rendelkező komplexet izoláltak a *Thermoplasma acidophilum* nevű archebaktériumból (32). Ma már tudjuk, hogy a 20S proteaszómák általánosan elterjedtek az archeák körében (33). Az első bakteriális proteaszómát egy actinomycete-ből, a *Rhodococcus erythropolis*-ből tisztították (34). Az eubaktériumok közül, úgy tűnik, a 20S proteaszómák csak az actinomycetales-ben vannak jelen (35). Az eukarióta sejtekkel ellentétben a prokariótákban a proteaszómák nem szükségesek az életképességhez. A prokariótákban a proteolitikus rendszerek redundanciája valószínűleg kompenzálni tudja a proteaszóma funkcióját (36).



3. ábra: A *Saccharomyces cerevisiae* 20S proteaszóma szerkezetének térkitöltős modellje különböző nézetekből.

(A) kissé megdőntött oldalnézet, (B) felülnézet, α -gyűrű, (C) a két β -gyűrű között elvágott fél proteaszóma felülnézete, β -gyűrű, (D) oldalnézet a 20S partikulum lumenébe, gyűrűként három alegység eltávolítása után: a háromféle aktív β alegység ($\beta 1$, $\beta 2$ és $\beta 5$) és katalitikus treonin aminosavuk (fehér színnel) jelölve

W. Heinemeyer és munkatársai, Cell. Mol. Life Sci Vol.61, 2004

A CP-ok mind a prokariótákban, mind az eukariótákban 28 alegységből épülnek fel, melyek azonban különböznek komplexitásukban. A prokarióta proteaszómák két eltérő, de egymáshoz hasonló polipeptidet tartalmaznak, 14 darab azonos α , és 14 darab β alegységből állnak, míg az eukarióta CP-ok 7 különböző α és 7 különböző β alegység két-két kópiájából épülnek fel. A különbség ellenére ezen komplexek általános felépítése megegyezik: az α - és β -típusú alegységek héttagú homo- $\{\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ (prokarióták)} vagy heterooligomer $\{(\alpha_1-\alpha_7)$ ($\beta_1-\beta_7$) ($\beta_1-\beta_7$) ($\alpha_1-\alpha_7$) (eukarióták)} gyűrűket alkotnak. Két egymás felett elhelyezkedő β -típusú alegységekből álló gyűrűt alulról és felülről egy-egy α -típusú alegységekből felépülő gyűrű határol. Prokarióták közül kivételnek tekinthető a *Rhodococcus* 20S proteaszóma, mely két különböző α -típusú és két különböző β -típusú alegységből épül fel (35). Alacsonyabbrendű eukariótákban, mint például a sarjadzó élesztőben, a 20S proteaszómák 7 különböző α - és 7 különböző β -típusú alegységből állnak, melyek közül csak három β -típusú alegység rendelkezik katalitikusan aktív hellyel (37-39). A proteolitikusan aktív β alegységek a két belső gyűrűben helyezkednek el. Emlősökben γ -interferon hatására három további β -típusú alegység expressziója indul meg, (melyeket indukált β -típusú alegységeknek nevezünk, β_i), melyek mindegyike helyettesít egy specifikus, állandóan expresszálódó aktív β -típusú alegységet (40). Ezek az immunoproteaszómák az MHC I-es típusú molekulákon bemutatásra kerülő antigének kialakításáért felelősek (41). *Drosophila melanogaster* -ben pedig tesztiszspecifikus izoformákat kódoló duplikált proteaszómális géneket találtak (42), mely izoformák szerepe még nem tisztázott.

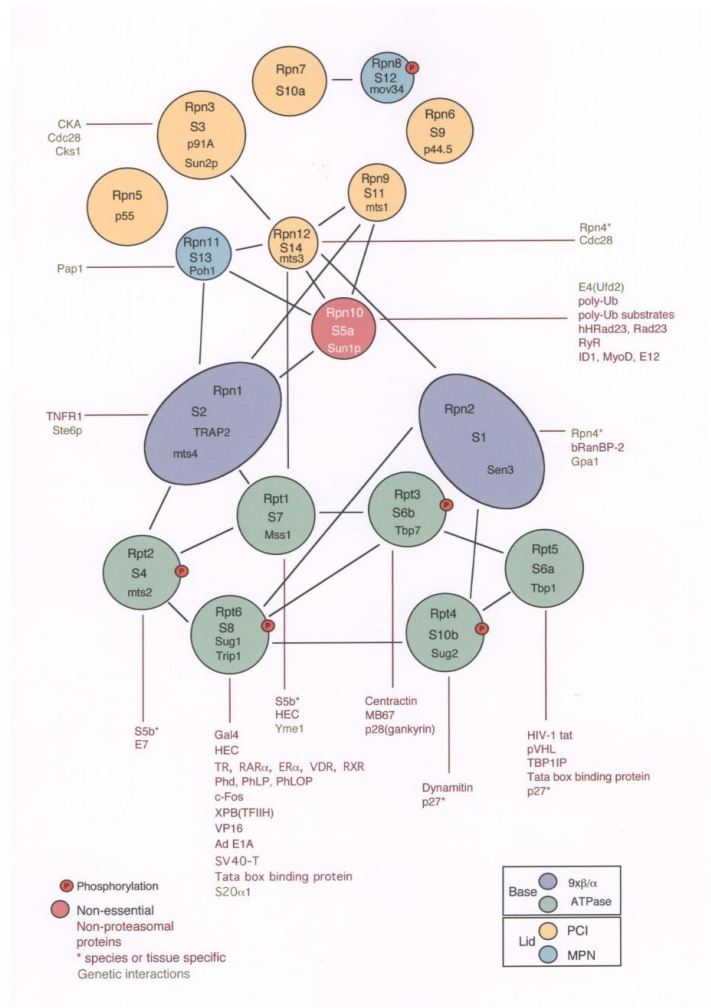
A 20S proteaszómák elektronmikroszkópban hordó alakú képet mutatnak, melyek 15 nm hosszúak és 11 nm átmérőjűek (43-47). A négy gyűrű három belső üreget hoz létre (48), két előkamrát és egy központi proteolitikus kamrát, melyet a β -típusú alegységek hoznak létre. A három kompartment csak egy központi csatornán keresztül érhető el, mely végighúzódik a hordó tengelyében (49). Magasabbrendűekben az előkamrák bejárata α -típusú alegységek N-terminális végén elhelyezkedő aminosavoldalláncok révén zárt (39).

A proteaszóma az N-terminális nukleofil (Ntn) hidrolázok családjába tartozik (50, 51), ami azt jelenti, hogy az aktív β alegységek amino-terminális végén elhelyezkedő treonin-1 aminosav γ -oxigénatomja (52) szerepel nukleofilként a peptid kötés karbonil szénatomja elleni katalitikus támadásban. Laktacisztin kovalens kapcsolódása a β -típusú alegységek Thr-

1 aminosavához irreverzibilisen gátolja a proteaszóma proteolitikus aktivitását, bizonyítva, hogy ez az aminosav esszenciális a katalízishez (53). A proteaszóma egyéb kovalens inhibitorai a peptidil-vinil-szulfonok (54, 55) vagy a dipeptidil bórsavak (56, 57), reverzibilis inhibitorai a peptid-aldehidek (58, 59). A proteaszóma inhibitorok segítettek a proteaszóma sejtbeli funkcióinak tisztázásában (60). Attól függően, hogy a hasítandó peptidkötés N-terminálisán (a P1 pozícióban) hidrofób vagy aromás aminosav, bázikus aminosav, vagy glutaminsav helyezkedik el, a proteaszóma kimotripszin-szerű, tripszin-szerű vagy peptidilglutamil peptid hidrolitikus aktivitást mutat. Ezen aktivitások mindegyike specifikus β -típusú alegységekhez köthetőek (61-63). A szubsztrátfehérjéket a 20S proteaszóma processzív módon degradálja, ami azt jelenti, hogy nem bocsát ki degradációs köztermékeket (64), hanem a központi kamra mindaddig hatékonyan fogva tartja a fehérjéket, míg méretük egy meghatározott hosszúsági érték alá nem kerül. A peptid termékek méreteloszlása 4 és 25 aminosav között változik, 7 és 9 aminosav közti átlaghosszal (65).

A 19S regulátor komplex

Csak nemrégiben bizonyosodott be, hogy a 26S proteaszóma úgy jön létre, hogy a 20S proteaszómához egy meghatározott komplex kapcsolódik, melyet labdának (66), μ partikulumnak (67), PA700-nak (68), vagy 19S „sapka” komplexnek (69) nevezték el. E komplexet ma egyezményesen 19S regulátor partikulumnak (RP) nevezzük (4. ábra). Elektronmikroszkópos képen a 26S proteaszóma egy jól felismerhető struktúra, mely a 20S komplexből, valamint egyik vagy mindkét végén hozzákapcsolódó regulátor partikulum(ok)-ból áll (70). A 19S regulátorok és a 20S proteaszóma kapcsolódását a modulátornak nevezett komplex segíti elő (71).



4. ábra: A 19S regulátor komplex alegységeinek kölcsönhatásai.

K. Ferrell és munkatársai, Trends in Biochem. Sci., 25(2),83-88(2000)

A különböző organizmusokban a RP–ot alkotó alegységek pontos száma nem ismert (67, 72, 73), mivel nem kizárt, hogy néhány alegység, mely gyengébben vagy csak átmenetileg kapcsolódik a 19S regulátorhoz, az alkalmazott tisztítási eljárás során leválik a komplexről. Az 1-es táblázat tartalmazza azon fehérjék és homológjaik listáját, melyekről legalább egyszer kimutatták, hogy a RP részei. Két nomenklatura, melyet széles körben használnak a 19S komplex alegységeinek jelölésére az emlős „S”- (mint alegység, subunit) (73) és a *S. cerevisiae* „Rp”- (regulátor partikulum) nevezéktan (74), melyek mindegyike a molekulatömegük alapján rendezi sorba az alegységeket. Az Rp nomenklatura különbséget tesz a Rp trifoszfátázok (Rpt) és az Rp nem-ATP-áz (Rpn) alegységek között.

<u><i>Drosophila</i></u>	<u>ember</u>	<u>pékélesztő</u>	<u>ellenanyag</u>
p110	S1	Rpn 2	
p97	S2	Rpn 1	
p58	S3	Rpn 3	
p56	S4	Rpt 2	
p55	S5b	Rpn 5	
p54	S5a	Rpn 10	mAb 170, 28 és 439
p50	S6'	Rpt 5	mAb 112
p48A	S6	Rpt 3	mAb IB8 és 12A1
p48B	S7	Rpt 1	
p42A	S10a	Rpn 7	mAb 123 és 243
p42B	S9	Rpn 6	
p42C	S8	Rpt 6	mAb 9E3
p42D	S10b	Rpt 4	
p39A	S11	Rpn 9	mAb 50
p39B	S12	Rpn 8	
p37A	UCH37	-	
p37B	S13	Rpn 11	
p30	S14	Rpn12	
-	ADRM1	Rpn13	

I. táblázat: A 19S regulátor komplex alegységeinek homológjai három fajban, és az általunk használt, *Drosophila* alegységek ellen kifejlesztett ellenanyagok elnevezése

In vitro, a fiziológiásnál magasabb sókoncentráció mellett, a RP-ot két komplexre lehet szétválasztani. A nagyobb tömegű, a CP-hoz képest proximálisan elhelyezkedő rész az alap vagy bázis alkomplex (base), a kisebb és a 20S maghoz képest disztálisan elhelyezkedő a fedél (lid) alkomplex (75).

A bázis alkomplex hat ATP-áz (S7/Rpt1/p48B, S4/Rpt2/p56, S6/Rpt3/p48A, S10b/Rpt4/p42D, S6'/Rpt5/p50 és S8/Rpt6/p42C), a RP két legnagyobb alegységét (S1/Rpn2/p110 és S2/Rpn1/p97), valamint az S5a/Rpn10/p54-et tartalmazza (1. táblázat). A 20S proteaszóma és a bázis által formált komplex elégséges a nem ubikvitinált célfehérjék ATP-függő lebontásához, de nem elégséges az ubikvitinált célfehérjék ATP-függő lebontásához (75). Mind a hat proteaszómális ATP-áz tartalmaz egy 230 aminosav hosszú AAA (76, 77) vagy CAD modult (78), mely az AAA ATP-ázok közös jellemzője (76, 78, 79). Számos funkciót tulajdonítanak a proteaszómális ATP-ázoknak. Egyrészt ATP-hidrolízisből felszabaduló energiát felhasználva elősegítik a 26S proteaszómák összeszerelődését 19S komplexekből és CP-ből (69, 72, 80, 81). Másrészt, az ATP-ázoknak szerepe van a 20S proteaszóma centrális csatornájának felnyitásában, mely csatorna a szabad partikulum esetén zárt (39). Harmadrészt, az ATP-ázok valószínűleg megkötik (82) és kitekerik (83) a szubsztrátfehérjéket, mely aktivitás a molekuláris chaperonok refolding aktivitásához hasonló. Végül, az ATP-ázok valószínűleg segítik a kitekert szubsztrátfehérjék transzlokációját a 20S proteaszóma központi kamrájába (84). A proteaszómális ATP-ázok hexamer gyűrűbe rendeződnek, mely heterohexamer gyűrű közvetlenül kapcsolódik a 20S proteaszóma héttagú α -típusú alegységekből álló külső gyűrűjéhez.

Hasadó és sarjadzó élesztővel végzett deléciós analízisek kimutatták, hogy a 19S ATP-áz gének esszenciálisak (85-92). Az egyedi ATP-áz alegységek helyspecifikus mutagenézissel történő inaktivációja élesztőben különböző fenotípusokat eredményezett (93). Így az Rpt ATP-ázok nagyfokú szekvencia hasonlóságuk ellenére funkciójukat tekintve nem redundánsak (93, 94). Az egér SUG1 (Rpt6) fehérjéről kimutatták, hogy 3'-5' DNS helikáz aktivitással rendelkezik (95) és, hogy specifikusan kölcsönhat a TFIIH transzkripció faktor XPB alegységével, mely transzkripció faktor az RNS polimeráz holoenzim egyik komponense (96, 97). Egyéb 19S ATP-ázokról kimutatták, hogy erősítik a transzaktivációt azáltal, hogy kölcsönhatnak transzkripcionális aktivátorokkal (98, 99). Ezek az ellentmondó

kísérleti eredmények megmagyarázhatóak, ha figyelembe vesszük, hogy a transzkripcionális regulátorokat a 26S proteaszóma bontja le (100). Ezen kívül a 26S proteaszómának szerepe van az NF κ B transzkripciós faktor prekursorának, a p105-nek processzáálásában és az NF κ B inhibitorának, az I κ B-nek a lebontásában (101). A 19S ATP-áz alegységek kapcsolódása a transzkripcióban szerepet játszó fehérjékkel valószínűleg inkább a 26S proteaszómának a transzkripció proteolitikus szabályozásában betöltött fontosságára utal, és kevésbé az ATP-áz alegységeinek transzkripcionális mediátor szerepére (102).

Az Rpn1 és Rpn2 alegységek jelentős szekvenciahasonlóságot mutatnak egymással (~20%). Mindkettő 35-40 aminosav hosszú, leucinban gazdag ismétlődéseket tartalmaz, melyek váltakoznak nagy hidrofób és glicin vagy alanin tartalmú szakaszokkal a C-terminálisukon (103). Az Rpn1 és Rpn2 alegységek ubikvitin interakciós motívumszerű (UIM) szekvenciákat is tartalmaznak. Mindkettő kapcsolatot létesít ATPáz és fedő alegységekkel is, így alakult ki az a nézet, hogy ezek az alegységek képezik a regulátor gerincét, egyfajta vázat alkotnak, amelyen a többi alegység működik. Ezt erősíti, hogy az ubikvitin ligázok és UBL-UBA domén fehérjék, valamint az Rpn10 is az Rpn1-hez horgonyzódnak (104, 105).

A fedél alkomplex alegységei közül öt: az S3/Rpn3/p58, S5b/Rpn5/p55, S9/Rpn6/p42B, S10a/Rpn7/p42A és az S11/Rpn9/p39A PINT/PCI domént tartalmaznak a C-terminális részükön, míg az S12/Rpn8/p39B és az S13/Rpn11/p37B MPN domént tartalmaznak az N-terminális részükön (106, 107). Ezen motívumok egyike sem található meg egyik bázis alegységben sem, megtalálhatóak azonban különböző funkcióval bíró más, nagy fehérjekomplexekben, mint a COP9 komplexben (108) vagy az eukarióta iníciációs faktor 3 (eIF3) komplexben (109). A szekvenciahasonlóság ezek között a komplexek között még tovább terjed, ugyanis a COP9/szignoszóma hét alegysége, és az eIF3 komplex három alegysége homológiát mutat a megfelelő 19S fedél alkomplex alegységekkel.

A fedél alegységek közül eddig csak kevéshez sikerült specifikus funkciót hozzárendelni. Említésre méltó az Rpn11 alegység, melyről kimutatták, hogy egy Jab1/MPN domén-asszociált metallo-izopeptidáz (JAMM) motívumot tartalmaz, amely egy Zn²⁺-et képes koordinálni (110). Zn²⁺ elvonás hatására, vagy ha az aktív hely hisztidinjeit alaninra cserélték, a proteaszóma képtelen volt deubikvitinálni a multiubikvitinált Sic1 fehérjét (111). Kimutatták, hogy a proteaszómában az Rpn11 alegység Zn²⁺-függő módon katalizálja az ubikvitin lehasadását a szubsztrátokról, mielőtt azok a katalitikus komplexbe táplálódnak,

mely két folyamat szorosan kapcsolt egymással (112). Ezeket a jelenségeket *Drosophila*-ban és emberi sejttényészetekben is megfigyelték (113).

Ma már ismert, hogy más proteaszóma-asszociált deubikvitináló enzimek, mint pl. az Ubp6 is részt vesznek a szubsztrátok deubikvitinálásában, az Rpn11-gyel együttműködve (114). *Drosophilában* a p37A ubikvitin C-terminális hidroláz (UHC) is képes deubikvitinációra (115).

Az ubikvitináció

Az ubikvitin-26S proteaszóma rendszernek elsődleges szerepe van a sejtben lezajló nélkülözhetetlen folyamatban, a szelektív proteolízisben. Szükséges a sérült vagy rosszul feltekeredett fehérjék lebontásához, ezen kívül számos sejtciklust szabályozó molekula, transzkripciós faktor és tumor szupresszor szabályozott lebontásáért is felelős. Az ubikvitin rendszer azonban ennél jóval kiterjedtebb, azt is mondhatnánk a sejt minden szegletében megtalálható, számos proteolitikus és nem proteolitikus funkciója ismert. Az ubikvitin egy kis, evolúciósan konzervált fehérje. Kovalens hozzákapcsolása más fehérjékhez - az ubikvitináció -, változatos sejtbeli folyamatokban esszenciális szerepet játszik. Kétféle típusú ubikvitináció lehetséges: monoubikvitináció és multiubikvitináció. Míg a monoubikvitináció nem proteolitikus eseményekben vesz részt úgy, mint a hiszton módosítás (141), endocitózis, vezikuláris transzport (142), szignáltranszdukció (145) és vírus részecskék sarjadzása (143), addig a multiubikvitináció a proteolitikus események mellett a DNS-hibák kijavításában (144), a szignáltranszdukciós folyamatok szabályozásában (145) és a transzkripcióban (146, 147) játszik szerepet.

A fehérjék ubikvitinációja, mint már korábban említettem három enzim, az Ub-aktiváló enzim (E1), az Ub-konjugáló enzim (E2) és az Ub-protein ligáz (E3) összehangolt működésének eredménye (5, 116-119). Ebben a folyamatban az ubikvitin C-terminálisán, 76-os pozícióban elhelyezkedő glicin aminosav egy izopeptid kötés által hozzákapcsolódik a célfehérje valamelyik lizin aminosavához. Az E2 enzimek az E3 enzimekkel, mint szubsztátfelismerő faktorokkal összhangban működve meghatározzák, hogy a szubsztrátfehérje mely lizinjéhez kapcsolódjon az ubikvitin. Ugyanezen enzimkészletnek van szerepe az ubikvitinláncok kialakításában, mely láncoknak különböző topológiájuk lehet, attól függően, hogy az Ub hét

lizinje közül (Lys-6, Lys-11, Lys-27, Lys-29, Lys-33, Lys-48 vagy Lys-63) melyik kapcsolódik a szomszédos Ub C-terminális glicinjéhez. A három leggyakoribb és *in vivo* is megfigyelt ubikvitinláncok a 29-es, 63-as vagy a 48-as lizinen keresztül kapcsolódnak (120-123). A Lys-63 kapcsolt láncoknak fontos szerepe van például a DNS hibajavítás Rad 6-féle útvonalában (124), míg a homopolimer és négyes tagszám feletti (multiubikvitin lánc) Lys-48-kapcsolt ubikvitin láncok tűnnek az Ub-proteaszóma lebontási útvonal fő felismerési jelének. Ennek némileg ellentmond az a nemrégiben megjelent közlemény, mely az APC/C E3 enzim által *in vitro* szintetizált multiubikvitinált ciklin B ubikvitin láncait és proteaszómális degradációját vizsgálva arra a következtetésre jutott, hogy nemcsak a 48-as lizinen keresztül kapcsolódó multiubikvitin lánc szolgál degradációs jelként, hanem a 29-es és a 63-as is (125).

Az S5a/Rpn10/p54 alegység

Elsőként Deveraux és munkatársai fedezték fel, hogy a humán eritrocitákból tisztított 26S proteaszómák S5a/Rpn10/p54 alegysége *in vitro* képes kötni a Lys-48-kapcsolt ubikvitin láncokat (126). Kísérleteik során megállapították, hogy az alegység preferenciálisan köti a négy vagy annál több Ub-t tartalmazó ubikvitin láncokat. Számos mutációs kísérletet végeztek, hogy azonosítsák az S5a/Rpn10/p54 alegység Ub kötésért felelős régióit (127-129). A fehérje kivétel nélkül kifejezett preferenciát mutatott a hosszabb Ub-láncok iránt, összhangban a 26S proteaszóma preferenciájával a multiubikvitinált célfehérjék irányába. Az N-terminális 200 aminosava egyik vizsgált S5a homológoknak sem kötötte az Ub-láncokat, míg a C-terminális régiójuk (poliubikvitin-kötő hely, poli-Ub site 1, PUBS1) a teljes hosszúságú fehérjéhez hasonló kötési sajátságokat mutatott. A PUBS1 tartalmaz egy konzervált GVDP szekvenciát (Ub-kötő szegment 1), mely valószínűleg egy hurkot képez, és amelyet a szintén konzervált LAL/MALRV/LSM szekvencia (Ub-kötő szegment 2) követ, mely helikális struktúrába tekeredik. Az első öt aminosav a LAL/MALRV/LSM szekvenciában váltakozó nagy és kis hidrofób aminosavakat tartalmaz és esszenciális az ubikvitin kötéshez (128, 129). Különböző második Ub-kötő helyeket találtak például a humán és a *Drosophila* S5a homológokban, melyek tartalmazzák az 1-es vagy 2-es ubikvitin-kötő szegmenteket, és önmagukban szintén preferenciálisan kötik a hosszabb Ub-láncokat, és amelyek a rövidebb

élesztő Rpn10-ben nincsenek jelen. A humán homológban úgy tűnik, a két Ub-kötő hely kooperatívan működik (129). A fehérje N-terminálisán is található egy konzervált régió, mely hozzájárul a 19S komplex alapjának és fedelének összekapcsolásához (75), noha ezen szakasz deléciója nem gátolja meg a 26S proteaszóma megfelelő összeszerelődését (128) és (5. ábra).

```

sec. struct.      S                HHHHHHHHHHHHHHHHH
Hs_S5a           204 FEFGVDPSADPELALALRVSMEEQRQ
MM_S5a           204 FEFGVDPSADPELALALRVSMEEQRQ
Dm_S5a           205 FEFGVDPNEDPELALALRVSMEEQRQ
Sc_Rpn10         216 MDFGVDPSPMDPELAMALRLSMEEEQQ
At_MBP1          214 FDFGVDPNIDPELALALRVSMEEERA
Mc_S5a           215 FDFGVDPNLDPELALALRVSMEEERA
Sm_S5a           210 LEFGLDGAEDPDLLYALRVSMRDQRM
                ::**:*   **:*   ***:***:
                segment 1 segment 2

```

5. ábra: A különböző fajokból származó S5a homológok PUBS1 (1-es számú poliubikvitin-kötő hely) szekvenciái egymás fölött elhelyezve.

A konzervált aminosavak *-gal, az ubikvitinláncok megkötése szempontjából nélkülözhetetlen aminosavak pirossal vannak jelölve.

Hs: *Homo sapiens*; **Mm** *Mus musculus*; **Dm:** *Drosophila melanogaster*; **Sc:** *Saccharomyces cerevisiae*; **At:** *Arabidopsis thaliana*; **Mc:** *Mesembryanthemum crystallinum*; **Sm:** *Schistosoma mansoni*

Voges és munkatársai, Annu. Rev. Biochem. 1999, 68:1015-1068

A humán S5a N-terminális doménjéről kimutatták, hogy *in vitro* és *in vivo* specifikusan kapcsolódik egy DNS-kötés gátló fehérjéhez (inhibitor of DNA-binding 1, Id1). Az S5a-Id1 kölcsönhatás elősegíti a bázikus hélix-loop-hélix fehérjék disszociációját az Id1-ről és megnöveli a DNS-kötő hélix-loop-hélix homodimerek mennyiségét (130). Az S5a szekvenciahasonlóságot mutat a TFIIH alap transzkripciós faktor p44-es DNS-kötő alegységével (106). A TFIIH az RNS polimeráz II iníciációs komplex része, és sokrétű szerepe van a transzkripcióban és a DNS repair mechanizmusokban. Az S5a fehérje

megegyezik a humán agyalapi mirigy szekréciót gátló faktorával (131, 132). Ez a faktor egy eddig ismeretlen mechanizmus révén gátolja a kolera toxin által indukált folyadékszékreciót a bélben.

Az Rpn10 alegység élesztőben nem esszenciális, mivel a *Arpn10* mutánsok a vad típusú növekedési rátához hasonló növekedést mutatnak, a rövid életidejű fehérjék döntő többségét megfelelőképp le tudják bontani és nem érzékenyek UV besugárzásra vagy hőstresszre (133, 134). Mindemellett egy enyhe érzékenység aminosav-analógokkal szemben és az ubikvitin konjugátumok átlagos szintjének megnövekedése megfigyelhető *Arpn10* mutánsokban.

Drosophila melanogaster-ben a p54 deléciója lárvális- illetve bábállapotban bekövetkező, úgynevezett polifázisos letalitást, többszörös mitotikus defektusokat, a magasabb multimerszámú ubikvitinált fehérjék és defektív 26S proteaszóma partikulumok nagymértékű felhalmozódását eredményezi. Ugyanakkor az alegység deléciója nem destabilizálja a regulátor partikulumot, és nem zavarja meg a RP és a katalitikus core összeszerelődését (135). Kawahara és munkatársai az S5a/Rpn10/p54 alegységnek négy különböző variánsát találták meg egérben, melyek ugyanazon génről fejlődésspecifikus módon szabályozott alternatív splicing-gal keletkeznek (136). Ezeket az izoformákat Rpn10a-tól Rpn10e-ig nevezték el. Ezen izoformák közül a felnőtt állatból izolált Rpn10a hasonlít leginkább az emberi S5a-ra. A másik négy forma, melyeket a különböző fejlődési állapotú embriókból azonosítottak, N-terminális régiójukban megegyeznek egymással és az Rpn10a-val, ugyanakkor C-terminális felükben meglehetősen divergenciát mutatnak. Az Rpn10e a legmagasabb szintű expressziót az embrionális agyban mutatja. Ez az izoforma is része a proteaszómának, és noha az élesztő Rpn10-hez hasonlóan a második UIM-doménje hiányzik, az Rpn10a-hoz hasonló affinitást mutatott a multiubikvitinált lizozimhoz *in vitro*. Ugyanakkor az Rpn10a és Rpn10e jelentősen eltérő hatással volt a B-típusú ciklinek lebontására *Xenopus* petetesejt extraktumokban. Így tehát a 26S proteaszómának funkcionálisan legalább két különböző formája van egérben, egyik az általánosan kifejeződő Rpn10a-t, a másik az embrió specifikus Rpn10e-tartalmazza. Míg ez előbbi folyamatosan, a sejttípusok széles skálájában vesz részt a proteolízisben, addig ez utóbbi valószínűleg specializált szerepet játszik a korai embrionális fejlődés során.

A *Drosophila* p54-ről és élesztő homológjáról az Rpn10-ről is kimutatták, hogy ez az egyetlen 26S proteaszóma alegység, mely jelentős mennyiségben jelen van a proteaszómán kívül szabad monomer formában is (134). Ez a felfedezés utalhat arra, hogy az

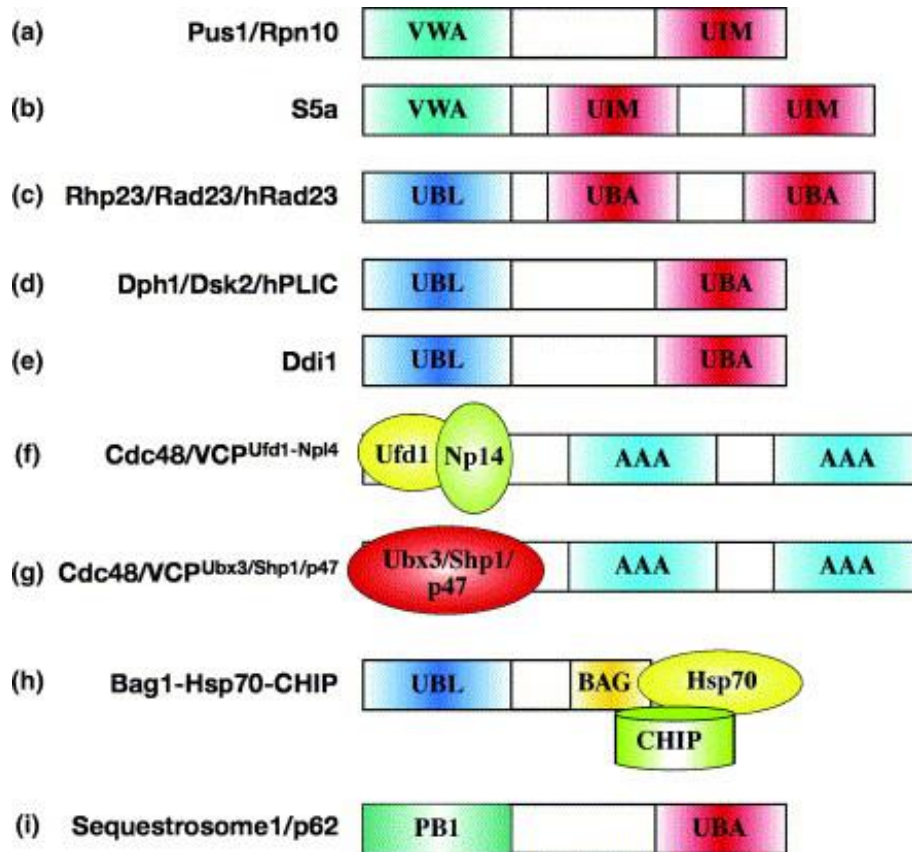
S5a/Rpn10/p54 a szabad és komplex-kötött forma között dinamikus egyensúlyban van, mintegy ingázik a két állapot között. Ez a jelenség egyben felveti annak lehetőségét, hogy az S5a/Rpn10/p54 fehérjének a proteaszóma szubsztrátok felismerésén kívül egyéb szerepei is vannak. A szabad fehérjének az ubikvitinált fehérjék megkötésén kívül szerepe lehet olyan folyamatokban is, melyek a fehérjelebontástól függetlenek.

Nem kizárólag az Rpn10 lehet képes a proteaszómán belül multiubikvitin láncot kötni. Egy fotoaktivált keresztkötéses kísérletben feltűnő erősséggel kötött egy jelölt multiubikvitin láncot az egyik regulátor komplex ATPáz alegység, név szerint az S6'/Rpt5. Egyes elgondolások szerint az S6'/Rpt5 az Rpn10 és az UBL-UBA receptorok után következő lépésben működik, vagyis már a proteaszómán belüli folyamatokban (137).

Az a megfigyelés, miszerint sarjadzó és hasadó élesztőben valamint növényekben az Rpn10 fehérje nem esszenciális, génjének delécioja csak enyhe fenotípust okoz, felvetette egyéb ubikvitin receptorok létezésének lehetőségét.

Egyéb ubikvitin receptorok

Figyelembe véve, hogy az ubikvitinációnak számos folyamatban kulcsfontosságú szerepe van, meglehetősen zavaró volt, hogy hosszú ideig csak néhány, az ubikvitinnel specifikusan kölcsönható fehérjét ismertek. Az elmúlt néhány évben azonban számos újonnan felfedezett ubikvitin-kötő fehérjét írtak le (138, 139, 140) és (6. ábra), az ubikvitin felismeréséért felelős fehérjedoménokat pedig mind strukturális, mind funkcionális szinten jellemezték (148, 149, 150, 151).



6. ábra: A multiubikvitinált szubsztrátoknak a 26S proteaszómához történő szállításában szerepet játszó fehérjék sematikus áttekintése.

J. Miller és C. Gordon, FEBS Letters 579 (2005) 3224-3230

A tisztított 26S proteaszóma erős és specifikus affinitást mutat a multiubikvitin láncok iránt, ám ha alegységeit egyesével vizsgáljuk, csak a már tárgyalt S5a/Rpn10/p54 köti az ubikvitin láncokat. A kölcsönhatásért egy kis domén, az ubikvitinnel kölcsönható motívum (UIM, ubiquitin-interacting motif) a felelős. Ezek a felfedezések amellet szoltak, hogy az S5a alegység a 26S proteaszóma szubsztrát receptora. Ugyanakkor, ha az alegységnek megfelelő géneket deletálták akár sarjadzó akár hasadó élesztőben vagy növényekben, csak enye hiányosságokat eredményezett a fehérjelebontásban. Ezek az eredmények arra utaltak, hogy az S5a/Rpn10/p54 mellett egyéb faktoroknak is részt kell venniük a multiubikvitinláncok felismerésében. Két ilyen faktort is azonosítottak nemrégiben élesztőben, a Rad23 és Dsk2 nevű fehérjéket, melyek mindegyike erősen köti a multiubikvitin láncokat (149, 150, 151, 152, 153). Ezen fehérjék egyike sem alegysége a 26S proteaszómának, csak időlegesen

kapcsolódnak a komplexhez, az úgynevezett ubikvitin-szerű (UBL, ubiquitin-like) doménjük révén, mely úgy tűnik, egy általánosan előforduló proteaszóma kötő modul (152, 153, 154, 155, 156).

A Rad23 a legjobban jellemzett minden UBL domént tartalmazó fehérje közül. Ezt a proteint először a nukleotid kivágódással járó DNS javításban írták le faktorként (157). Részletesebb vizsgálatok kiderült, hogy UBL doménje, amely nélkülözhetetlen a DNS javító funkcióhoz, helyettesíthető az ubikvitin szekvenciájával, ugyanakkor nem eredményezi a Rad23 proteaszóma általi lebontását (158). Felfedezték, hogy a Rad4 multiubikvitinálva kötődik a Rad23-hoz, amely a proteaszómához szállítja lebontásra, így takarítva el a hiba kijavítása után szükségtelenné vált komplexet (159).

Az UBL domén és az ubikvitin között nagyfokú strukturális hasonlóság áll fenn, mely összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy az ubikvitinhez hasonlóan, a Rad23 UBL doménje szintén kölcsönhat az emberi S5a fehérje második UIM doménjével (155). Ennek ellenére több adat is ellentmond annak, miszerint az S5a alegység lenne a proteaszóma általános UBL-domén receptora. Egyrészt, hogy az emberi Rad23-mal kölcsönható második UIM domén nem található meg a sarjadzó és hasadó élesztő S5a ortológokban, másrészt nemrégiben kimutatták, hogy mind a Rad23, mind a Dsk2 a regulátor partikulum alapjának Rpn1 alegységével hat kölcsön élesztőben (160).

Az Rpn10-zel ellentétben a Rad23 és a Dsk2 nem UIM domént tartalmaznak, hanem egy másik domén, az úgynevezett ubikvitin-útvonallal asszociált (UBA= ubiquitin-pathway-associated) domén révén hatnak kölcsön az ubikvitin láncokkal. Számos fehérje, melyek UBA domént tartalmaznak, nagy affinitást mutatnak a multiubikvitin láncok iránt, míg sokkal gyengébb affinitást a szabad monoubikvitin egységek iránt (161).

Mindkét fehérje azon képessége, hogy egyszerre tudnak kötődni a multiubikvitinált szubsztrátokhoz és a proteaszómához, azt jelzi, hogy egy alternatív útvonalat jelenthetnek az S5a/Rpn10/p54 mellett a szubsztrátok proteaszómához történő szállításában. Ezt támasztja alá az a felfedezés is mely szerint sem a Rad23, sem a Dsk2 önmagában nem esszenciális *S. pombe*-ban, de a Rad23, Dsk2, Rpn10 tripla mutáció letális, míg a Rad23, Dsk2 és Rpn10 gének közül bármely kettő delécioja életképes, bár az Rpn10-Rad23 dupla mutánsban felhalmozódnak a multiubikvitinált szubsztrátok. Ezek a megfigyelések is azt támasztották alá, hogy ez a három fehérje együttesen biztosít egy esszenciális szubsztrátfelismerő rendszert

a proteaszóma számára (149). Különböző deléciók és fehérje túltermeltetések segítségével bizonyították az átfedő, multiubikvitin lánc szállító szerepét ezen UBL-UBA és Rpn10 fehérjéknek (104, 153, 162). Végül *in vitro* és *in vivo*, valódi multiubikvitinált szubsztrátokkal történt kísérletek megnyugtatóan tisztázták a legtöbb homályos pontot az UBL-UBA és Rpn10 munkamegosztására vonatkozólag (163, 164).

A proteaszómális multiubikvitin-kötő fehérjék és a nem-proteaszómális UBL-UBA ingázó fehérjék mellett van néhány egyéb fehérje, melyek a multiubikvitinált fehérjék felismerésében és a proteaszómához történő szállításában szerepet játszanak.

Ilyen például a Cdc48 vagy p97 vagy emlősökben vazolint tartalmazó fehérje (VCP= vasolin containing protein), mely egy erősen konzervált hexamer ATP-áz, a számos sejtbeli aktivitással kapcsolatos ATP-áz (AAA= ATPases associated with various cellular activities) családból. Ez a fehérje rendkívül változatos szerepekkel bír, többek között részt vesz a mitotikus orsó felbomlásában, a membrán fúzióban, a DNS szintézisben és DNS hibajavításban, valamint a 26S proteaszóma által irányított fehérjelebontásban is. E változatosság oka, hogy a Cdc48/VCP fehérje, számos kofaktorral képes kapcsolódni, melyek az aktivitását szabályozzák (165).

Az endoplazmatikus retikulumhoz kapcsolódó degradációs útvonalban (ERAD = endoplasmic reticulum associated degradation) a Cdc48 az Ufd1 és Npl4 nevű fehérjékkel kapcsolódik. Ebben a komplexben a Cdc48 felismeri és megköti a hibásan feltekeredett fehérjéket és multiubikvitinációjukkal párhuzamosan az endoplazmatikus retikulumból a citoplazmába szállítja őket, ahol a 26S proteaszóma lebontja ezeket a fehérjéket (166). Ha viszont a Cdc48/VCP az Ubx3/Shp1/p47 kofaktorával kapcsolódik, úgy tűnik, nem vesz részt az ERAD útvonalban. Ehelyett a Cdc48/VCP ebben a komplexben szerepet játszik nem-proteolitikus folyamatban is, mint a membrán fúzióban (167), és a proteaszómális lebontásban is (168, 169).

Az élesztő és az emlős Ubx3/Shp1/p47 fehérjék az N-terminális UBA-doménjükön keresztül kötik az ubikvitinált fehérjéket (167, 168, 169), C-terminálisukon pedig ubikvitin szabályozó X (UBX = ubiquitin regulatory X) domént tartalmaznak, melyen keresztül a Cdc48/VCP fehérjével hatnak kölcsön. Ugyanakkor az Ufd-Npl4 komplex nem tartalmaz sem UBX, sem UBA domént.

Az még nem tisztázott, hogy ezek a Cdc48-kofaktor komplexek *bona fide* szubsztát szállító faktora-e a proteaszómának, vagy esetleg egyéb fehérjék, például az UBL-UBA ingázó fehérjék által alkotott útvonal részei.

A Hsp70 dajkafehérje-család és néhány kofaktora szintén együttműködik az ubikvitin-proteaszóma útvonallal a sérült vagy a rosszul feltekeredett fehérjék lebontásában. A Hsp70 oly módon segíti a fehérjék feltekeredését, hogy hozzákapcsolódik az éppen szintetizálódó polipeptidhez (170). A Hsp70 Bag1 nevű kofaktora egy C-terminális Bcl2-vel kapcsolódó atanogén (BAG = Bcl2-associated athanogene) domént tartalmaz, mely kölcsönhat a Hsp70 chaperonok ATPáz doménjével és ezen kapcsolódás révén előmozdítja a szubsztrát leválását a dajkafehérjéről (171). Ez a kofaktor egy UBL domént tartalmaz az N-terminálisán, mellyel a 26S proteaszómához kapcsolódik (172). Ezért, ha a Hsp70 a Bag1-gyel kapcsolódik, egy olyan komplexet alkot, mely a rosszul feltekert fehérjéket a proteaszómához tudja szállítani lebontásra.

A szekvesztoszóma1 (sequestosome 1)/p62 egy újonnan felfedezett multiubikvitin szállító faktor, mely egyike volt az első UBA-domént tartalmazó fehérjéknek, melyeket kísérletesen jellemeztek (173). A fehérje elsősorban az Alzheimer-kór patogenezisével hozható összefüggésbe (174), az UBA doménjében bekövetkező mutációk pedig Paget-féle csontbetegséget okozhatnak (175). A szekvesztoszóma1/p62 UBA doménje elsősorban a 63-mas lizinen keresztül kapcsolódó ubikvitin láncokkal hat kölcsön specifikusan (174). A szekvesztoszóma1/p62 közvetlenül a proteaszóma S5a/Rpn10/p54-es alegységével hat kölcsön, és deléciós kísérletek azt sugallják, hogy a C-terminálisán elhelyezkedő, az ubikvitinhez szerkezetileg hasonló PB1 doménje felelős ezért a kölcsönhatásért (176). A szekvesztoszóma1/p62 hiánya gátolja a proteaszóma által történő lebontási folyamatokat (174). Ez a felfedezés azt jelzi, hogy a szekvesztoszóma1/p62 egy multiubikvitin kötő fehérje, mely a többi ingázó fehérjéhez hasonlóan részt vesz a szubsztrátok proteaszómához történő szállításában, és hogy a 63-mas lizinen keresztül kapcsolódó láncok, melyeknek korábban csak szabályozó szerepet tulajdonítottak a sejtben, szignálként szolgálhatnak a proteaszóma által irányított fehérjelebontásban.

Zn²⁺- kötő fehérjék és a Zn²⁺ szerepe a sejtben

A cink az élethez nélkülözhetetlen nyomelemek közé tartozik (209, 210). Eukarióta sejtekben a teljes intracelluláris Zn²⁺ koncentráció körülbelül 200 μM (191), ugyanakkor a sejtben belüli szabad Zn²⁺ koncentráció csak nanomoláris nagyságrendű. A cink több mint 300 enzim aktivitásához szükséges, mely cink-függő, úgynevezett metalloenzimek, 6 fő csoportba sorolhatók funkciójuk alapján. A cink a fehérjékben kofaktorként közvetlenül részt vehet a kémiai katalízisben vagy kulcsfontosságú szerkezeti alkotóelemként nélkülözhetetlen a fehérje szerkezetének és stabilitásának fenntartásához (211-13). A fehérjékben megtalálható cink-kötő helyeket leggyakrabban cisztein aminosavak kén-, hisztidin aminosavak nitrogén-, aszparaginsav és glutaminsav oxigénatomjai vagy ezek kombinációi alakítják ki. Minden katalitikus hely esetében a Zn²⁺-ion Lewis savként funkcionál. A cink-függő katalitikus helyek esetében (oxidoreduktázok, transzferázok, hidrolázok és liázok), a Zn²⁺-ion az enzim aktív helyén található, ahol kölcsönhatásba lép a szubsztrát-molekulával (214, 215). A cink-függő kokatalitikus helyek (pl. alkalikus foszfatáz, foszfolipáz C, P1 nukleáz és leucin aminopeptidáz) esetében, két vagy több cink atom helyezkedik el egymás közvetlen közelében, melyek egymással együttműködve felerősítik a katalízist (214, 215). A strukturális cink-kötő helyek esetén pedig, a fémiot négy aminosavdallánc koordinálja, általában tetrahedrális geometria szerint, így az oldat, mint ligand kizáródik a belső térből (213, 216).

A cink alapvető alkotóeleme a cink tartalmú DNS-kötő fehérjéknek. Ezen kívül a cink potenciálisan szabályozni képes a sejt által történő szignálfelismerést, a másodlagos hírvívő molekulák metabolizmusát, és a protein kinázok és fehérje foszfatázok működését (217). Így nem meglepő, hogy a cink homeosztázisban bekövetkező zavarok, számos súlyos károsodáshoz vezethetnek. A cink hiánya többek között gátolja a növekedést, az immunrendszer aktivitását, és különböző agyi funkciókat (211, 218). Másrészt, a felesleges cink is toxikus lehet a sejt számára (219). A toxicitás mechanizmusa még nem teljesen tisztázott, de valószínűleg a Zn²⁺- ionoknak a metalloenzimekhez történő hozzákötődése okozhatja. Ezért kifinomult szabályozó rendszernek kell működnie a cink homeosztázis fenntartásához. Ebben a folyamatban kulcsfontosságú szerepet játszanak különböző membránfehérjék, cink transzporterek. Egy nemrégiben közölt megfigyelés szerint HeLa sejtekben a Zn²⁺ ionofór pirrolidin-ditiokarbamát cink ionokkal történő együttes

alkalmazása gátolja számos kulcsfontosságú proteaszómális szubsztrát, mint például a p53 vagy a p21 proteaszóma függő lebontását (195). Noha a cink tarnszporterekről számos információ áll rendelkezésünkre, még mindig elég távol vagyunk a cink metabolizmust szabályozó molekuláris mechanizmusok megértésétől.

A Zn^{2+} a proteaszóma sokkal általánosabb és sokrétűbb effektorának tűnik, mint azt korábban gondolták. Mint már korábban említettem, az Rpn11/p37B alegység egy metallo-izopeptidáz (JAMM) motívumot tartalmaz, amely egy Zn^{2+} -et képes koordinálni (110). Ez az alegység Zn^{2+} -függő módon katalizálja az ubikvitin lehasadását a szubsztrátokról, mielőtt azok a katalitikus komplexbe táplálódnak, mely két folyamat szorosan kapcsolódik egymással (111, 112). Így a cinknek nélkülözhetetlen szerepe van a multiubikvitinált szubsztrátfehérjék ubikvitin egységeinek lehasításában és egyben a teljes proteolitikus lebontási ciklusban.

Célkitűzések

Az a felfedezés, hogy a Zn^{2+} eltávolítása az Rpn11/p37B izopeptidáz doménjéről nemcsak az Rpn11/p37B deubikvitináló aktivitását rontja el, hanem az egész proteaszómális degradációs ciklust felfüggeszti, azt sugallta, hogy a szubsztrátfehérjék Zn^{2+} eltávolítás hatására bekövetkező stabilizálódásának oka, hogy a 26S proteaszóma bizonyos funkciója(i) az RP alegységek Zn^{2+} koordinálta kölcsönhatásai révén valósul(nak) meg.

A kérdés tisztázására komplex strukturális és funkcionális vizsgálatokat terveztünk annak a megállapítására, hogy a RP alegységei között működnek-e Zn^{2+} -függő kölcsönhatások, és ezen kölcsönhatásoknak milyen szerepe van a proteaszóma működésében. Ehhez egyrészt vizsgálni kívántuk *in vitro* a feleslegben adott Zn^{2+} , illetve a Zn^{2+} elvonásának a *Drosophila* 26S proteaszómára gyakorolt hatását.

Másrészt, célul tűztük ki a p54 fehérje ciklikus változásának *in vivo* tanulmányozását, melynek érdekében a teljes hosszúságú p54 fehérjét, illetve különböző darabjait termelő transzgénikus *Drosophila melanogaster* törzsek létrehozását és vizsgálatát terveztük.

Anyagok és módszerek

1., Biokémiai módszerek

Proteaszóma tisztítás

A 26S proteaszómát *Drosophila* embriókból egy már korábban leírt módszer alapján (182) tisztítottuk homogenitásig. A részlegesen tisztított 26S proteaszóma frakciókat pedig úgy készítettük, hogy a proteaszómát csak a DEAE-fractogel kromatográfiás lépésig tisztítottuk, majd dializáltuk 20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DTT és 5% (v/v) glicerin ellen és – 80 °C – on tároltuk. A Zn²⁺ hozzáadása előtt a DTT-t eltávolítottuk HiTrap Desalting oszlopon (Amersham Biosciences) és ekvilibráltuk 20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP és 5% (v/v) glicerinnel.

Keresztkötés

A homogenitásig vagy részlegesen tisztított 26S proteaszóma frakciókat inkubáltuk 100 µM diszukcinimidil-szuberát (DSS, Pierce) jelenlétében 25 °C – on, 15 percig. A keresztkötési reakciót 20 mM glicin hozzáadásával állítottuk le. A keresztkötési mintázatot immunoblot technikával vizsgáltuk, proteaszóma alegység specifikus monoklonális ellenanyagok segítségével.

Proteaszóma alegység specifikus monoklonális ellenanyagok jellemzése

A 26S proteaszóma alegységeit specifikusan felismerő monoklonális ellenanyagok ismertetése és jellemzése az (182) hivatkozásban olvasható. A dolgozatban bemutatott

kísérletekhez felhasznált ellenanyagok neve és specificitása az I. táblázatban került összefoglalásra.

Gél elektroforézis és immunoblot technika

A denaturáló SDS-poliakrilamid gélelektroforézist (SDS-PAGE) az általánosan elterjedt technikák alapján végeztük. A natív poliakrilamid gélelektroforézist Glickman és munkatársai által leírt módszer szerint hajtottuk végre (183). A gélben és a futtatópufferben bizonyos esetben jelen volt ATP míg más esetekben nem. A natív poliakrilamid géleken elválasztott 26S proteaszómák katalitikus aktivitását fluorigén gél felülrétegzési technikával (fluorigenic gel overlay assay) vizsgáltuk, mely technika szintén a 183-mas hivatkozásban olvasható részletesebben. Más esetekben a natív poliakrilamid gélen elválasztott proteaszómákat immunoblot technikával vizsgáltuk tovább. Ehhez először a gélben disszociáltattuk a proteaszóma alegységeket azáltal, hogy a gélbe beáztattuk 5 percre szobahőmérsékleten (22 °C-on) Western-blotting pufferbe (20mM Tris bázis, 150 mM glicin és 20%, v/v, metanol; a metanol hozzáadása előtt az oldat pH-ját 8,0-ra állítottuk be), melyet 1% SDS-sel egészítettünk ki.

A denaturáló SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel valamint a natív poliakrilamid gélelektroforézissel elválasztott fehérjéket ezután polivinilidén-difluorid (PVDF) membránra vittük át, majd a megfelelő fehérjére specifikus monoklonális vagy poliklonális ellenanyaggal reagáltattuk. Az előhívás felerősített kemilumineszcenciás technikával történt, torma peroxidázzal (horseradish peroxidase, HRP) kapcsolt másodlagos ellenanyag és Supersignal-HRP (Pierce) kemilumineszcenciás szubsztrát segítségével.

Zn²⁺ affinitás kromatográfia

A Zn²⁺ affinitás kromatográfiát Fractogel[®] EMD Chelate (S) oszlopon (Merck) végeztük a gyártó utasításai szerint.

A p54-gyel kölcsönható fehérjék tisztítása és azonosítása

Immunprecipitáció:

Az immunprecipitációt két különböző monoklonális ellenanyag (mAb) keverékével (mAb 170 és mAb 28) végeztük el, melyek a p54 alegység két különböző epitopját ismerik fel. A monoklonális ellenanyagokat Protein G- agarózhoz (Sigma) kapcsoltuk és a gyöngyöket PBS-sel többször mostuk, hogy a nem kötődött IgG-t eltávolítsuk. Az ellenanyaggal töltött gyöngyöket ezután inkubáltuk a keresztkötött fehérjefrakciókkal 4 °C – on kevertetve azokat a gyöngyökkel egész éjszakán keresztül. Ezután ötször mostuk a gyöngyöket PBS-sel majd háromszor 0,05% Tween 20- szal kiegészített PBS-sel annak érdekében, hogy a nem kötődött fehérjéket eltávolítsuk. Az ellenanyaggal töltött gyöngyökhöz kapcsolódott fehérjéket SDS-mintapufferrel eluáltuk és SDS-PAGE- sel választottuk el.

Fehérje azonosítás MALDI-TOF MS módszerrel:

A kolloidális Coomassie Brilliant Blue nevű festékkel megfestett fehérjecsíkokat kivágtuk és mostuk 50%-os (v/v) acetonitril és víz keverékében oldott 25mM NH_4HCO_3 - tal. A diszulfidhidakat DTT-vel redukáltuk (30 perc, 65°C) és jodoacetammiddal alkiláltuk (30 perc, szobahőmérséklet, sötétben). A fehérjék emésztése a gélben történt, oldallánc-védett sertés tripszinnel (Promega) körülbelül 5 órán keresztül. A gélből kivont triptikus emésztési termékek C18 ZipTip (Millipore) oszlopon kerültek elválasztásra. A tömegspektrometriai analízis pozitív-ion, reflektrom módban, Reflex III MALDI-TOF (matrix-assisted laser-desorption ionisation-time-of-flight) tömegspektrométeren (Bruker) történt. Az alkalmazott mátrix 2,5-dihidroxibenzoésav volt. A detektált tömegek az NCBI adatbázisban történő keresésnek lettek alávetve az interneten elérhető programcsomagok pl. a Protein Prospector-ban található MS-Fit program segítségével (<http://prospector.ucsf.edu>).

A *Drosophila* Hsp82 hősokkfehérje cDNS-ének klónozása

A Hsp82 cDNS-ét hősokk-kezelt (37 °C, 20 perc) *Drosophila* embriókból tisztított össz-RNS preparátumból RT-PCR -rel (reverz transzkripcióval kapcsolt polimeráz láncreakció)

felsokszoroztuk és a pFLAG-MAC (Sigma) expressziós vektorba illesztettük. A reverz átírás során a cDNS első szálának szintéziséhez a 'RevertAid first-strand cDNA kit'-et (Fermentas) alkalmaztuk. A PCR reakcióhoz az 5'-ACGAAGCTTATGCCAGAAGAAGCAGAGAC előre mutató és az 5'-GTCGAATTCTTAATCGACCTCCTCCATGT visszafelé irányba mutató primereket használtuk. A PCR terméket a HindIII és EcoRI restriktációs enzimekkel emésztettük meg, és a pFLAG-MAC vektor megfelelő restriktációs enzim felismerőhelyeire illesztettük be. A beillesztett Hsp82 cDNS szekvenciáját DNS szekvenálással ellenőriztük. A Hsp82 fehérjét kifejeztettük és ANTI-FLAG® M2 affinitás mátrixon (Sigma®) tisztítottuk a gyártó utasításainak megfelelően.

Élesztő két-hibrid vizsgálat

A teljes hosszúságú *Drosophila* p54 cDNS-t, annak 5' felét (az 1-616 bázispárig tartó szakasz a belső EcoRI helyig) vagy 3' felét (616-1190 bp) beillesztettük a pBTM116 DNS-kötő domént tartalmazó vektorba, annak LexA DNS-kötő szekvenciájával folyamatos leolvasási keretbe. A pBTM116 plazmid hordozza a *trp1* markergént. A leolvasási keret helyességét DNS szekvencia vizsgálattal bizonyítottuk. A plazmidokat *Saccharomyces cerevisiae* L40-es törzsbe (*trp1*, *leu2*, *his3*, *LYS2::lexAoplacZ*) transzformáltuk, a transzformánsok szelekciója leucinnal és hisztidinnel kiegészített minimál táptalajon történt. A kiválasztott transzformánsok esetében LacZ teszttel megvizsgáltuk, hogy mutatnak-e önaktivációt. Mivel a teljes hosszúságú p54 és annak 3' fele önaktivációt mutatott, a p54 cDNS 5' felét hordozó pBTM116-os vektort használtuk a két-hibrid vizsgálatához. E plazmidot juttattuk be az élesztőbe egy *Drosophila melanogaster* embrionális Matchmaker cDNS aktivációs domén könyvtárral (ClonTech Laboratories) együtt transzformálva a gyártó utasításai szerint. A cDNS könyvtár a pACT2 vektorba volt beépítve, mely hordozza a *leu2* markergént. A kölcsönható fehérjéket kódoló plazmidokat hordozó transzformánsokat hisztidint nem tartalmazó minimál táptalajon szelektáltuk, majd a LexA DNS-kötő doménhez kapcsolt p54 fehérje 5' fele, és a Gal4 aktivációs doménhez fuzionált másik fehérje közötti kölcsönhatás valódiságát LacZ teszttel is megvizsgáltuk. DNS szekvenálással és adatbázis kereséssel azonosítottuk a kiválasztott Gal4 aktivációs doménhez kapcsolt cDNS-t.

In vitro kötési (pull-down) kísérletek

Az Smt3 SUMO- (small ubiquitin-related modifier-1, 1-es kis ubikvitinhez hasonló módosító) aktiváló enzim és a DmUbc9 SUMO konjugáló enzim cDNS-ét a pFLAG-MAC vektorba, a teljes hosszúságú p54 cDNS-ét pedig pET28 vektorba klónoztuk. A konstrukciókban a leolvasási keret helyességét DNS szekvenálással ellenőriztük, majd a vektorok által kódolt fehérjéket *Escherichia coli*-ban termeltettük. ANTI-FLAG[®] M2 affinitás oszlopokat (Sigma[®]) megtöltöttünk FLAG-Smt3 SUMO-aktiváló enzimmel, FLAG-DmUbc9 SUMO-konjugáló enzimmel vagy FLAG-Hsp82 fehérjével, a nem kötődött fehérjéket pedig mosással eltávolítottuk. Az oszlopokra felvittünk 1 ml olyan *E. coli* teljes extraktumot, melyben a teljes hosszúságú p54-et expresszáltattuk. Ezután az oszlopokat erőteljes mosásnak vetettük alá, majd az oszlophoz kötődő fehérjéket FLAG peptiddel eluáltuk. A p54 kötődését immunoblot technikával vizsgáltuk a 170-es monoklonális ellenanyag segítségével. A kontroll kísérletekben olyan ANTI-FLAG[®] M2 affinitás oszlopokat használtunk, melyeket előzőleg nem töltöttünk meg FLAG címkével ellátott fehérjével, ezekre vittük fel a p54-et tartalmazó *E. coli* extraktumokat és a p54 nem specifikus kötődését a fentiekhez hasonló technikával vizsgáltuk.

Strep-Tactin affinitás kromatográfia

A Strep-Tactin affinitás kromatográfiát Strep-Tactin[®] Spin Column-on (IBA) és Strep-Tactin[®] MacroPrep[®] (IBA) töltettel megtöltött oszlopon végeztük a gyártó utasításai alapján, de az eredeti protokollt módosítva. Röviden, a vizsgálni kívánt legyeket, bábokat vagy kifejlett ecetmuslicákat mikroPotter homogenizátorral vagy Dounce homogenizátorral W_a pufferben (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM NaCl; 1 mM ATP; 1mM DTT; 1mM PMSF) feltártuk. A feltárt mintákat 4 °C-on, 12 500 rpm-en, 10 percig centrifugáltuk. A lebegő lipoprotein szennyezés eltávolítása céljából a felülúszókat enyhe centrifugálás mellett steril üvegyapoton megszürtük. Az oszlopot W_a pufferrel ekvibráltuk, majd a felvitt mintát többször cirkuláltattuk. Ezután az oszlopot W_a pufferrel majd W_m pufferrel (100 mM Tris-

HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 mM ATP; 1mM DTT; 1mM PMSF) mostuk, majd az oszlophoz kötődött fehérjéket a Spin Column esetében D-biotin oldattal (100mM Tris-HCl pH 8,0; 150mM NaCl; 2mM D-biotin; 1mM PMSF), a Strep-Tactin[®] MacroPrep[®] kromatográfia esetében desztiobiotin oldattal (100mM Tris-HCl pH 8,0; 150mM NaCl; 2,5 mM desztiobiotin; 1mM PMSF) eluáltuk. Bizonyos esetekben még egy mosási lépést beiktattunk az elúció elé. Ezek az 1M NaCl; 0,1% triton; 0,5 M guanidium-HCl; 4 M NaCl vagy 2 % N-lauril-szarkozil oldattal történő mosások voltak.

Kitin affinitás kromatográfia

A CBD (kitin-kötő domén) - C-terminális p54 fehérjét *E. coli*-ban termeltetettük. 72 µl, a rekombináns fehérjét tartalmazó teljes bakteriális extraktumot kiegészítettünk 500µl, ATP-t nem tartalmazó proteaszóma pufferrel (20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ és 5% (v/v) glicerin), majd a mintát 30 percen keresztül szobahőmérsékleten (25 °C) inkubáltuk 600 µl kitin gyönggyel. A gyöngyöket ezután háromszor 1 ml proteaszóma pufferrel mostuk, hogy a nem kötődött bakteriális fehérjéket eltávolítsuk. Majd a CBD-C-terminális p54 fehérjével töltött gyöngyöket 2 órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten 1 ml *Drosophila* embriókból készült extraktummal, melyet előzőleg 20µl 1 M Tris-HCl (pH 8,0) és 10µl 100 mM ATP keverékével egészítettünk ki. Az inkubációs idő letelte után a gyöngyöket erőteljesen mostuk háromszor 5 percen keresztül 1 ml proteaszóma pufferrel, majd az oszlophoz kötődött fehérjéket 1% SDS tartalmú proteaszóma pufferrel eluáltuk. Az eluált frakciókat immunoblot technikával vizsgáltuk tovább a p54 fehérjére specifikus mAb 170 segítségével, valamint kétdimenziós gélelektroforézisnek vetettük alá. A kontroll kísérletekben olyan kitin affinitás oszlopokat használtunk, melyeket előzőleg nem töltöttünk meg CBD-címkével ellátott fehérjével, ezekre vittük fel a *Drosophila* embriókból készült extraktumokat és az eluált frakciókat a fentiekhez hasonló technikával vizsgáltuk.

Kétdimenziós gélelektroforézis

A Strep-Tactin[®] MacroPrep[®] affinitás kromatográfia vagy a kitin affinitás kromatográfia csúcsfrakcióit összemértük és tovább tisztítottuk 'ReadyPrep[™] 2-D Cleanup Kit' (Bio-Rad) segítségével. A kicsapott fehérjéket feloldottuk a megfelelő pH-jú amfolitokat tartalmazó, erősen kaotrópikus 2-D rehidrációs pufferben (7M urea; 2M thiourea; 4% (w/v) CHAPS; 50mM DTT; 2% (w/v) IPG puffer pH 3-10 vagy pH 3,5-5,0; 0,002% (w/v) brómfenolkék) (Bio-Rad). A mintákat Immobililine[™] DryStrip gélekre (pH 3-10 vagy pH 3-5,6NL/nem lineáris, 13 vagy 18 cm) (Amersham Biosciences) vittük rehidrációs módszerrel. A Multiphor[™] II lapos ágyú elektroforetikus egységet (Pharmacia Biotech) használtuk az első dimenziós izoelektromos fókuszáláshoz (teljes időt tekintve 17 kVh futás) és egy 10%-os vertikális SDS-poliakrilamid gélt a második dimenzióhoz. A kétdimenziós géleken elválasztott fehérjéket ezután immunoblot technikával, valamint ezüstoffestéssel és MALDI-TOF tömegspektrometriával vizsgáltuk tovább.

A transzgénikus *Drosophila* törzsek létrehozásához embriókba injektált konstrukciók létrehozása

A teljes hosszúságú *Drosophila* p54 cDNS-ének és annak 5' felének (az 1-616 bázispárig tartó szakasz a belső EcoRI helyig) vagy 3' felének (616-1190 bp) N-terminálisán Strep-címkével ellátott változatait, a p54 cDNS-e 5' felének N-terminálisán Strep-, C-terminálisán FLAG-címkével ellátott változatát, ezenkívül a p54 cDNS 5' és 3' felének címke nélküli változatát, valamint a teljes hosszúságú p54 cDNS-ének pontmutációt (D11R) hordozó változatának N-terminálisán Strep-taggel rendelkező formáját, pP{UAST} vektorba illesztettük, és ezeket a konstrukciókat használtuk fel a transzgénikus *Drosophila* törzsek létrehozásához.

2., Genetikai módszerek

Az összes keresztezést és az *ecetmuslica* törzsek fenntartását 25 °C-on, standard *Drosophila* táptalajon végeztük. A hősokk által indukálható Gal4 forrást hordozó törzsek esetében a hősokkot 30 °C –on végeztük, amennyiben nincs másképp feltüntetve 3 napon keresztül.

A transzgénikus *Drosophila* responder törzsek létrehozása

A p54 különböző származékait kódoló pP{UAST} vektorok injektálása w^{1118} genotípusú törzsbe történt a fent leírt plazmidok valamelyikével és egy transzpozáz forrás elemet hordozó helper plazmiddal együtt.

Az injektált embriók genotípusa: w^{1118}/w^{1118} vagy w^{1118}/Y ; +/+; +/+

Az inszerció helyének lokalizációjához felhasznált kettős balanszer törzs genotípusa: w^{1118}/w^{1118} ; *If/CyO*; *MKRS/TM6bTbHu* volt.

Jelölések:

{*P*}: valamely p54 konstrukciót tartalmazó P-elem inszerciót hordozó kromoszóma

+: vad típus; mutációt nem hordozó kromoszóma

Recesszív markerek:

w: *white* - fehér szemszín

A balanszer kromoszómák azonosítására szolgáló domináns markerek:

CyO: *CurlyOyster* – felfelé pöndörödő szárny

Hu: *Humeral* — a vad típushoz képest több vállszőr

If: *Irregular faceted* — szabálytalan alakú szem

MKRS: domináns marker, rövid torszőrök

Tb: *Tubby* —kis, tömzsi test

TM6b: *Tb* és *Hu* domináns markereket hordozó balanszer kromoszóma

A keresztezések menete:

1, A kikelő injektált állatokat *white* törzshöz kereszteztük annak érdekében, hogy az utódok között azonosíthassuk a piros szemű transzformánsokat. Ezek genotípusa a P-elem inszerció helyétől függően a következő lehet:

$$\begin{array}{l}
 P_0 \quad w^{1118}/Y; \{P\}/+; +/+ \quad \text{♂} \\
 \quad \quad w^{1118}/Y; +/+; \{P\}/+ \quad \text{♂} \\
 \quad \quad w^{1118}\{P\}/Y; +/+; +/+ \quad \text{♂} \\
 \quad \quad w^{1118}\{P\}/w^{1118}; +/+; +/+ \quad \text{♀} \\
 \quad \quad w^{1118}/w^{1118}; \{P\}/+; +/+ \quad \text{♀} \\
 \quad \quad w^{1118}/w^{1118}; +/+; \{P\}/+ \quad \text{♀}
 \end{array}
 \left. \begin{array}{l} \\ \\ \\ \\ \\ \\ \end{array} \right\} \times \begin{array}{l} w^{1118}/w^{1118}; +/+; +/+ \quad \text{♀} \\ \\ \\ \\ \\ \\ \end{array}$$

2, A piros szemű transzformánsokat egyenként kettős balanszer kromoszómákat tartalmazó törzshöz kereszteztük annak érdekében, hogy megállapíthassuk, melyik kromoszómára történt a P-elem beépülése.

$$\begin{array}{l}
 F_1 \quad w^{1118}/Y; \{P\}/+; +/+ \quad \text{♂} \\
 \quad \quad w^{1118}/Y; +/+; \{P\}/+ \quad \text{♂} \\
 \quad \quad w^{1118}\{P\}/w^{1118}; +/+; +/+ \quad \text{♂} \\
 \quad \quad w^{1118}\{P\}/w^{1118}; +/+; +/+ \quad \text{♀} \\
 \quad \quad w^{1118}/w^{1118}; \{P\}/+; +/+ \quad \text{♀} \\
 \quad \quad w^{1118}/w^{1118}; +/+; \{P\}/+ \quad \text{♀}
 \end{array}
 \left. \begin{array}{l} \\ \\ \\ \\ \\ \\ \end{array} \right\} \times \begin{array}{l} w^{1118}/w^{1118}; If/CyO; MKRS/TM6b \quad \text{♀} \\ \\ \\ \\ \\ \\ \end{array}$$

3, Az egyik 2. és 3. kromoszómáján is jól követhető domináns markerrel jelölt balanszer kromoszómákat hordozó, piros szemű hím állatokat újra kettős balanszer törzshöz kereszteztük.

X kromoszómára történt beépülés esetén:

F₂ $w^{1118}\{P\}/Y; +/CyO; +/TM6b$ ♂

A II kromoszómára történő beépülés esetén:

F₂ $w^{1118}/Y; \{P\}/CyO; +/TM6b$ ♂

A III kromoszómára történő beépülés esetén:

F₂ $w^{1118}/Y; +/CyO; \{P\}/TM6b$ ♂

} × $w^{1118}/w^{1118}; If/CyO; MKRS/TM6b$ ♀

A piros szemszínnek a domináns markerektől történő szegregációja alapján lokalizáltuk a P-elem inszerciókat.

4, A kromoszómális térképezést követően, a megfelelő balanszer kromoszómákat hordozó transzgénikus vonalakból törzseket hoztunk létre. A törzsalapítás során csak a homozigóta életképes inszerciókat tartottuk meg.

X kromoszómára történő beépülés esetén:

F₃ $w^{1118}\{P\}/w^{1118}; If/CyO; MKRS/TM6b$ ♀ × $w^{1118}\{P\}/Y; If/CyO; MKRS/TM6b$ ♂

↓

$w^{1118}\{P\}/w^{1118}\{P\}$ vagy $w^{1118}\{P\}/Y; If/CyO; MKRS/TM6b$ → törzsalapítás

Második kromoszómára történő beépülés esetén:

F₃ $w^{1118}/w^{1118}; \{P\}/CyO; MKRS/TM6b$ ♀ × $w^{1118}/Y; \{P\}/CyO; MKRS/TM6b$ ♂

↓

w^{1118}/w^{1118} vagy $w^{1118}w/Y; \{P\}/CyO; MKRS/TM6b$ → törzsalapítás

Harmadik kromoszómára történő beépülés esetén:

F₃ $w^{1118}/w^{1118}; If/CyO; \{P\}/TM6b$ ♀ × $w^{1118}/Y; If/CyO; \{P\}/TM6b$ ♂

↓

w^{1118}/w^{1118} vagy $w^{1118}/Y; If/CyO; \{P\}/TM6b$ → törzsalapítás

A transzgén indukciója

A fent leírt módon előállított transzgénikus légytörzsekbe bevitt transzgén, a responder indukciója különböző, a Gal4 fehérjét szövet- és/vagy fejlődésspecifikus módon expresszáló driver törzsekhez történő kersztezés révén valósult meg.

A felhasznált driver törzsek:

daughterless-Gal4: III kromoszómás	}	általánosan kifejeződő driverek
actin 5C-Gal4: II kromoszómás		
t76-Gal4 (tubulin)/CyO: II kromoszómás		
eyeless-Gal4; UAS-GFP: II kromoszómás	}	a szemben kifejeződő driverek
sevenless-Gal4: II és III kromoszómás változat is van		
GMR-Gal4: II kromoszómás		
engrailed-Gal4; UAS-GFP: II kromoszómás, a szárnydiszkusz abdominális felén fejeződik ki		
C155-Gal4: X kromoszómás, idegrendszerben kifejeződő driver		
byn-Gal4/TM3: III kromoszómás, utóbélben kifejeződő driver		

Hősokkolható transzgénikus törzsek létrehozása

A hősokkolható transzgénikus törzsek létrehozása háromféle módon történt, de helyhiány miatt csak a leginkább célravezető módszert ismertetem.

A keresztezésekhez felhasznált Gal4 represszort termelő törzs genotípusa: *w; tub-Gal80^{ts70} (R/R); TM2/TM6b* volt.

A hőindukálható daughterless-Gal4 drivert hordozó törzs genotípusa: *w; R/R; da-Gal4/da-Gal4* volt.

Jelölések:

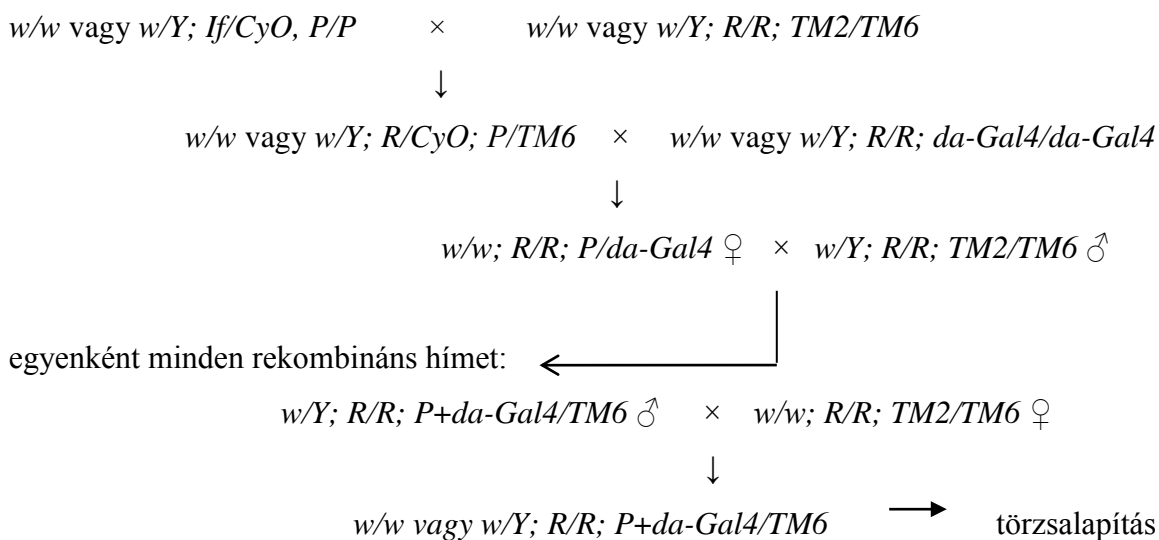
R= *tub-Gal80^{ts70}*: a Gal 80 represszorfehérjét kódoló P elemet hordozó kromoszóma

P: a transzgénünket kódoló P-elemet hordozó kromoszóma

TM2: domináns markert hordozó harmadik kromoszomális balanszer

da-Gal4: daughterless-Gal4-et kódoló P elemet hordozó kromoszóma

Keresztezések menete:



A hősokk változó időtartamon keresztül (1-6-nap), de minden esetben 30 °C-on történt.

Eredmények

A feleslegben adott Zn^{2+} a 26S proteaszóma szétszerelődését és az ubikvitin receptor (p54 alegység) disszociációját eredményezi

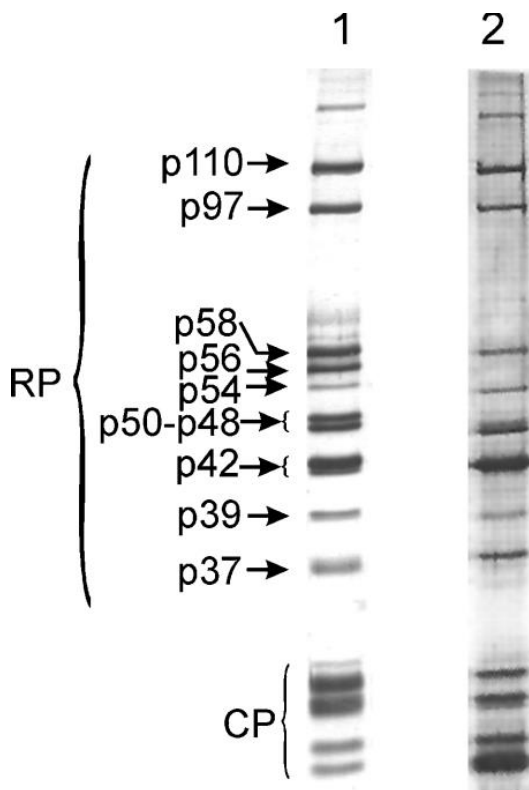
A felfedezés (111), miszerint a Zn^{2+} eltávolítása az élesztő proteaszóma Rpn11 nevű fedő alegységének Zn^{2+} - izopeptidáz doménjéről nemcsak az Rpn11 deubikvitináló aktivitását rontja el, hanem az egész proteaszómális degradációs ciklust felfüggeszti, azt sugallta, hogy a 26S proteaszóma bizonyos funkciója (funkciói) esetleg Zn^{2+} -koordinálta RP alegység kölcsönhatások révén valósul(nak) meg. Ezen kölcsönhatások vizsgálatára az a technika tűnt a legmegfelelőbbnek, hogy a Zn^{2+} -ionokat specifikus fém-kelát képző szerekkel eltávolítsuk az őket koordináló fehérje oldalláncokról. A feltételezett Zn^{2+} -függő RP alegység kölcsönhatásokat bifunkcionális keresztkötőszerekkel történő kémiai keresztkötéssel szándékoztunk nyomon követni, mivel erről a technikáról már korábban bebizonyosodott, hogy nagyon érzékeny módszer, mely jól használható a 26S proteaszóma ATP-függő összeépülési és szétválási ciklusa során bekövetkező RP alegység-kölcsönhatások vizsgálatára (182).

A 26S proteaszóma teljesen vagy részlegesen tisztított DEAE-fractogel frakcióit inkubáltuk növekvő koncentrációban 1,10-fenantrolinnal, majd keresztkötöttük diszukcinimidil-szuberáttal. A fehérjéket elválasztottuk SDS-poliakrilamid gélen, és a különböző RP alegységek keresztkötési mintázatát immunoblot technikával vizsgáltuk, alegység-specifikus monoklonális ellenanyagok (mAb) segítségével. Az 1,10-fenantrolinnal történő inkubáció 0-2 mM koncentráció tartományban nem okozott észrevehető változást a RP alegységek keresztkötési mintázatában, ami azt jelenti, hogy a kritikus Zn^{2+} vagy nagyon erősen kötődik a RP alegységekhez, vagy eltávolítása nem befolyásol a alegység kölcsönhatásokat.

Ugyanakkor létezik egy másik módszer, mellyel a feltételezett Zn^{2+} -függő alegység kölcsönhatásokat befolyásolni lehet. A feleslegben adott Zn^{2+} erősen gátolja számos Zn^{2+} -függő proteáz katalitikus aktivitását azáltal, hogy másodlagos Zn^{2+} -kötő helyekhez kötődik, és kölcsönhatásba lép a katalitikus Zn^{2+} -ionnal (184-186). A RP szorosan egymáshoz

kapcsolódó alegységekből álló szerkezete valószínűsíti, hogy ilyen jellegű kölcsönhatások kialakulhatnak különböző alegységei között. Ahhoz, hogy ezt a fajta megközelítést kihasználhassuk, először is be kellett bizonyítanunk, hogy a p37B alegységen kívül vannak más RP alegységek is, melyek Zn^{2+} - kötő helyet tartalmaznak. Ennek meghatározására, tisztított 26S proteaszóma frakció alegységeit szétválasztottuk egymástól 6 M guanidin-hidroklorid segítségével, és egy Zn^{2+} - kel töltött fém-kelát affinitás oszlopra vittük, melyet előzőleg PBS-ben oldott 6 M guanidin-hidrokloriddal ekvibráltunk. A nem kötődött fehérjéket 6 M guanidin-hidrokloriddal történő mosással távolítottuk el az oszlopról. Ezután az oszlopot folyamatosan csökkenő guanidin-hidroklorid grádienssel (6-0 M, PBS-ben) mostuk, hogy lehetővé tegyük a Zn^{2+} - kötött proteaszómális alegységek oszlopon történő renaturációját, végül imidazol grádienssel eluáltuk azokat. Azt találtuk, hogy számos RP és CP alegység kötődött a fém-kelát oszlophoz, melyek mindegyike 0,2 M imidazol koncentráció körül eluálódott, ami erős Zn^{2+} - kötő hely jelenlétére utal ezen proteaszómális alegységek esetében (8. ábra).

A Zn^{2+} - oszlophoz kötődő RP alegységek közül a p110-et, a p97-et, a p58-at és a p54-et molekulatömegeik alapján azonosítottuk, mivel ezekben a sávokban csak egy polipeptid van jelen (182). Az alegység-specifikus ellenanyagokkal (182) végzett immunoblottokkal kimutattuk, hogy a 48, 42 és 39 kDa-os sávok esetében, melyek számos különböző alegységet tartalmaznak, a p48A, p48B, p42A, p42C és a p39A alegység kötődött a Zn^{2+} - oszlophoz. A proteaszóma alegységek a Zn^{2+} -mentes fém-kelát fractogel oszlophoz nem kötődtek.

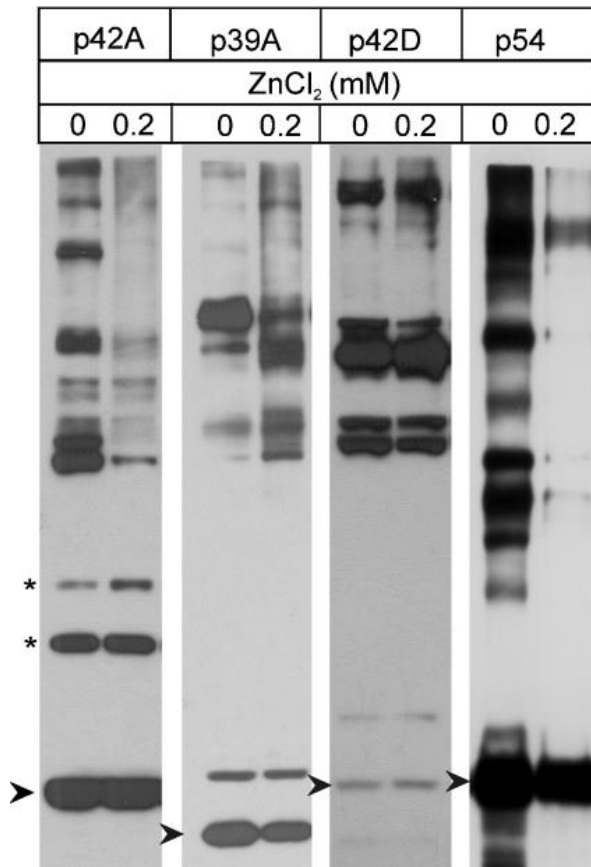


8. ábra: Zn²⁺-kötő proteaszóma alegységek.

1-es zseb: A tisztított *Drosophila* 26S proteaszóma ezüst festett, egy dimenziós SDS-PAGE mintázata

2-es zseb: A Zn²⁺-kel töltött fém-kelát képző fractogel oszlopról 0,2 M imidazzal eluált proteaszómális alegységek

Annak céljából, hogy teszteljük az exogén Zn²⁺-nek a RP alegység-kapcsolataira gyakorolt hatását, egy tisztított 26S proteaszóma preparátumból eltávolítottuk a DTT-t, - mivel a DTT Zn²⁺ hozzáadására kicsapódik az oldatból - majd 25 °C-on, 20 percig inkubáltuk növekvő koncentrációban (0- 200 µM) adott ZnCl₂ – dal. Mivel a 26S proteaszóma ATP hiányában RP-ra és CP-ra válik szét, ezért ahhoz, hogy megőrizzük a 26S proteaszóma szerkezeti egységét, minden reakciót 1 mM ATP és ATP-regeneráló rendszer jelenlétében hajtottunk végre. Az inkubációs idő letelte után a RP-alegységeket keresztkötöttük diszukcinimidil-szuberát hozzáadásával. A keresztkötési reakciót 25 °C-on, 20 percig végeztük, majd feleslegben adott glicin hozzáadásával állítottuk le. A RP alegységek keresztkötési mintázatát különböző RP alegységekre specifikus monoklonális ellenanyagok (mAb) segítségével, immunoblot technikával vizsgáltuk (9. ábra).



9. ábra: Kémiai keresztkötéssel és immunoblot technikával detektált Zn²⁺- indukálta változások a proteaszómális alegység-kölcsönhatásokban.

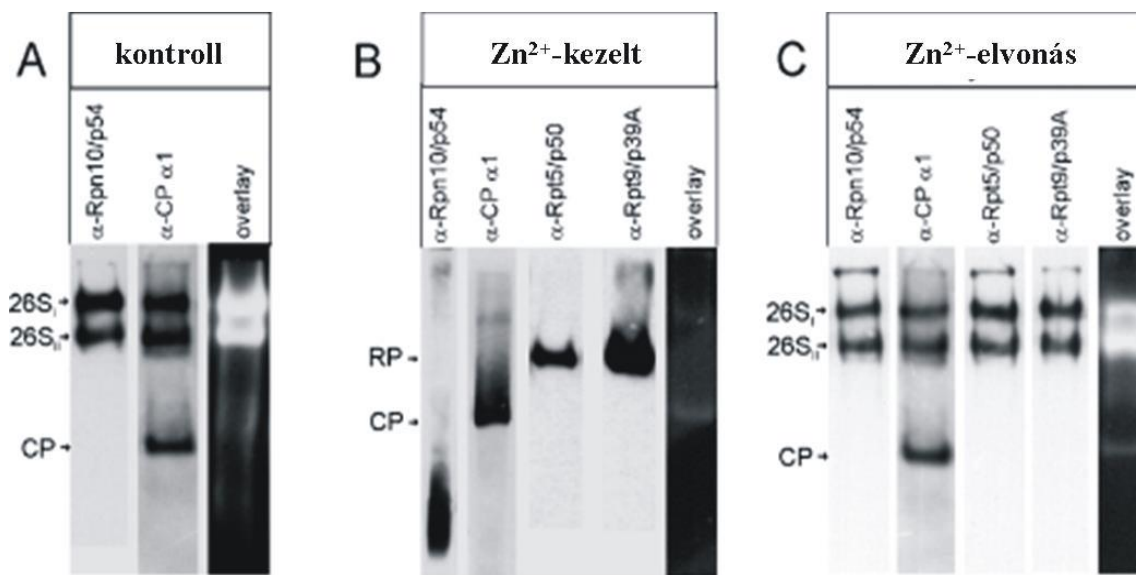
Tisztított *Drosophila* 26S proteaszómát inkubáltunk ATP jelenlétében 200 μM ZnCl₂-dal vagy a nélkül és keresztköttük diszukcinimidil-szuberáttal. A keresztkötési mintázatokat, melyek alegység kölcsönhatásokat reprezentálnak, immunoblot technikával vizsgáltuk, a p42A és a p39A fedő alkomplesz alegységek, a p50 ATP-áz alegység és a p54 ubikvitin receptor alegységre specifikus monoklonális ellenanyagok segítségével. Csillaggal jelöltük azokat az alegység kölcsönhatásokat, melyeket nem befolyásolt a Zn²⁺- kezelés, nyílhegyekkel pedig a nem keresztköttött alegységeket.

Ahogy az a 9. ábra is mutatja, a feleslegben adott Zn²⁺ jellegzetes átrendeződéseket idézett elő a fedél alkomplesz alegység-kölcsönhatásaiban. Míg bizonyos alegységkölcsönhatások fennmaradtak (a 9. ábrán * -gal jelölve), mások eltűntek, vagy új kapcsolatok alakultak ki. Az ATP-áz gyűrű alegységeinek kölcsönhatásai nem változtak meg, míg a p54 ubikvitin receptor

alegység natív proteaszómára jellemző összes kapcsolata megszűnt. Az átrendeződések Zn^{2+} -koncentráció függőek voltak. A változások már $50 \mu M$ Zn^{2+} -koncentrációnál megfigyelhetőek voltak, $200 \mu M$ -nál pedig egy plateau-t értek el.

A 9. ábrán bemutatott eredmények azt sugallták, hogy kívülről hozzáadott Zn^{2+} jelenlétében a p54 alegység kilép a RP-ből, mivel a Zn^{2+} hozzáadását követően megszűnt az összes kapcsolata egyéb RP alegységekkel. Ezt a feltételezést részlegesen tisztított 26S proteaszóma frakciókon vizsgáltuk meg. A 26S proteaszóma DTT-mentes DEAE- fractogel frakcióját inkubáltuk 20 percig, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ -on, 1 mM ATP és ATP regeneráló rendszer jelenlétében $200 \mu M$ $ZnCl_2$ -dal vagy a nélkül, majd ATP tartalmú, $200 \mu M$ $ZnCl_2$ -dal vagy a nélkül készült natív poliakrilamid gélen elválasztottuk. A kontroll minta immunoblot technikával végzett vizsgálata a p54 (10A ábra, 1. zseb) és az $\alpha 1$ CP alegység (10A ábra, 2. zseb) elleni monoklonális ellenanyagok segítségével a jól ismert natív poliakrilamid gél mintázatot adta. A $26S_I$ és $26S_{II}$ sávok, melyek az egy, illetve két RP-mal ellátott 26S proteaszómáknak felelnek meg, mind a RP alegységekre, mind a CP alegységre specifikus monoklonális ellenanyaggal reagáltak, míg a preparátumban jelenlévő szabad CP, mely sokkal gyorsabb elektroforetikus mobilitással rendelkezik, csak a CP alegység elleni monoklonális ellenanyaggal reagált. Mind a két 26S proteaszóma sáv erős peptidáz aktivitást mutatott a fluorigén gél felülrétegzési kísérlet során, míg a szabad CP peptidáz aktivitása, korábban közölt adatoknak megfelelően (183) elhanyagolható volt, mivel RP kapcsolódása aktiválja a CP katalitikus aktivitását a (10A ábra, 3. zseb).

Az előzőektől teljesen eltérő képet kaptunk 200 μM Zn^{2+} jelenlétében (10B ábra). A 26S proteaszóma 26S_I és 26S_{II} formáit nem tudtuk megfigyelni. A p39A fedél alegységre specifikus, és a p50 ATP-áz alegységre specifikus monoklonális ellenanyagok megegyező elektroforetikus mobilitással rendelkező sávval reagáltak, mely a szabad RP- nak felel meg, mivel ugyanez a sáv nem reagált a CP-specifikus monoklonális ellenanyaggal. A CP teljes mennyisége a szabad RP-nál nagyobb elektroforetikus mobilitással rendelkező, szintén szabad részecske formájában volt jelen. Ahogyan azt a keresztköési mintázatából is látni lehetett, az összes p54 alegység kivált a RP-ból és a gél frontjában jelent meg. A fluorogén gél felülrétegzési technika Zn^{2+} jelenlétében a peptidáz aktivitás elvesztését mutatta (10B ábra, 5. zseb). A peptidáz aktivitás elvesztése nem a CP katalitikus inaktiválódásának, hanem a RP leválásának a következménye volt. Ismert ugyanis, hogy a RP kapcsolódása aktiválja a CP katalitikus aktivitását, illetve ennek hiányában enyhe detergens kezeléssel, mely felnyitja a CP központi csatornáját és kitekeri a szubsztrátfehérjéket szintén aktiválható a 20S proteaszóma peptidáz aktivitása. A cink-kezelt proteaszómák peptidáz aktivitását nyolcszorosára fel lehet erősíteni 0,02% SDS jelenlétében, mely növekedés összemérhető a tisztított CP katalitikus aktivitásának 0,02% SDS jelenlétében megfigyelhető növekedésével (183).



10. ábra: A 26S proteaszóma Zn^{2+} - által indukált szerkezeti és funkcionális változásai natív poliakrilamid gélelektroforézissel vizsgálva.

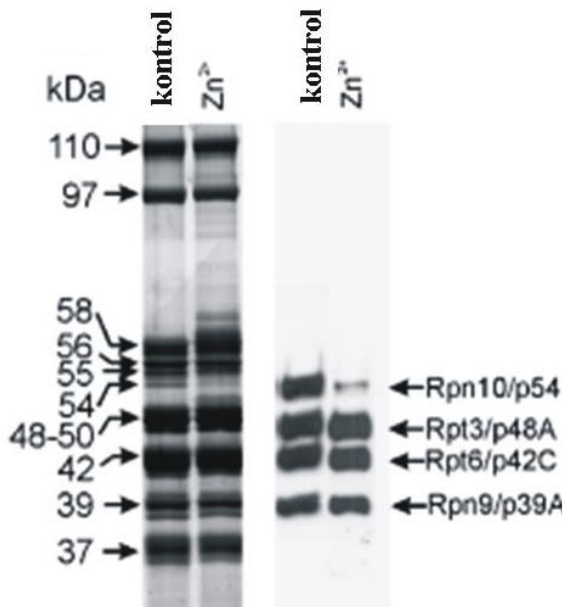
(A) A *Drosophila* 26S proteaszóma DEAE-fractogel frakcióját elválasztottuk 1 mM ATP-tartalmú natív poliakrilamid gélen, és immunoblot technikával vizsgáltuk, a p54 alegységre (első zseb) és az $\alpha 1$ CP alegységre specifikus (második zseb) mAb-kal, valamint teszteltük a peptidáz aktivitását fluorigén gél felülrétegzési (overlay) technikával (harmadik zseb).

(B) A *Drosophila* 26S proteaszóma DEAE-fractogel frakcióját ATP jelenlétében inkubáltuk 200 μM $ZnCl_2$ - dal és elválasztottuk 1 mM ATP és 200 μM $ZnCl_2$ tartalmú natív poliakrilamid gélen. Az immunoblot analízist a következő ellenanyagok segítségével végeztük: p54 alegység elleni (első zseb), $\alpha 1$ CP alegység elleni (második zseb), p50 ATP-áz alegység elleni (harmadik zseb), p39A fedél alegység elleni (negyedik zseb) mAb. A Zn^{2+} -kezelt proteaszómák peptidáz aktivitását a fluorigén gél felülrétegzési technikával vizsgáltuk (ötödik zseb).

(C) A Zn^{2+} - indukálta változások reverzibilitása: a Zn^{2+} elvonása a (B) pontban bemutatott Zn^{2+} - kezelt proteaszómáktól 1,10-fenantrolinnal történt, és hatását 1 mM ATP tartalmú natív gélen vizsgáltuk. Az immunoblot analízist és a fluorigén gél felülrétegzési technikát a (B) pontban leírtak alapján végeztük.

Tehát feleslegben adott Zn^{2+} hatására a 26S proteaszóma RP-ra és CP-ra disszociál, mellyel párhuzamosan az ubikvitin receptor alegység teljes mennyisége kilép a RP-ból. A RP a disszociációt követően egyben marad, nem esik szét bázis és fedél alkomplexumokra, mivel a cink kezelést követően mind az alap, mind a fedél alegységekre specifikus monoklonális ellenanyagok a szabad RP-nak megfelelő mobilitással rendelkező fehérjesávval reagálnak.

Ezeket a szerkezeti változásokat a peptidáz aktivitás teljes elvesztése kíséri. A 9. ábrán bemutatott keresztüköti kísérletek pedig azt mutatták, hogy a RP ATP-áz gyűrűje érintetlen marad a folyamat során, de lényeges alegység átrendeződések történnek a fedélalkomplexumban.



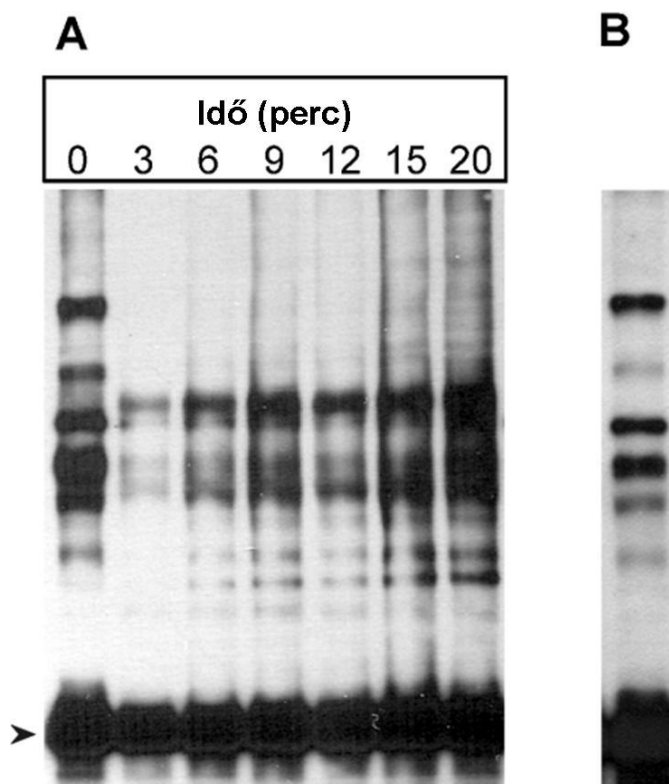
11. ábra: A RP integritása cink-kezelést követően.

Egy kontroll és egy Zn²⁺- kezelt DEAE- fractogel frakció RP-ait Superose 6 gélszűrő oszlopon elválasztottuk, és alegység-összetételüket vizsgáltuk ezüstfestett denaturáló gélen (első és második zseb) és immunoblot technikával a jobb oldalon jelölt alegységekre specifikus monoklonális ellenanyagokkal.

Azért, hogy bebizonyítsuk, hogy a p54 az egyetlen alegység, mely Zn²⁺ jelenlétében kiválik a RP-ből egy cink-kezelt DEAE-fractogel frakció RP-át elválasztottuk egy Superose 6 elnevezésű, méret szerinti elválasztást eredményező oszlopon, egy korábban leírt módszer szerint (67), és meghatároztuk az alegység-összetételét ezüsttel festett SDS-gélen és immunoblot technikával. Ahogyan az a 11. ábrán is látható, a p54 alegység hiányától eltekintve, a kontroll és a cink-kezelt RP alegység-összetétele megkülönböztethetetlen.

A 26S proteaszóma Zn²⁺-indukált strukturális és funkcionális változásai reverzibilisek

A 26S proteaszóma Zn²⁺- indukálta változásainak reverzibilitását egy DTT-mentes tisztított 26S proteaszóma frakción vizsgáltuk. A mintát először 20 percig inkubáltuk 1 mM ATP, ATP regeneráló rendszer és 200 µM ZnCl₂ jelenlétében, majd 200 µM 1,10-fenantrolint adtunk a proteaszómákhoz és az inkubációt további 20 percig folytattuk. A Zn²⁺- indukálta strukturális változások reverzibilitását natív poliakrilamid géleken és keresztkötési technikával vizsgáltuk. A Zn²⁺ - ionok eltávolítása után semmiféle észrevehető változást nem tapasztaltunk a Zn²⁺- kezelt proteaszómák esetében kapott képhez viszonyítva. Ezért arra gondoltunk, hogy a p54 alegységnek a proteaszómába történő visszaépüléséhez és a 26S proteaszóma újra összeszerelődéséhez szükség lehet bizonyos nem proteaszómális faktorokra, melyek ezt a folyamatot elősegítik, és amelyek nem találhatóak meg a tisztított proteaszóma frakcióban. Ezért a Zn²⁺- hatás reverzibilitását a továbbiakban részlegesen tisztított 26S proteaszóma frakciókon vizsgáltuk.



12. ábra: A p54 kölcsönható fehérjék detektálása.

(A) A *Drosophila* 26S proteaszóma DTT-mentes DEAE-fractogel frakcióját ATP jelenlétében inkubáltuk 200 μM ZnCl_2 -dal a jelzett időtartamokig. Az inkubációt követően a frakciókat keresztköttük diszuccinimidil szuberáttal. A p54- kölcsönható fehérjéket immunoblot technikával azonosítottuk a p54 alegységre specifikus mAb segítségével.

(B) Az (A) pontban leírt, 200 μM ZnCl_2 -dal 20 percen keresztül inkubált DEAE- fractogel mintát további 10 percre inkubáltuk 200 μM 1,10-fenantrolinnal, majd keresztköttük és analizáltuk az (A) pontban leírtak szerint. A nyílhegy a nem keresztköttött p54 fehérjét jelzi.

Egy DTT- mentes DEAE- fractogel frakciót 1 mM ATP és ATP regeneráló rendszer jelenlétében inkubáltunk 200 μM ZnCl_2 jelenlétében, 25 °C-on, egyre növekvő időintervallumokig, majd a p54 fehérje kapcsolódását a feltételezett nem proteaszómális, az összeépülést segítő faktor(ok)kal keresztköttési technikával vizsgáltuk, a p54 alegységre specifikus mAb 170 segítségével (12. ábra).

Amint az a 11. (A) ábrán megfigyelhető, a p54 alegység Zn^{2+} hatására történő kilépése a proteaszómából igen gyors: már 3 perc inkubáció elégségesnek bizonyult ahhoz, hogy a p54

fehérjének a natív RP-ra jellemző összes alegység-kölcsönhatását megszüntesse. Ezen kívül az inkubáció során egy teljesen új keresztkötési mintázat alakult ki. Ez az újonnan megjelent mintázat azt jelzi, hogy a p54 fehérje specifikus kölcsönhatásokat alakított ki celluláris fehérjékkel, mely kölcsönhatások nem tudnak kialakulni a teljes mértékben tisztított 26S proteaszóma preparátumban (lásd. 9. ábra). Ezután megvizsgáltuk natív gél-elektroforézissel és keresztkötési technikával a p54 fehérje új, a cink-kezelés hatására kialakított, specifikus fehérje-fehérje kölcsönhatásainak szerepét a Zn^{2+} -indukálta szerkezeti változások visszafordíthatóságában. Egy DTT-mentes DEAE-fractogel frakciót inkubáltunk 1 mM ATP és ATP regeneráló rendszer jelenlétében 200 μ M $ZnCl_2$ -dal, 20 percig, 25 °C-on. Ezután a Zn^{2+} -ionokat 200 μ M 1,10-fenantrolin hozzáadásával eltávolítottuk, majd a mintát keresztkötöttük diszukcinimidil-szuberáttal. Húsz perc keresztkötési reakció után immunoblot technikával vizsgáltuk meg a Zn^{2+} - indukálta változások reverzibilitását a p54 alegységre specifikus mAb segítségével. Cink-eltávolítás hatására az összes Zn^{2+} -specifikus keresztkötési termék eltűnt, és a natív 26S proteaszómára jellemző összes fő keresztkötési termék visszaalakult (12B ábra).

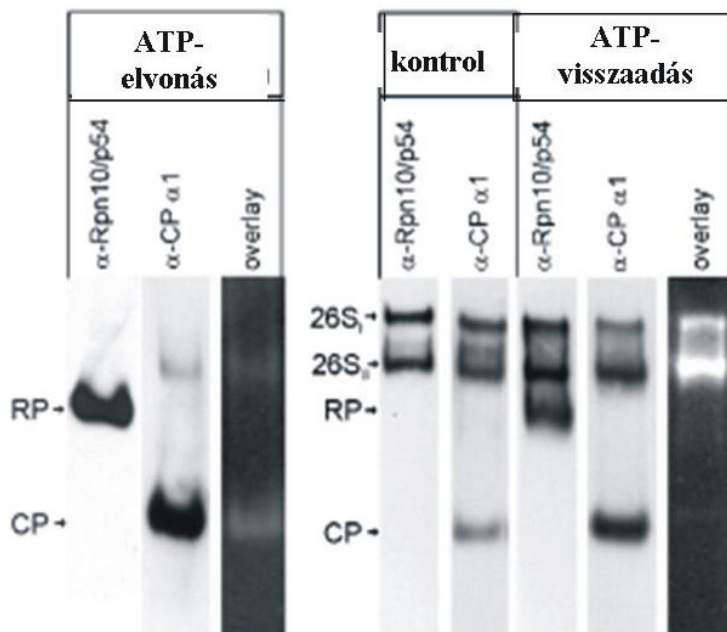
A natív poliakrilamid gélelektroforézis kimutatta, hogy Zn^{2+} - elvonás hatására a 26S proteaszóma mindkét elektroforetikus variánsa visszaalakult (10C ábra). A p54 alegység visszaépült az újra összeszerelődött 26S proteaszómába, mivel a p54 fehérje megoszlása a 26S proteaszóma variánsok között megegyezett a p50 ATP-áz és a p39A fedél alegységekével (10C ábra, 1., 3. és 4. zseb) és szabad p54 monomert nem lehetett megfigyelni. A natív 26S proteaszóma szerkezetének visszaalakulásával párhuzamosan a Zn^{2+} -kezelt 26S proteaszómák peptidáz aktivitásukat is visszanyerték a Zn^{2+} eltávolítását követően, tehát a funkcionális renaturáció is megtörtént. A flourigén peptid gél felülrétegzési kísérlet ugyanis kimutatta, hogy míg a peptidáz aktivitás teljes elvesztése figyelhető meg 200 μ M Zn^{2+} jelenlétében (10B ábra, 5. zseb), addig Zn^{2+} - elvonás hatására a peptidáz aktivitás visszaállt (10C ábra, 5. zseb).

A hisztidin és cisztein aminosav oldalláncok, melyek a cink – koordinációért felelősek, számos más bivalens kationt képesek megkötni. Ez megfigyelhető a proteaszómális alegységek esetében is: ugyanazok az alegységek, melyek a cink oszlophoz kötődnek (8. ábra), kötődnek például nikkellal oszlophoz is. A cink hatása a 26S proteaszóma szerkezetére és működésére ennek ellenére nagyon specifikus. 50- 200 μ M koncentráció tartományban a

Ca^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} és Mn^{2+} ionok egyike sem váltja ki a 26S proteaszóma szétszerelődését és az ubikvitin receptor alegység disszociációját, sem a 26S proteaszóma peptidáz aktivitásának elvesztését.

A 26S proteaszóma összeszerelődés-szétszerelődési ciklusának kétféle útvonala

Már régóta ismert, hogy az ATP nélkülözhetetlen a 26S proteaszóma szerkezeti egységének fenntartásához. ATP hiányában a 26S proteaszóma szétválik RP-ra és CP-ra (187). Részlegesen tisztított preparátumokban ez a folyamat visszafordítható: ha az ATP-t visszaadjuk a rendszerbe, a 26S proteaszómák újra összeszerelődnek (67). Noha a 26S proteaszóma ATP hiányában disszociál RP-ra és CP-ra, a p54 alegység nem lép ki a RP-ból (13. ábra, 1. és 2. zseb). A 26S proteaszóma szétválását ebben az esetben is a peptidáz aktivitás elvesztése követi (13. ábra, 3. zseb). A 26S proteaszóma disszociációját részben vissza lehet fordítani, ha az ATP- és DTT- mentesített proteaszómákat ATP és ATP regeneráló rendszer jelenlétében inkubáljuk, majd ATP tartalmú natív gélen elválasztjuk (13. ábra, 4.-8. zseb). A DTT visszaadása nem javította tovább az újra összeszerelődés hatékonyságát. Így a 26S proteaszóma ATP-függő összeszerelődés- szétválási ciklusa teljesen eltér a Zn^{2+} hozzáadás-elvonás hatására bekövetkező ciklustól. Az ATP-függő ciklus során ugyanis a p54 alegység folyamatosan RP-kötött állapotban van, míg a Zn^{2+} - ciklus során egy reverzibilis ingázó folyamaton megy át.



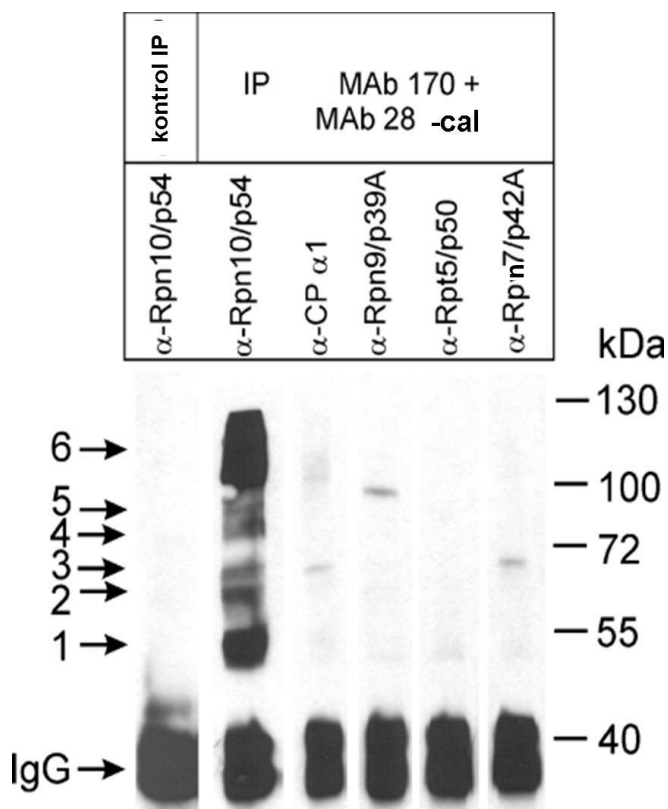
13. ábra: A 26S proteaszóma újra összeszerelődése ATP elvonás után.

Első három zseb: a *Drosophila* 26S proteaszóma DEAE-fractogel frakcióját ATP elvonás után elválasztottuk ATP nélkül készült natív poliakrilamid gélen. Az immunoblot analízist a p54 alegységre (első zseb) és az $\alpha 1$ CP alegységre specifikus mAb-vel (második zseb) végeztük, a peptidáz aktivitás vizsgálatát pedig a fluorigén gél felülrétegzési (overlay) technikával (harmadik zseb). Negyedik és ötödik zseb: a *Drosophila* 26S proteaszóma DEAE-fractogel frakcióját 1 mM ATP tartalmú natív poliakrilamid gélen elválasztottuk és immunoblot technikával vizsgáltuk a p54 alegységre (negyedik zseb) és az $\alpha 1$ CP alegységre specifikus (ötödik zseb) mAb-vel. 6.-8. zseb: ATP elvonás után a DEAE- fractogel frakciót ATP jelenlétében inkubáltuk, majd elválasztottuk 1 mM ATP tartalmú natív poliakrilamid gélen. Az immunoblot analízist a p54 alegységre (hatodik zseb) és az $\alpha 1$ CP alegységre specifikus mAb-vel (hetedik zseb) végeztük, a peptidáz aktivitás vizsgálatát pedig a fluorigén gél felülrétegzési (overlay) technikával (nyolcadik zseb).

A p54 kölcsönható fehérjék azonosítása

A fent leírt kísérleteink eredményeiből kiindulva logikusnak tűnt a feltételezés, hogy a p54 fehérjével, annak Zn^{2+} - indukálta disszociációját követően kölcsönható fehérjék szerepet játszanak az intakt 26S proteaszómák Zn^{2+} - eltávolítást kísérő szerkezeti és működésbeli renaturációjában. Ezen kölcsönható fehérjék azonosítása céljából egy DTT-mentesített

DEAE-fractogel frakciót inkubáltunk 1 mM ATP és ATP regeneráló rendszer jelenlétében 20 percig 200 μ M ZnCl₂-dal, majd keresztkötöttük diszukcinimidil-szuberáttal. A keresztkötési reakciót leállítottuk feleslegben adott glicinnel, majd a mintát fracionáltuk Superose 6 géliszűrő oszlopon annak érdekében, hogy elválasszuk a RP-okat, a CP-ot, a p54 alegységet keresztkötve a kölcsönható partnereivel, a szabad p54 alegységet és egyéb monomer fehérjéket. A Superose 6 kromatográfia frakcióit immunoblot technikával vizsgáltuk tovább a p54 alegységre specifikus mAb segítségével, hogy megállapítsuk, mely frakciókban eluálódik az oszlopról a p54 a vele keresztkötött kölcsönható partnereivel együtt. Ezeket a frakciókat azután immunprecipitáltuk a p54 alegységre specifikus monoklonális ellenanyagok keverékével. Az immunprecipitáció során kontrollként egy, a burgonya leghemoglobin ellen kifejlesztett mAb-t használtunk. A 12. ábrán látható, hogy a p54 alegységre specifikus mAb-vel végzett immunprecipitáció során a Zn²⁺-kezelést követően megjelenő keresztkötött p54 származékok teljes mintázata kicsapódott (2. zseb). Ezek a sávok teljes mértékben hiányoztak a nem specifikus ellenanyaggal nyert kontroll immunprecipitátumból (12. ábra, 1. zseb). A kicsapódott fehérjék immunoblot vizsgálata számos proteaszómaalegység specifikus mAb-kal is alátámasztotta az immunprecipitáció specificitását: a p54 fehérjén kívül egyetlen egyéb RP vagy CP alegység sem volt jelen a kicsapott frakcióban (12. ábra, 3.-6. zseb). Az immunprecipitált fehérjéket SDS-poliakrilamid gélen elválasztottuk és Coomassie kékkel megfestettük. A fehérjesávokat ezután a gélből kivágtuk, majd a gélben történő tripszines emésztést követően a nem fracionált emésztési keveréket MALDI – TOF MS-nak vetettük alá. A p54 alegységen kívül négy különböző fehérjét azonosítottak az immunprecipitált mintában, mint keresztkötött kölcsönható partnerek: a Hsc70Cb, feltételezett hőszokk fehérjét (2. sáv; NCBI hivatkozási szám: 4753683, alátámasztva PSD által: N⁵⁹⁴KLQGGPFER⁶⁰³); az Smt3 SUMO-aktiváló enzim 2-t (3. sáv; NCBI hivatkozási szám: 6934296, alátámasztva PSD által: Q⁶²FLFHR⁶⁷ és F²⁷⁸FNEDITYLLR²⁸⁸); egy glutamil-amidopeptidáz aktivitással rendelkező *Drosophila* fehérjét (4. sáv; NCBI hivatkozási szám: 24646518, alátámasztva PSD által: Y⁷⁷³INWAWDESNVR⁷⁸⁴); és a Hsp82 hőszokk fehérjét (5. és 6. sáv; NCBI hivatkozási szám: 8127, alátámasztva PSD által: A³²⁴LLFIPR³³⁰ és H³¹³FSVEGQLEFR³²³). A Hsp82 fehérje jelenléte az 5. és a 6. vastag sávban valószínűleg a jól ismert oligomerizációra hajló tulajdonságával magyarázható, melyet a bivalens kationok még jobban felerősítenek (188). Az 1. sávban azonosított IgM az mAb 170 ascitesz folyadékából származik.

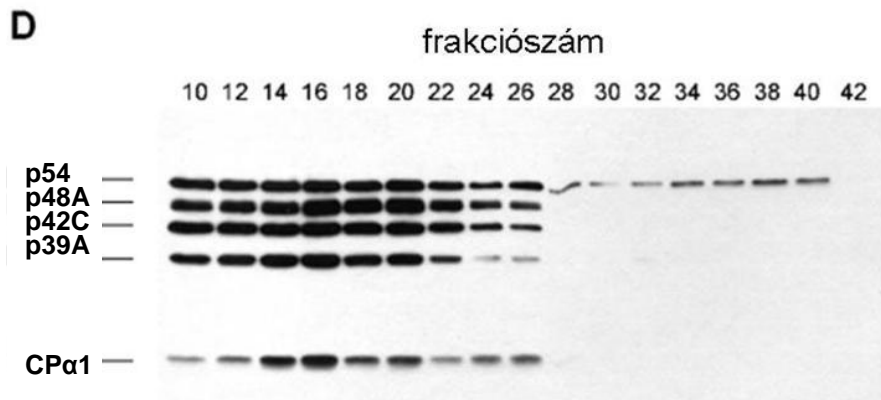
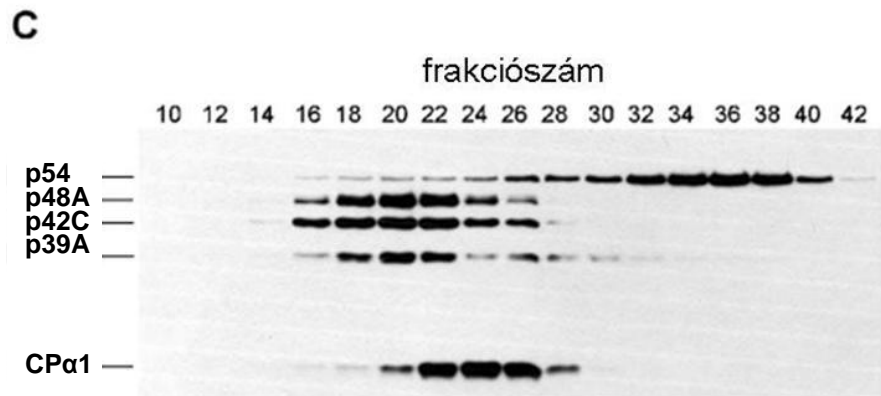
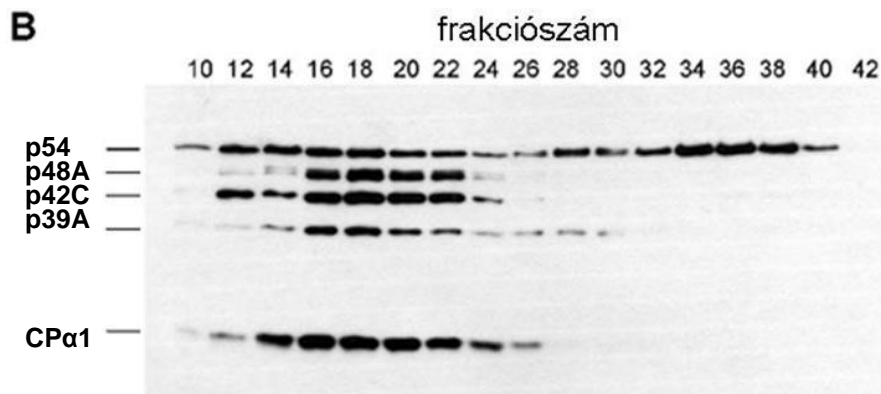
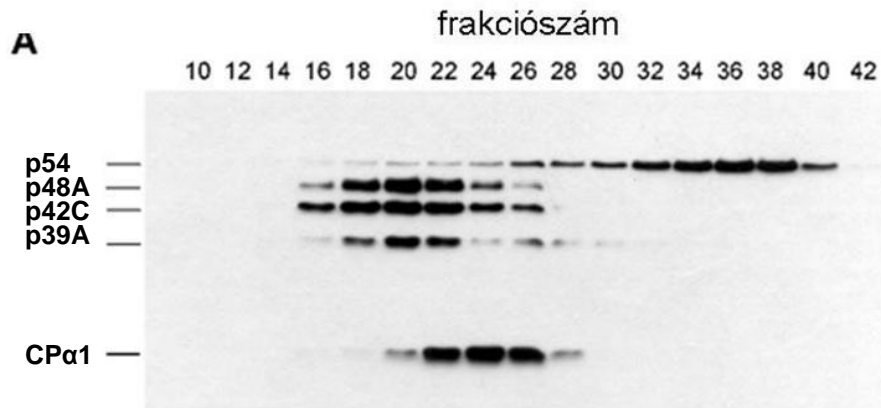


12. ábra: A p54 kölcsönható fehérjék tisztítása immunprecipitációval.

A 4. ábra (A) pontjában bemutatott 20 percig inkubált keresztkötött DEAE-fractogel frakciót immunprecipitáltuk a p54 alegységre specifikus mAb 28 és mAb 170 keverékével. A kontroll immunprecipitációhoz a burgonya leghemoglobin elleni mAb-t használtuk. A kicsapott mintákat immunoblot technikával vizsgáltuk. 1. zseb: a burgonya leghemoglobin elleni ellenanyaggal kapott immunprecipitátum a p54 alegység elleni ellenanyaggal analizálva. A p54 alegységre specifikus ellenanyagok keverékével kapott immunprecipitátum a p54 alegységre (2. zseb), az α 1 CP alegységre (3. zseb), a p39A fedél alegységre (4. zseb), a p50 ATP-áz alegységre (5. zseb) és a p42A fedél alegységre (6. zseb) specifikus mAb- val vizsgálva.

A Hsp82 élesztő homológjának irodalmi adatok szerint fontos szerepe van az élesztő 26S proteaszóma összeszerelésében és az élesztő proteaszóma strukturális egységének megőrzésében (189). A Hsp82 dajkafehérje, mint fő p54 kölcsönható fehérje azonosítása és ismert szerepe az élesztő 26S proteaszóma szerkezetének fenntartásában azt sugallta, hogy a

Drosophila Hsp82-nek szerepe lehet a 26S proteaszóma Zn^{2+} -kezelést követő újra összeszerelődésében. A homogenitásig tisztított 26S proteaszóma, mint láttuk, a cink eltávolítást követően képtelen újra összeszerelődni, míg a részlegesen tisztított DEAE-fractogel frakcióban a renaturáció nagy határfokkal végbemegy. Úgy gondoltuk, hogy e jelenség oka lehet a Hsp82 fehérje hiánya a homogenitásig tisztított 26S proteaszóma preparátumban. Ezért elhatároztuk, hogy megvizsgáljuk a Hsp82 fehérje szerepét a cink-függő összeépülési folyamatban. Egy homogenitásig tisztított 26S proteaszóma frakciót inkubáltunk ATP és ATP regeneráló rendszer jelenlétében $200 \mu M$ $ZnCl_2$ -dal, 20 percig, $25^\circ C$ -on, majd a cinket a fentebb leírt módon eltávolítottuk. Ezt követően a proteaszómát további 20 percig inkubáltuk ötszörös moláris feleslegben adott tisztított Hsp82 fehérjével vagy anélkül. A 26S proteaszóma újra összeszerelődését és a p54 alegység visszaépülését a RP-ba immunoblot technikával vizsgáltuk, miután a fehérjéket méret szerint elválasztottuk Superose 6 gélszűrő oszlopon. Amint az a 13A ábrán látható, a cink-kezelt tisztított 26S proteaszóma összeszerelődése nem megy végbe csupán Zn^{2+} -eltávolítás hatására. A p54 fehérje elúciós csúcsa (36-os frakció) a monomer fehérjéknek megfelelő pozícióban van, a szabad CP-é a 24-es frakcióban, a szabad RP-é pedig a 20-asban. A tisztított Hsp82 fehérje elősegítette a 26S proteaszóma cink-eltávolítást követő részleges renaturációját (13B ábra). A p54 fehérjének egy jelentős része visszaépült a RP-ba, az eltolódás a szabad CP és a szabad RP elúciós pozíciójában megszűnt, közös elúciós csúcsuk a 16-18-as frakciókban az egy RP-mal sapkázott 26S proteaszómákénak felel meg (67).



13. ábra: A Hsp82 elősegíti a cink-kezelt tisztított 26S proteaszóma újra összeszerelődését.

(A) Tisztított *Drosophila* 26S proteaszómát inkubáltunk ATP jelenlétében 200 μM ZnCl_2 -dal. A cink eltávolítása után az inkubációt további 20 percig folytattuk, majd a proteaszómákat elválasztottuk Superose 6 gélszűrő oszlopon. Az oszlopról eluált frakciókat (200 μl) 7 térfogat acetonnal történő kicsapással bekoncentráltuk, 10 %-os (w/v) SDS-gélen elválasztottuk és immunobloton vizsgáltuk a bal oldalon jelölt alegységekre specifikus öt mAb felhasználásával.

(B) Tisztított *Drosophila* 26S proteaszómát inkubáltunk ATP jelenlétében 200 μM ZnCl_2 -dal. A cink eltávolítása után az inkubációt további 20 percig folytattuk 5-szörös moláris feleslegben hozzáadott tisztított Hsp82 fehérje jelenlétében majd a proteaszómákat elválasztottuk Superose 6 gélszűrő oszlopon. Az oszlopról eluált frakciókat (200 μl) 7 térfogat acetonnal történő kicsapással bekoncentráltuk, 10 %-os (w/v) SDS-gélen elválasztottuk és immunobloton vizsgáltuk a bal oldalon jelölt alegységekre specifikus öt mAb felhasználásával.











(C) *Drosophila* 26S proteaszóma DEAE-fractogel frakcióját inkubáltuk ATP jelenlétében 200 μM ZnCl_2 -dal, majd elválasztottuk 200 μM ZnCl_2 jelenlétében Superose 6 gélszűrő oszlopon. Az oszlopról eluált frakciókat (20 μl) 10 %-os (w/v) SDS-gélen elválasztottuk és immunobloton vizsgáltuk a baloldalon jelölt alegységekre specifikus öt mAb felhasználásával.

(D) *Drosophila* 26S proteaszóma DEAE-fractogel frakcióját inkubáltuk ATP jelenlétében 200 μM ZnCl_2 -dal. A cink eltávolítása után az inkubációt további 20 percig folytattuk, majd a proteaszómákat elválasztottuk Superose 6 gélszűrő oszlopon. Az oszlopról eluált frakciókat (20 μl) 10 %-os (w/v) SDS-gélen elválasztottuk és immunobloton vizsgáltuk a baloldalon jelölt alegységekre specifikus öt mAb felhasználásával.

A Hsp82 elősegítette a tisztított 26S proteaszóma újra összeszerelődését, noha ez az összeszerelődés jóval kevésbé tökéletes, mint amit a részlegesen tisztított DEAE-fractogel frakcióban lehet megfigyelni (10C, 13C és 13D ábra). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy egyéb összeépülést segítő faktor(ok)nak, mint például a Hsc70Cb –nek, is szerepe lehet a folyamatban.

Ezután tovább vizsgáltuk a Zn^{2+} - hatására disszociált p54 által kialakított, kémiai keresztkötési technikával azonosított, fehérje-fehérje kölcsönhatások fiziológiai relevanciáját. Élesztő két–hibrid kísérletet hajtottunk végre, hogy olyan fehérjéket azonosítsunk, melyek *in vivo* kölcsönhatnak a p54 alegységgel. Mivel a p54 fehérje C-terminális fele önaktivációt

okozott a Gal4 rendszerben, ezért csak az alegység N-terminális felét tudtuk csaliként (bait) használni. Az N-terminális p54 fehérjét a pBTM116, DNS - kötő domént tartalmazó vektorba klónoztuk. Ezt a vektort egy, a pACT2 Gal4 aktivációs domént tartalmazó vektorba klónozott *Drosophila* embrionális cDNS könyvtárral együtt élesztőbe transzformáltuk. A kölcsönható fehérjéket kódoló plazmidokat együttesen hordozó transzformánsokat hisztidint nem tartalmazó minimál táptalajon válogattuk ki. A kölcsönhatások specificitását LacZ teszttel tovább ellenőriztük. A kapott kölcsönható fehérjék közül az egyik, a keresztkötési kísérletekkel egybehangzóan, a *Drosophila* Smt3 SUMO-aktiváló enzim volt. Ezen kívül a DmUbc9 *Drosophila* SUMO- konjugáló enzimet (190) is azonosítottuk az élesztő két-hibrid technikával a p54-gyel kölcsönható fehérjék között (14. ábra).

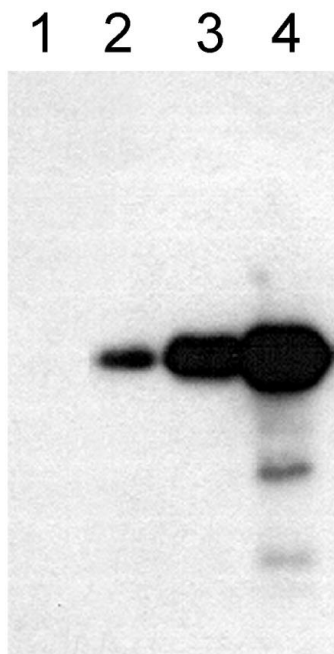
plazmid	minimál táptalaj	Lac Z aktivitás
Rpn10/p54 pBTM 116		
Smt3 pACT2		
DmUbc9 pACT2		
Rpn10/p54 + Smt3 pBTM 116 + pACT2		
Rpn10/p54 + DmUbc9 pBTM 116 + pACT2		

14. ábra: *In vivo* kölcsönhatás a p54 N-terminális fele és az Smt3 SUMO-aktiváló, valamint a DmUbc9 SUMO-konjugáló enzimek között.

Az egyszeres és kétszeres transzformáns élesztőket minimál táptalajon növesztettük és teszteltük a LacZ aktivitásra.

Az Smt3 SUMO-aktiváló enzim és a DmUbc9 SUMO-konjugáló enzim kölcsönhatását a p54 fehérjével tovább bizonyítottuk *in vitro* kötési (pull-down) kísérletekkel. Ehhez előállítottuk

az Smt3, a DmUbc9 és a Hsp82 fehérje FLAG-peptiddel fúzionált formáit. Az anti-FLAG M2 affinitás gél, mely agarózhoz kovalensen kapcsolt, FLAG-peptid elleni tisztított rácsáló monoklonális ellenanyagot tartalmaz, specifikusan képes kötni a FLAG-peptidet, valamint a FLAG-peptiddel fúzionált rekombináns fehérjéket. Az anti-FLAG M2 affinitás gélt megtöltöttük FLAG-tag-gel ellátott Smt3 fehérjével, vagy FLAG-DmUbc9-cel, majd hozzáadtuk a rekombináns p54 fehérjét. A p54 kötődését a FLAG-peptiddel történő elúciót követően immunoblot technikával vizsgáltuk. A 15. ábrán látható, hogy a p54 nem kötődik az üres FLAG affinitás oszlophoz (1. zseb), ezzel szemben kötődik mind a FLAG-Smt3-mal (2. zseb), mind a FLAG-DmUbc9-cel (3. zseb) töltött affinitás oszlophoz.



15. ábra: *In vitro* interakció az Smt3 SUMO-aktiváló enzim, a DmUbc9 SUMO-konjugáló enzim, a Hsp82 fehérje és a teljes hosszúságú p54 között.

Nem töltött anti-FLAG M2 affinitás oszlopra (1. zseb), vagy anti-FLAG affinitás oszlopokra, melyeket megtöltöttünk FLAG-Smt3 SUMO-aktiváló enzimmal (2. zseb), FLAG-DmUbc9 SUMO-konjugáló enzimmal (3. zseb), vagy FLAG-Hsp82 fehérjével (4. zseb) felvittünk p54 fehérjét. Az oszlophoz kötődött fehérjéket feleslegben adott FLAG peptiddel eluáltuk és immunoblottal vizsgáltuk a p54 alegységre specifikus mAb segítségével.

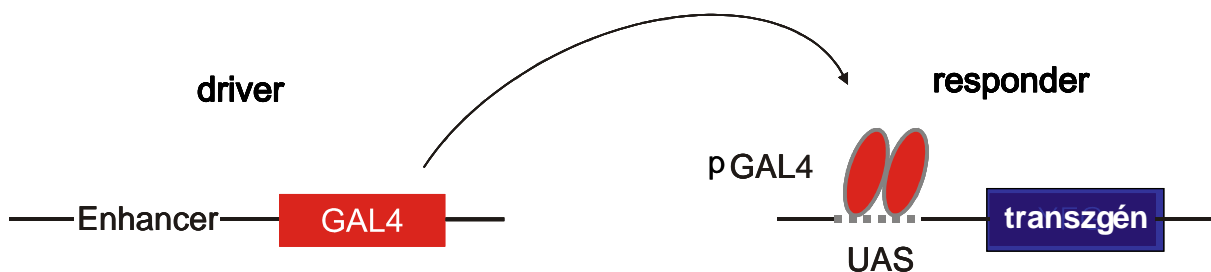
A p54 5'-felét használva családoknak az élesztő két-hibrid kísérletben, nem tudtunk kimutatni kölcsönhatást az alegység N-terminális fele és a Hsp82 fehérje között. A pull-down kísérletekben azonban, ahol a teljes hosszúságú p54 fehérjét használtuk, erős kölcsönhatást tapasztaltuk a két fehérje között (15. ábra, 4.zseb).

A feleslegben adott Zn^{2+} -nek, valamint a feleslegben adott Zn^{2+} -elvonásának a proteaszómára gyakorolt hatását vizsgálva tehát azt találtuk, hogy Zn^{2+} jelenlétében a *Drosophila* 26S proteaszóma RP és CP szubkomplexekre disszociál és a p54 alegység leválik a proteaszómáról. A p54 disszociációja intenzív átrendeződéseket eredményez a fedél alkompexumban és a 26S proteaszóma peptidáz aktivitásának elvesztéséhez vezet. A Zn^{2+} -indukálta strukturális és funkcionális változások teljes mértékben reverzibilisek; a Zn^{2+} eltávolításának következményeként a p54 visszaépül a RP-ba, a 26S proteaszóma újra összeszerelődik és visszanyeri peptidáz aktivitását. A Zn^{2+} -ciklus során a p54 reverzibilisen ingázik az RP kötött és szabad állapot között, mely jelenség nagyban alátámasztja az ingázó modell helyességét. A p54 Zn^{2+} -indukált disszociációját követően kölcsönhat egy sor celluláris fehérjével. Ezek közül a Hsp82-t azonosítottuk, mint fő kölcsönható partnert. A Hsp90 dajkafehérjéről, a *Drosophila* Hsp82 élesztő ortológjáról bebizonyították, hogy fontos szerepe van az élesztő 26S proteaszóma összeszerelődésében és szerkezeti egységének fenntartásában, ami alátámasztja azt a megfigyelésünket, miszerint a p54 fehérje kölcsönható partnereinek szerepe van a 26S proteaszóma, Zn^{2+} -eltávolítást követő újra összeszerelődésében. Ugyanakkor az Smt3 SUMO-aktiváló enzim jelenléte a p54 kölcsönható fehérjék között felvetette annak lehetőségét, hogy a proteaszómán kívül a disszociált p54 fehérje poszt-szintetikus módosításon esik át, és esetleg extraproteaszómális szerepe(i) lehet(nek) ebben a formában.

Ezért célul tűztük ki, hogy modellezzük azt a szituációt, mikor a p54 a proteaszómán kívül van jelen. Az volt a hipotézisünk, hogy ha túltermeltetjük a p54 fehérjét, és annak különböző származékait *Drosophilában*, esetleg megzavarhatjuk ezt az ingázó folyamatot, stabilizálhatjuk az alegység proteaszómán kívüli állapotát, és ezáltal többet megtudhatunk a fehérje esetleges extraproteaszómális szerepé(i)ről.

A transzgénikus *Drosophila melanogaster* törzsek előállítása

A p54 fehérjének két fontos doménje van: a von Willebrand A típusú domén, ami a fehérje N-terminális felén helyezkedik el, és az UIM domének (ubikvitinnel kölcsönható motívum, ubiquitin interaction motif), melyek a fehérje C-terminális felén helyezkednek el. Irodalmi adatok szerint a fehérje N-terminális fele felelős a p54-nek a RP-ba történő beépüléséért, az UIM domének pedig a multiubikvitinált fehérjék megkötéséért. Arra szerettünk volna választ kapni, hogy mi ezen domének hatása *in vivo*, azaz mi történik, ha túltermeltetjük őket *Drosophilában*. Ezért transzgénikus *Drosophila melanogaster* törzseket hoztunk létre, melyek vagy a C- vagy az N-terminális felét termelik a p54 fehérjének. Erre a célra az UAS-Gal4 rendszert választottuk (16. ábra). E rendszer segítségével bármilyen gén szabályozott expresszióját indukálni lehet, bármely szövetben és bármelyik fejlődési állapotban.

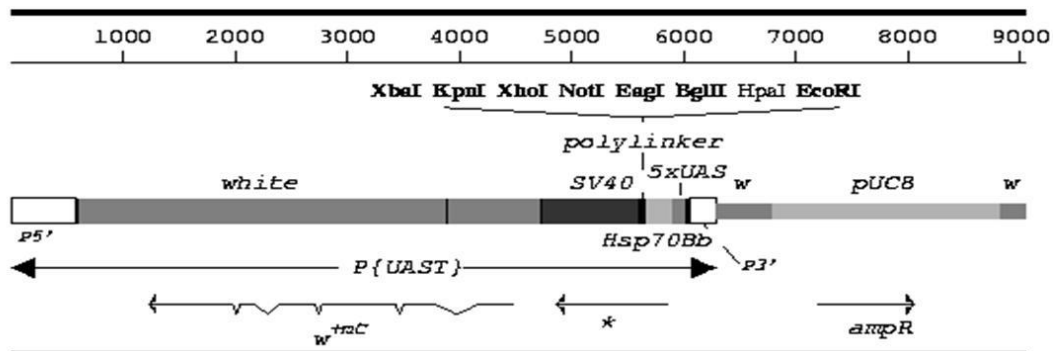


16. ábra: Az UAS-Gal4 rendszer elvének sematikus bemutatása.

GAL4P: Gal4 fehérje, UAS: a Gal4 fehérje specifikus kötőhelye, (upstream activating sequence)

A Gal4 fehérjét az élesztő, *Saccharomyces cerevisiae* –ben azonosították, mint a galaktóz által indukált gének aktivátorát. A Gal4 fehérje azáltal szabályozza célgénjeinek transzkripcióját, hogy hozzákötődik azok regulátor régiójában található kötőhelyéhez, mely négy hasonló, 17 bp-ból álló DNS szakaszból áll fel. Ez a szakasz egy úgynevezett

Upstream Activating Sequence (UAS) elemet határoz meg, az enhancer elemekkel analóg módon. Mivel *Drosophilában* nincs endogén Gal4, és a Gal4 fehérje expressziójának nincs fenotipikus hatása, a Gal4 expresszió használható *Drosophilában* arra, hogy az UAS kontroll alatt álló célgének transzkripcióját stimulálja. A transzgénjeinket tartalmazó P-elemek *Drosophila* embriókba történő bejuttatására a pP{UAST} vektort használtuk (17. ábra).



17. ábra: A pP{UAST} vektor.

p5': a pP{UAST} vektorban található és a transzformáns *Drosophilák*ba beépülő, a transzgént hordozó P-elem 5' vége. p3': a pP{UAST} vektorban található P-elem 3' vége. Hsp70Bb: a transzgén promotere. *: a beépíteni kívánt transzgén. SV40: poliadenilációs szignál. *white*: piros szemszint okozó domináns marker gén, mely a *Drosophila* transzformánsok szelekcióját biztosítja. *ampR*: ampicillin rezisztencia gén, a bakteriális transzformánsok szelekcióját biztosítja. pUC8: pUC8 bakteriális vektor szekvencia, mely a bakteriális replikációt biztosítja.

Ez a vektor öt, egymás mellett elhelyezkedő és optimalizált Gal4 kötőhelyet tartalmaz a poliklonozó helytől, azaz az indukálni kívánt génünk beillesztési helyétől 5' irányban. A különböző konstrukciókat tartalmazó plazmidokat *Drosophila* embriókba injektáltuk a P-elem beépüléséhez szükséges transzpozáz forrást tartalmazó segéd (helper) plazmiddal együtt. A transzgént hordozó állatok térképezése és törzsbe állítása (lásd: Anyagok és módszerek) után számos független beépülést hordozó ún. responder vonalat kaptunk. Ezekben a törzsekben a transzgénünk nem expresszálódik, mert a termeltetni kívánt fehérjénk, a responder expressziójához szükséges a Gal4 jelenléte, így ezekben a vonalakban a Gal4 fehérje

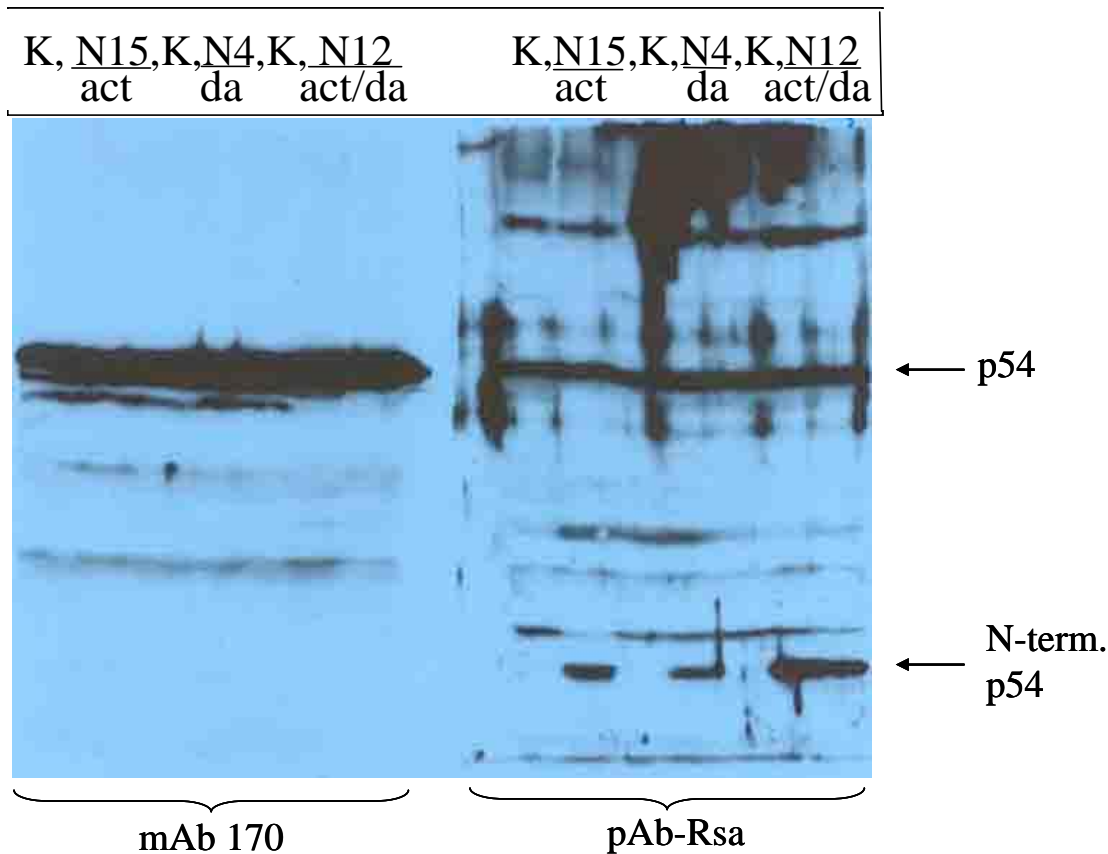
hiányában génünk transzkripcionálisan inaktív marad. Ahhoz, hogy aktiváljuk a transzgénünk transzkripcióját, a responder törzseket olyan törzsekhez keresztezzük, melyek a Gal4-et meghatározott szövet- és/vagy fejlődésspecifikus mintázat szerint termelik. Ezeket a törzseket driver törzseknek nevezzük. Ezen keresztezés utódnemzedéke a respondert olyan transzkripcionális mintázat szerint termeli, amely megfelel a driver törzs Gal4 expressziós mintázatának.

Az elsőként felhasznált konstrukciók a p54 alegység N- illetve C-terminális felét tag nélküli változatban kódolták a pP{UAST} vektorba klónozva. Ezeket a konstrukciókat külön-külön helper plazmiddal együtt *Drosophila* embriókba injektáltuk, majd a transzformánsokból független beépüléseket reprezentáló transzgénikus vonalakat hoztunk létre. Tizenkét független vonalat kaptunk (C1-12), melyek a p54 C-terminális felét kódoló P-elemet hordozzák és tizennégy olyan független vonalat (N1-14), melyek a p54 N-terminális felét kódoló P-elemet hordozzák. Ezeket a vonalakat különböző driver törzsekhez kereszteztük, melyek a Gal4 fehérjét a teljes fejlődés során, minden szövetben termelik, ezek az általános driverek (lásd: Anyagok és módszerek) valamint olyanokhoz, melyek a Gal4-et meghatározott szövetspecifikus mintázatnak megfelelően expresszálják (szövetspecifikus driverek).

A transzgénikus *Drosophila melanogaster* törzsek jellemzése

Azok a *Drosophila* törzsek, melyekben a p54 N-terminális felét az általános driverek irányítása alatt expresszáltattuk, nem mutattak semmilyen fenotipikus változást, noha Western-blottal ki tudtuk mutatni a p54 N-terminális fehérje magas fokú expresszióját ezekben az állatokban (18. ábra).

Ezzel összhangban, a szövetspecifikus driverekkel indukálva az N-terminális fehérje termelődését, szintén nem kaptunk fenotípusbeli változást.



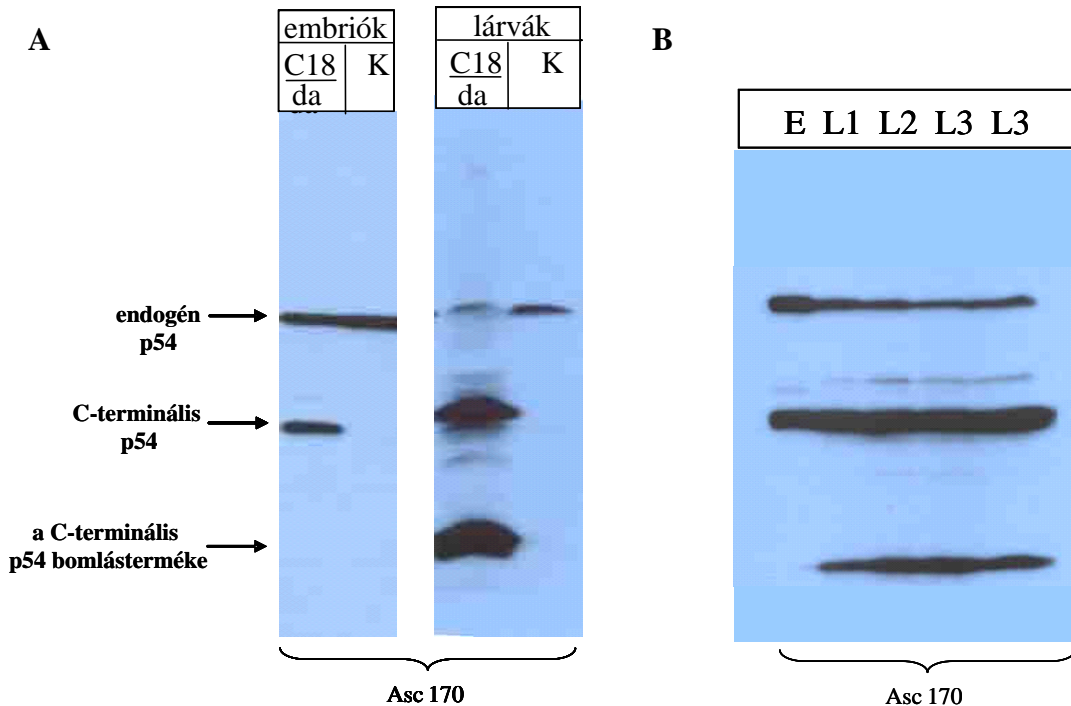
18. ábra: Az actin 5C-Gal4 és a daughterless-Gal4 driverekkel meghajtva az N-terminális p54-et kódoló respondert, az indukált transzgénikus törzsekben az N-terminális p54 fehérje termelődése kimutatható.

Az N4, N12 és N15-ös jelű, az N-terminális p54-et kódoló responder törzseket összekeresztettük actin 5C-Gal4 vagy daughterless-Gal4 driver törzsekkel, és immunoblot technikával vizsgáltuk az utódokban a transzgén expresszióját a p54 C-terminálisán lévő epitopot felismerő monoklonális ellenanyag (mAb 170) és a p54 fehérje N-terminálisát is felismerő poliklonális ellenanyag (pAb-Rsa) segítségével.

K: kontroll, nem indukált törzs, act: actin 5C Gal4 driver, da: daughterless-Gal4 driver

Ezzel szemben minden olyan törzsbe tartozó állat, mely a p54 C-terminális felét termelte az általános driverek valamelyikének irányítása alatt, legkésőbb az L3 lárva stádiumban elpusztult. Western-blottal ebben az esetben is kimutattuk a C-terminális p54 fehérje termelődését, mely embrionális kortól kezdve végig az egyedfejlődés során az N-terminális félhez hasonlóan magas szinten expresszáldott: embrió állapotban az endogén p54- gyel

összemérhető szinten, a különböző lárva állapotokban pedig az endogén p54 mennyiségét többszörösen meghaladó mértékben (19. ábra).



19. ábra: A C-terminális p54 fehérje termelődésének kimutatása a daughterless-Gal4 driverrel meghajtott, C-terminális p54 gént hordozó C18-as jelű responder törzsbe tartozó embriókból és különböző korú lárvákból.

(A) A C-terminális p54 expresszióját immunoblot technikával ellenőriztük embriókból és lárvákból készült kivonatokból immunoblot technikával, a p54 alegységre specifikus mAb felhasználásával.

da: daughterless-Gal4 driver, K: kontroll, driverrel nem meghajtott responder törzs, Asc 170: a p54 alegységre specifikus mAb 170

(B) A C-terminális p54 expresszióját, illetve az endogén p54 fehérjéhez viszonyított mennyiségét nyomonkövettük a különböző fejlődési állapotokban az (A) pontban leírtak szerint.

E: embrió, L1, L2, L3: egymást követő lárva állapotok

A p54 fehérje C-terminális felét termelő, mutáns L3 állapotú lárvák esetén azt találtuk, hogy a kontroll törzshöz képest kisebb az agyuk és az imágó korongjaik, mely fenotípus gátolt

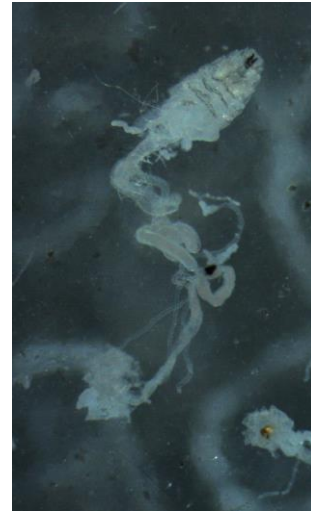
proteaszóma funkcióra utal. A legmeglepőbb fenotípusa azonban ezeknek a lárváknak az előbél kitágulása (20. ábra), melynek pontos okát nem ismerjük. Valószínűleg bizonyos speciális, a bélben lezajló folyamatok, mint például a felszívódás vagy a perisztaltika, különösen érzékeny lehet a C-terminális fragment túltermelésére.



kontroll

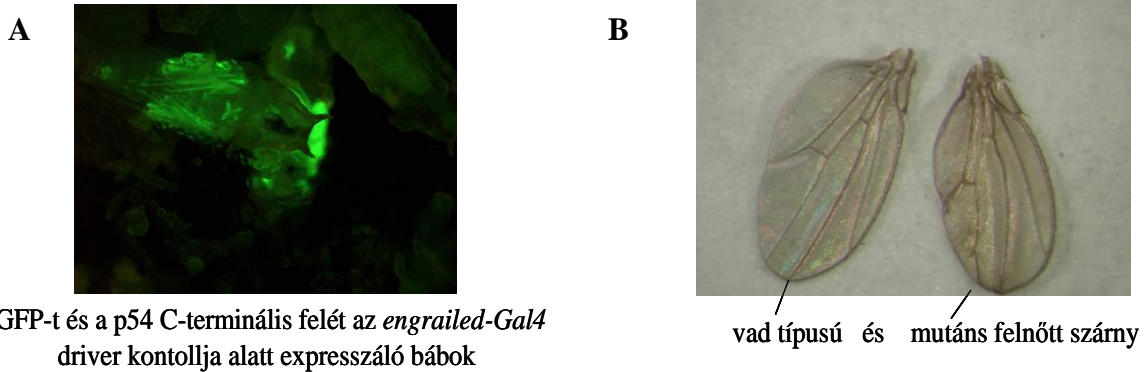


C-terminális p54-et expresszáló mutáns lárvák



20. ábra: A C-terminális p54-et az actin 5C-Gal4 általános driver irányítása alatt expresszáló mutáns L3 állapotú lárvák és nem indukált kontroll lárvák fénymikroszkópos képe.

Ugyanakkor a C-terminális p54-et a szárnydiszkusz abdominális felében, az engrailed-Gal4 driver irányítása alatt termelő muslicákban mutáns szárnyfenotípust figyeltünk meg (21. ábra): a szárny abdominális fele a vad típuséhoz képest kisebb volt, valamint a poszterior keresztvéna és az V. véna vége elágazott. A fenotípus a *CyO* domináns markert hordozó állatokon kifejezettebben mutatkozott meg. Esetükben a szárny teljesen összezsavarodott, és a poszterior sejtben egy plusz véna jelent meg.

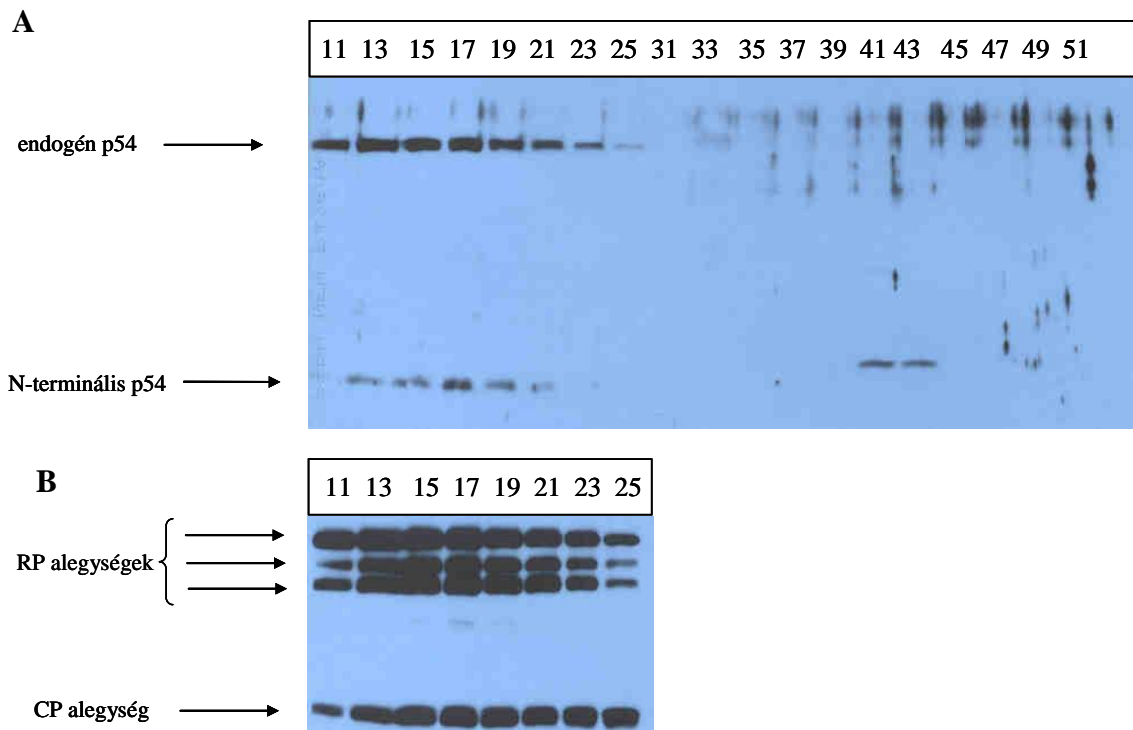


21. ábra: A C-terminális p54 fehérjét az engrailed-Gal4, UAS-GFP szárnyspecifikus driver irányítása alatt termelő adult legyek mutáns szárnyfenotípust mutatnak.

(A) A C-terminális p54 fehérjét az engrailed-Gal4 driver irányítása alatt termelő bábok szárnydiszkuszai fluoreszcens mikroszkópban zöld fényel világítanak, ami arra utal, hogy a transzgén kifejeződik bennük.

(B) A C-terminális p54 fehérjét az engrailed-Gal4 driver irányítása alatt termelő adult legyek szárnyának abdominális fele fénymikroszkópban vizsgálva a vad típushoz képest kisebb, az erezete pedig durvább.

Ezután arra voltunk kíváncsiak, vajon a rekombináns N-terminális valamint a C-terminális p54 képes-e *in vivo* beépülni a *Drosophila* 26S proteaszómába. Ezért gélszűrési kromatográfiát hajtottunk végre Superose 6 oszlopon, az actin 5C-Gal4 általános driver irányítása alatt az N-terminális p54-et termelő felnőtt állatokból, valamint a C-terminális termelő L3 állapotú lárvákból. A gélszűrési kromatográfia és az azt követő immunoblot analízis bebizonyította, hogy az N-terminális p54 képes beépülni a proteaszómába, mivel e fél p54 darab az endogén p54-gyel és a többi proteaszóma alegységgel megegyező frakciókban eluálódott az oszlopról (22A és B ábra). Ezzel ellentétben a C-terminális p54 fehérje nem tudott beépülni a proteaszómába. Ezen eredmények összhangban állnak az irodalmi adatokkal, miszerint az alegység N-terminális fele felelős a p54 fehérje proteaszómába történő beépüléséért.



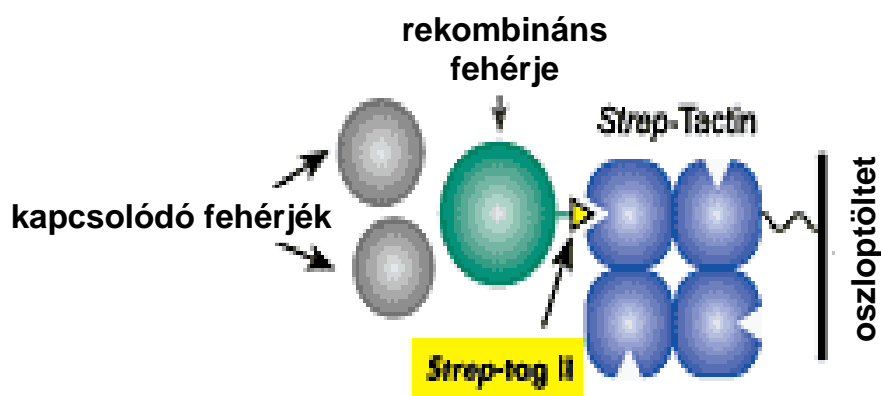
22. ábra: Az N-terminális p54 fehérje beépül a 26S proteaszómába.

Az N-terminális p54 fehérjét termelő felnőtt állatokat feltártuk proteaszóma pufferben. A mintát lecentrifugáltuk, majd felvittük Superose 6 gélszűrő oszlopra. Az elválasztott fehérjéket immunoblot technikával vizsgáltuk tovább a p54 elleni poliklonális ellenanyaggal (A) valamint három RP alegység (p54, p42C, p39A) elleni és egy CP alegység ($\alpha 1$) elleni monoklonális ellenanyaggal (B).

Poszttranszgenetikusan módosított p54 C-terminális formák azonosítása

Mivel *in vitro* eredményeink azt mutatták, hogy a proteaszóma RP-ből disszociált p54 kölcsönhat számos nem-proteaszómális fehérjével, melyek közül bizonyosaknak szerepe lehet a p54 proteaszómába történő visszaépülésében, míg másoknak a p54 esetleges poszttranszgenetikusan módosításában, ezért további célul tűztük ki, hogy megállapítsuk, a p54-nek milyen szerepe, sorsa van a proteaszómán kívül, azonosítsuk *in vivo* kölcsönható partnereit, és esetleges poszttranszgenetikusan módosításait. Annak érdekében, hogy megtaláljuk és azonosítsuk ezeket a fehérjéket, illetve poszttranszgenetikusan módosított formákat, létrehoztunk olyan transzgenetikusan *Drosophila* törzseket is, melyek a p54 különböző formáinak affinitás taggal

ellátott változatait expresszálják. E célra a széles körben használt FLAG-tag mellett, az ún. Strep-címkét választottuk. A Strep-címke, a FLAG-címkéhez hasonlóan egy rövid tag, így általában nem gátolja fúziós partnerének biológiai aktivitását. A Strep-tag fehérjetisztítási rendszer alapja, hogy egy sztreptavidin származék, melyet Strep-Tactin-nak neveznek, képes szelektíven megkötni a Strep címkével ellátott fúziós fehérjét. Ez a módszer alkalmazható szinte bármely rekombináns fehérje egy lépésben történő tisztítására fiziológiai körülmények között, ezáltal lehetővé teszi a kölcsönható partnerek együttes tisztítását is (23. ábra).

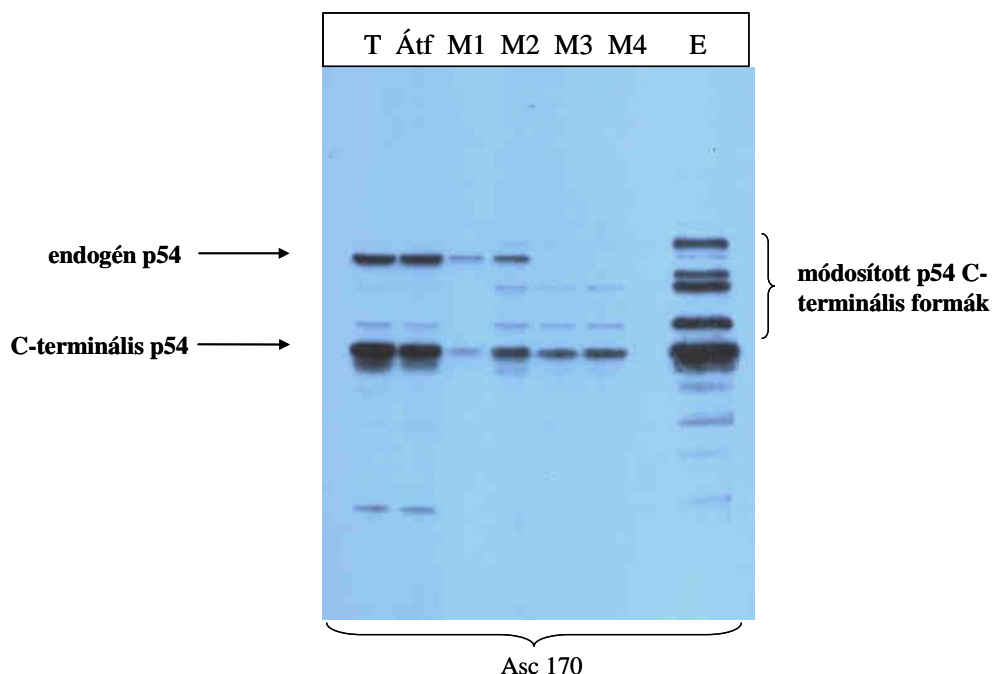


23. ábra: A Strep-Tactin® affinitás kromatográfia elvének sematikus bemutatása.

A transzgénikus *Drosophila* törzsekkel termeltethető affinitás címkével ellátott p54-származékok a következők: a teljes hosszúságú p54, annak N-terminális fele, C-terminális fele és a teljes hosszúságú p54 fehérjének egy pontmutáns Strep-taggal rendelkező változata, melyben a 11-es pozícióban lévő aszparaginsavat arginin aminosavra cseréltünk ki (D11R), és amely mutációt hordozó p54 fehérje élesztőben, irodalmi adatok szerint nem képes beépülni a proteaszómába. Ezenkívül létrehoztuk a p54 C-terminális fehérje dupla taggal (FLAG-p54-C-terminális-Strep) ellátott változatát termelő törzset is, valamint egy olyan törzset, mely a p54 C-terminális felét hővel indukálható módon termeli (lásd: Anyagok és módszerek).

Hasonlóan a tag nélküli változatokhoz, az N-terminális, ezen kívül a teljes hosszúságú és a pontmutáns, Strep-taggal ellátott p54-et általános driver irányítása alatt termelő muslicák életképesek, nem mutatnak fenotipikus változást, míg a Strep-taggal rendelkező C-terminális p54-et termelő törzsek egy része a tag nélküli változathoz hasonlóan késői L3 lárvaállapotig,

míg 1-2 törzs bábállapotig él el. A dupla taggel ellátott C-terminális p54-et általános driver irányítása alatt termelő törzsek pedig teljes mértékben életképesek. Ezek a különbségek valószínűleg az expresszió szintjének különbségével és az affinitás címke funkciót befolyásoló hatásával magyarázhatóak. A hővel indukálható törzsek esetében bármely fejlődési stádiumban indukálható a Strep-p54 C-terminális fehérje termelődése. Ha a transzgén indukciója a bábozódást követően történt, abban az esetben fenotipikus változás már nem volt megfigyelhető. Így bábállapotban indukálva a C-terminális p54 fehérje termelődését, biokémiai kísérletekre sokkal jobban alkalmas, könnyebben kezelhető felnőtt állatokat tudtuk használni.



24. ábra: A Strep-p54 C-terminális fehérje affinitás kromatográfiás tisztítása Strep-Tactin® spin-column-on.

A Strep-p54 C-terminális fehérjét daughterless-Gal4 driver irányítása alatt termelő lárvákból készített mintát affinitás-tisztítottuk Strep-Tactin affinitás kromatográfiás centrifugálható csövecskében, majd a teljes extraktumot (T), az oszlopon átfolyó (Átf), a mosó (M1, M2, M3, M4) frakciókat és az oszlopról 2mM D-biotinnal eluált frakciókat immunoblot technikával vizsgáltuk tovább a p54 alegységre specifikus mAb 170 segítségével.

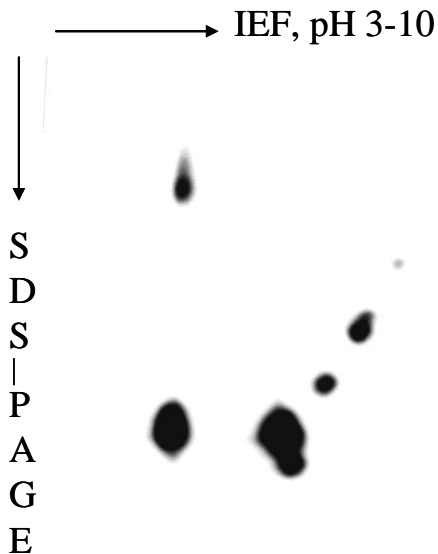
Mivel, mint láttuk a p54 alegység C-terminális fele nem képes beépülni a proteaszómába, ezért a p54 alegység ingázó ciklusa ezen fél p54 darab esetében nem tud végbemenni, a fehérje proteaszómán kívüli állapota stabilizálódik, így alkalmas az alegység extraproteaszómális szerepének vizsgálatára. Ezért a következő kísérletekhez a p54 fehérje C-terminális felét taggel rendelkező formában expresszálo különféle törzseket használtuk.

Elsőként Strep-Tactin[®] MacroPrep[®] affinitás kromatográfiát végeztünk a Strep-taggel ellátott C-terminális fehérjét a daughterless-Gal4 általános driver irányítása alatt expresszálo lárvákból.

A 24. ábrán látható, hogy a teljes extraktumban (T) csak az endogén p54 és a C-terminális p54 reagált a p54 alegységre specifikus monoklonális ellenanyaggal. A rekombináns fehérje az endogén fehérjénél magasabb szinten expresszáلودik. Az affinitás tisztítás után az endogén p54-et nem tudtuk kimutatni az eluált frakciókban, hiszen Strep-tag hiányában nem kötődik az oszlophoz, ugyanakkor azt találtuk, hogy a C-terminális p54 fehérjét expresszálo törzsek eluátumaiban számos magasabb molekulatömegű p54 származék dúsul fel, mely formák a teljes extraktumban nem megfigyelhetőek, mert viszonylag kis mennyiségben vannak jelen, és csak az affinitás tisztítás után válnak jól láthatóvá. Ezek a magasabb molekulatömegű formák a p54 C-terminális fehérje poszttranszlatív módon módosított formáinak felelnek meg, és a driverrel nem meghajtott kontroll törzsek Strep-Tactin MacroPrep affinitás kromatográfia eluátumaiban, hasonlóan a C-terminális fragmentumhoz, ezek a formák sem figyelhetőek meg. Úgy gondoljuk, hogy a poszttranszlatív módon módosított formák jelenléte megmagyarázhatja a túltermelt C-terminális p54 által okozott letalitást, ezért a továbbiakban ezen módosított p54 származékok meghatározására összpontosítottunk. A Strep-Tactin affinitás kromatográfia eluátumai azonban túl szennyezettnek bizonyultak, tapasztalataink szerint ugyanis az affinitás oszlopok rendkívül sok fehérjét képesek aspecifikusan megkötni. Ezért különböző módszereket próbáltunk ki az aspecifikus kötés csökkentésére, mint pl. az elúciót megelőző lépésben az oszlop 0,1%-os tritonnal; 0,5 M guanidin-hidrokloriddal; 2% N-lauril-szarkozinnal vagy 1 M-os, illetve 4 M-os NaCl-dal, történő mosása. Összehasonlítva az immunoblotot és a festett géleket a guanidines mosás tűnt a legmegfelelőbb módszernek, mert viszonylag tiszta preparátumot adott, viszont a p54 C-terminális fehérjének, és a magasabb molekulatömegű származékainak az oszlophoz kötődését nem zavarta meg. A Strep-taggel rendelkező p54 C-terminális fehérjét termelő törzsekkel végzett Strep-affinitás kromatográfia

eluátumait SDS-poliakrilmaid gélen megfuttatva, majd megfestve, a megfelelő fehérjecsíkokat kivágtuk és tömegspektrometriai analízisnek vetettük alá. Több érdekes eredményt is kaptunk, többek között különböző fehérjék ubikvitinált formáit, de sajnos kiderült, hogy még ez a módszer sem eredményezett megfelelően tiszta preparátumot ahhoz, hogy a módosított p54-származékokat azonosíthassuk. Ezért a továbbiakban az affinitás kromatográfiák eluátumait kétdimenziós gélelektroforézissel választottuk el. Ennek során az első dimenzióban egy izoelektromos fókuszálási lépést alkalmaztunk, mely a fehérjéket izoelektromos pontjuk alapján szeparálja, míg a második dimenzióban hagyományos SDS-PAGE-t. Ennek a módszernek az előnye, hogy kihasználhattuk a C-terminális p54 fehérje és módosított származékainak extrém savas izoelektromos pontját, így jóval nagyobb felbontást és a tömegspektrometriai vizsgálatokhoz tisztább preparátumokat nyerhettünk.

A Strep-p54 C-terminális fehérjét hőindukálható módon termelő egy napos felnőtt állatokat 3 napon keresztül hősokkoltuk 30 °C-on, hogy ezáltal idézzük elő a rekombináns fehérje termelődését. Ezután a muslicákat feltártuk, majd Strep-Tactin MacroPrep kromatográfiát követően immunoblot technikával a p54 alegységre specifikus mAb segítségével azonosítottuk a C-terminális p54-et és módosított formáit tartalmazó csúcsfrakciókat. Ezeket a frakciókat összeöntöttük és ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit-tel kicsaptuk, majd 3-10 pH-jú, erősen kaotróp izoelektromos fókuszáló pufferben vettük fel. A mintát két párhuzamos gélen futtattuk, az egyik gélt immunoblot technikával vizsgáltuk tovább a p54 fehérjére specifikus mAb segítségével (25. ábra), a másikat pedig a tömegspektrometriai vizsgálatokkal kompatibilis ezüst-festési módszerrel megfestettük.



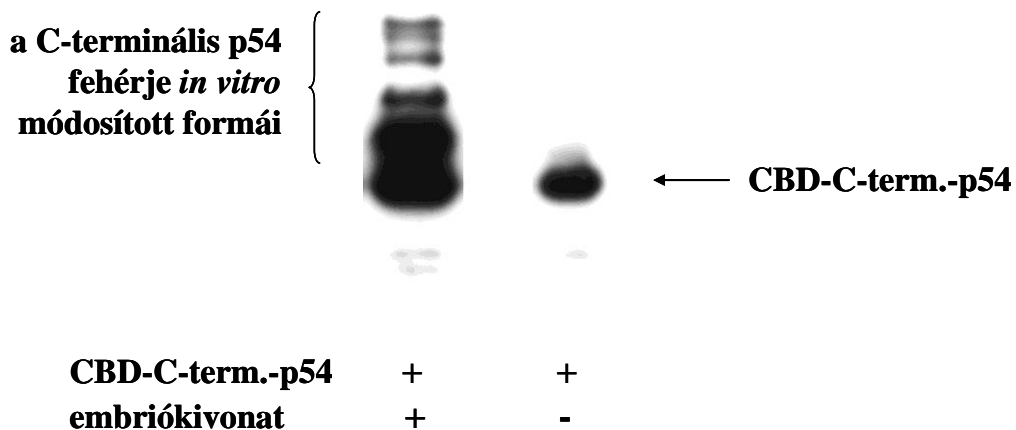
25. ábra: A Strep-C-terminális p54 fehérje és poszttranszlációsán módosított származékai 2-D gélelektroforézissel elválasztva és immunoblot technikával vizsgálva.

A 3/4 7SC hősokkal indukálható törzsbe tartozó felnőtt állatokat 3 napig hősokkoltuk, majd a Strep-taggal ellátott p54 C-terminális fehérjét és annak poszttranszlációsán módosított származékait Strep-Tactin® MacroPrep® kromatográfiával kitisztítottuk. A kromatográfia csúcsfrakcióit tovább tisztítottuk ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit (Bio-Rad) segítségével, majd kétdimenziós gélelektroforézisnek vetettük alá. Az első dimenzióban izoelektromos fókuszálással, izoelektromos pontjuk alapján választottuk el a fehérjéket pH 3-10-ig, a második dimenzióban pedig molekulatömegük alapján SDS-PAGE-sel. Az elválasztott fehérjéket immunoblot technikával vizsgáltuk tovább, a p54 alegységre specifikus mAb 170 segítségével.

A festett gélen az immunoblot alapján azonosítottuk a p54 immunoreaktív foltokat, melyek a C-terminális p54-nek és módosított származékainak felelnek meg. Ezeket a foltokat kivágtuk és MALDI-TOF tömegspektrometriai analízisnek vetettük alá.

Ezekkel a kísérletekkel párhuzamosan megpróbálkoztunk *in vitro* a C-terminális p54 fehérje módosított formáinak kialakítására. Ehhez *E. coli*-ban termeltetett kitin-kötő domén (CBD) – p54 C-terminális fehérjét használtunk. A rekombináns fehérjét kitin gyöngyökön megkötöttük, majd a nem kötődött fehérjéket az oszlopról lemostuk. Ezután a kitin gyöngyökön immobilizált C-terminális p54 fehérjét 2 órán keresztül, szobahőmérsékleten inkubáltuk *Drosophila* embriókból készített kivonattal vagy anélkül. A gyöngyöket ezután mostuk, majd a gyöngyökhöz kötődött fehérjéket 1% SDS tartalmú pufferrel eluáltuk. A 26.

ábrán látható, hogy a rekombináns fehérje 2 órán keresztül embrió extraktummal történő inkubációja során az összes *in vivo* megfigyelhető poszt-szintetikusán módosított forma *in vitro* is kialakult.



26. ábra: A rekombináns kitin-kötő domén (CBD, chitin binding domain) -C-terminális p54 fehérje *in vitro* módosítása.

E. coli-ban termelt rekombináns CBD-p54 C-terminális fehérjét kitin gyöngyökön immobilizáltunk. A gyöngyöket mostuk proteaszóma pufferrel, majd 2 órán keresztül szobahőmérsékleten *Drosophila* embriókból készült extraktummal vagy a nélkül inkubáltuk. Ezután erőteljes mosás után az oszlophoz kötődő frakciókat 1% SDS-t tartalmazó proteaszóma pufferrel eluáltuk, majd az eluátumokat immunoblot technikával vizsgáltuk tovább a p54 alegységre specifikus mAb 170 segítségével.

A 26. ábrán bemutatott immunoblot első zsebében látható, kitin oszlopról eluált p54 származékokat a felfebb leírt módon kétdimenziós gélelektroforézisnek vetettük alá, azzal a különbséggel, hogy az izoelektromos fókuszálási lépéshez egy szűkebb és nem lineáris pH grádiens (pH 3-6,5NL) alkalmaztunk. A p54 immunoreaktív foltokat az ezüst festett gélen azonosítottuk, kivágtuk, és szintén MALDI-TOF MS vizsgálatnak vetettük alá.

A tömegspektrometriai vizsgálatok mind az *in vitro* mind az *in vivo* mintákból jelenleg is folynak. Eddig a két alacsonyabb molekulatömegű foltból a p54 fehérjét sikerült kimutatni, a magasabb molekulatömegű foltokból a p54 fehérje mellett az ubikvitint is, ami arra utal, hogy az immunoblotokon megfigyelt posztszintetikus módosításoknak legalább egy része nagy valószínűséggel ubikvitináció. Ennek egyértelmű bizonyításához azonban még további vizsgálatok szükségesek.

Az eredmények összefoglalása

In vitro a feleslegben adott Zn^{2+} , illetve a Zn^{2+} elvonásának a *Drosophila* 26S proteaszómára gyakorolt hatásának vizsgálata során azt találtuk, hogy a *Drosophila* 26S proteaszóma Zn^{2+} jelenlétében RP és CP alkompexumokra válik szét, a p54 alegység pedig leválik a proteaszómáról. A p54 disszociációja intenzív átrendeződéseket eredményez a fedél alkompexumban és a 26S proteaszóma peptidáz aktivitásának elvesztéséhez vezet. A Zn^{2+} -indukálta strukturális és funkcionális változások teljes mértékben reverzibilisnek bizonyultak. A Zn^{2+} eltávolítását követően a p54 visszaépül a RP-ba, a 26S proteaszóma újra összeszerelődik és visszanyeri peptidáz aktivitását. A p54 Zn^{2+} -indukálta disszociációját követően kölcsönhat egy sor fehérjével, többek között a Hsp82-vel, mely fehérjének szerepét a 26S proteaszóma újra összeszerelődésében bizonyítottuk. A proteaszómából disszociált p54 kölcsönható partnerei között a Hsp82 hő sokkfehérjén kívül az Smt3 SUMO-aktiváló enzimet is sikerült azonosítanunk. Élesztő két-hibrid technikával *in vivo* is bizonyítottuk a p54-nek az Smt3 SUMO-aktiváló enzimmel kialakított kölcsönhatását. E kölcsönhatás funkcionális jelentőségét tovább erősíti azon megfigyelésünk is, hogy a p54 alegység a DmUbc9 SUMO-konjugáló enzimmel is kölcsönhatását alakítja ki *in vivo*.

A p54 ciklikus változásának *in vivo* tanulmányozására transzgenikus *Drosophila melanogaster* törzseket hoztunk létre, melyek a teljes hosszúságú p54 fehérjét vagy annak C- illetve N-terminális felét termelik affinitás címkével (Strep-tag) jelölt, illetve a nélküli formában. Azok a *Drosophila* törzsek, melyek a teljes hosszúságú p54-et vagy a p54 N-terminális felét embrionális kortól kezdve, minden szövetben expresszálták, nem mutattak

fenotipikus változást. Gélszűrési kromatográfiával kimutattuk, hogy az affinitás címkével ellátott teljes hosszúságú és az N-terminális p54 darab képes beépülni a proteaszómaiba.

Ezzel szemben minden olyan transzgénikus állat, mely a p54 C-terminális felét termelte, legkésőbb az L3 lárvastádiumban, valamint az affinitás címkével jelölt formát expresszáló törzsek esetében legkésőbb bábállapotban elpusztult. A C-terminális p54-et termelő mutáns lárvák esetén azt találtuk, hogy a kontroll törzshöz képest kisebb az agyuk és az imágó korongjaik, mely fenotípus gátolt proteaszóma funkcióra utal.

A Strep-címkével ellátott C-terminális p54 fehérjét expresszáló lárvákból készült mintákból Strep-affinitás kromatográfiás tisztítást végeztünk. Kísérleteink során azt találtuk, hogy a C-terminális p54 fehérjét expresszáló törzsek eluátumaiban számos magasabb molekulatömegű p54 származék dúsul fel, melyek a p54 C-terminális fehérje posztiszintetikusán módosított formáinak jelenlétére utaltak. Ugyanakkor a p54 fehérje C-terminális felének kitin-kötő doménnel fuzionált formájának segítségével *in vitro* is kialakítottuk a p54 fehérje módosított formáit. MALDI-TOF tömegspektrometriával mind az *in vivo*, mind az *in vitro* mintákból kimutattuk, hogy a posztiszintetikusán módosított formák a p54 fehérje ubikvitinált formáinak felelnek meg.

Az eredmények tárgyalása

A Zn^{2+} egy, a proteaszóma sokkal általánosabb és sokrétűbb effektorának tűnik, mint azt korábban gondolták (111, 112). Azon kívül, hogy nélkülözhetetlen szerepe van a multiubikvitinált szubsztrátfehérjék ubikvitin egységeinek lehasításában és a teljes proteolitikus lebontási ciklusban, mi a kísérleteink során azt találtuk, hogy a Zn^{2+} nagyfokú szerkezeti átrendeződéseket és a 26S proteaszóma funkcióját is érintő változásokat képes előidézni *Drosophilában*. Feleslegben adott Zn^{2+} hatására ugyanis a *Drosophila* 26S proteaszóma szétválik RP-ra és CP-ra, mely folyamatot a proteaszóma ubikvitin receptorának, a p54 alegységnek a RP-ból történő kiválása kíséri. A p54 alegység disszociációja fehérje-fehérje kölcsönhatások megváltozását, azaz az alegységek nagymértékű átrendeződését eredményezi a fedél alkomplexumban. Ezzel szemben úgy tűnik, hogy az alap alkomplexumhoz tartozó ATP-áz gyűrű szerkezete fennmarad, kémiai keresztkötéssel detektálható, nagy alegység-átrendeződések nem történnek. A RP disszociációja következtében a proteaszóma peptidáz aktivitása megszűnik.

Eukarióta sejtekben a teljes intracelluláris Zn^{2+} koncentráció körülbelül 200 μM (191), ugyanakkor a sejten belüli szabad Zn^{2+} koncentráció csak nanomoláris nagyságrendű. Ezért felvetődhet a kérdés, vajon van-e *in vivo* relevanciája a dolgozatban bemutatott *in vitro* kísérleteknek, hiszen a Zn^{2+} koncentráció, mely a proteaszóma szerkezeti és működésbeli változásának kiváltásához szükségesek jóval magasabb, mint a szabad intracelluláris Zn^{2+} koncentráció.

A hatás specificitását egyrészt maguk a kísérleti eredményeink támasztják alá, másrészt az egyre gyarapodó hasonló témájú irodalmi adat, valamint saját, éppen ebből a célból megvalósított *in vivo* kísérleteink.

A Zn^{2+} hatás specificitását és fiziológiai relevanciáját alátámasztó megfigyelésünk a Zn^{2+} indukálta strukturális és funkcionális változások reverzibilitása: a Zn^{2+} eltávolítását követően a p54 alegység visszaépül a RP-ba, a 26S proteaszómák újra összeszerelődnek és visszanyerik peptidáz aktivitásukat.

A hatás specificitását bizonyítja az az eredményünk is, miszerint az egyéb tesztelt bivalens kationok nem tudják előidézni ezeket a szerkezeti és működésbeli változásokat.

A sejten belül a Zn^{2+} nagy része specifikus Zn^{2+} transzporterekhez kötött, melyek ezt az esszenciális fémet a különféle biológiai folyamatokhoz szállítják (192, 193). Egy biológiai folyamat beindításához szükséges kritikus Zn^{2+} koncentrációt például lényegesen lecsökkentheti, ha egy specifikus Zn^{2+} transzporter a Zn^{2+} iont megfelelő pozícióban az akceptor molekulához szállítja.

A 26S proteaszóma összeszerelődési és szétválási ciklusa kétféle módon történhet: az ATP-függő ciklus során a p54 fehérje folyamatosan RP-kötött állapotban van, míg a Zn^{2+} ciklus során reverzibilisen ingázik a RP-kötött és szabad állapotok között. Mindkét mechanizmus igényel azonban nem proteaszómális, összeszerelődést elősegítő faktorokat: az összeszerelődés nem történik meg homogenitásig tisztított 26S proteaszóma preparátumok esetében. Az ATP - és a Zn^{2+} - függő ciklusokhoz szükséges faktorok valószínűleg nem teljesen azonosak, mivel a részlegesen tisztított *Drosophila* 26S proteaszóma DEAE-fractogel frakciójában a Zn^{2+} -függő összeszerelődés majdnem teljes, míg az ATP-függő folyamat csak részleges.

Kétféle bizonyítékkal is szolgáltunk arra nézve, hogy a Zn^{2+} jelenlétében kémiai keresztkötéssel azonosított fehérjék és a p54 alegység kölcsönhatásának funkcionális kapcsolata van.

Először is a homogenitásig tisztított 26S proteaszóma preparátumban a Zn^{2+} indukálta strukturális és funkcionális változások nem reverzibilisek, a cink eltávolítása után a proteaszóma nem renaturálódik. A tömegspektrometriával a fő p54 kölcsönható partnerként azonosított Hsp82 fehérje elősegíti a Zn^{2+} - kezelt, homogenitásig tisztított *Drosophila* 26S proteaszóma részleges összeszerelődését. Ezt az eredményünket alátámasztja az az irodalmi adat is, mely szerint az élesztő Hsp90 chaperone-nak, mely a *Drosophila* Hsp82 ortológja, fontos szerepe van az élesztő 26S proteaszóma összeszerelődésében és szerkezeti integritásának fenntartásában: ha egy hőmérsékletérzékeny élesztő mutánsban (Hsp90^{ts}) magas hőmérsékleten történő inkubáció révén inaktíváljuk a Hsp90 fehérjét, a 26S proteaszóma RP-ra és CP-ra válik szét, és elveszíti peptidáz aktivitását (189). A disszociált alkompexumok Hsp90 függő módon szerelődnek össze *in vivo* és *in vitro* egyaránt. Sőt, genetikai interakciót találtak a Hsp90 és számos RP nem ATP-áz alegység között. Ezek közül

a Hsp90 és a p54 közötti genetikai interakció okozta a legerősebb fenotipikus változást. A *Drosophila* Hsp82 fehérje azon képessége, hogy elősegítse a 26S proteaszóma részleges összeszerelődését azt jelzi, hogy az *in vivo* és *in vitro* összeszerelődési mechanizmusok konzerváltak az élesztő és a *Drosophila* között. Eredményeink ugyanakkor azt sugallják, hogy a Hsp82 mellett egyéb összeszerelődési faktor(ok), mint a Hsc70Cb vehet(nek) részt a renaturációs folyamatban, mely a 26S proteaszóma Zn^{2+} kezelést követő tökéletes összeszerelődéséhez szükséges.

Az a megfigyelés, hogy a p54 és az Smt3 SUMO-aktiváló enzim nemcsak *in vitro*, hanem *in vivo* is kölcsönhatást mutatnak, fontos bizonyítéka a kémiai keresztkötési módszerünkkel kapott eredmények funkcionális jelentőségének. Élesztő két-hibrid kísérletünk további bizonyítékot szolgáltatott e kölcsönhatás fiziológiai jelentőségére, mivel kimutatta, hogy nemcsak az Smt3 SUMO-aktiváló enzim, hanem a DmUbc9 SUMO-konjugáló enzim (190) is kölcsönhat *in vivo* a p54 alegységgel. Az Smt3 és a DmUbc9 enzimek katalizálják a fehérje szumoiláció első két lépését. Számos RP alegység szumoilációját kimutatták nemrégiben affinitásisztitást követő tömegspektrometriával (194).

Ahhoz, hogy feltárjuk a 26S proteaszóma *in vitro* megfigyelt Zn^{2+} indukálta változásainak biológiai jelentőségét, természetesen szükséges bebizonyítani, hogy a Zn^{2+} hasonló változásokat idéz elő *in vivo*. Az *in vivo* folyamatban résztvevő Zn^{2+} transzportert és a folyamatot aktiváló szabályozó kaszkádot pedig azonosítani kell. Egy nemrégiben közölt megfigyelés szerint HeLa sejtekben a Zn^{2+} ionofór pirrolidin-ditiokarbamát cink ionokkal történő együttes alkalmazása gátolja számos kulcsfontosságú proteaszómális szubsztrát, mint például a p53 vagy a p21 proteaszóma függő lebontását (195). Ez a felfedezés alátámasztja azt a feltételezésünket, miszerint a Zn^{2+} befolyásolja a proteaszóma működését és az *in vitro* megfigyelt változásokkal megegyező, vagy ahhoz hasonló változásokat idézhet elő *in vivo*.

A multiubikvitinált szubsztrátok felismerésének ingázó modellje szerint a proteaszóma ubikvitin receptora először disszociál a RP-ból, majd megköti a multiubikvitinált szubsztrátfehérjét és a proteaszómához szállítja. A p54 azon képessége, hogy szabályozott módon képes disszociálni a RP-ból és meg tudja kötni a multiubikvitinált fehérjét *in vitro* (196, 134, 127), nagymértékben alátámasztja az ingázó modell helyességét. A szabad p54, mely számos faj frissen készített nyers extraktumában megfigyelhető (134, 197, 198) a multiubikvitin receptor *in vivo* disszociált frakciójának felelhet meg.

Babbitt és munkatársai (197) eredményeink publikálásával egyidőben arról számoltak be, hogy anti-FLAG affinitás kromatográfiával tisztított 26S proteaszómák számos proteaszóma kölcsönható fehérjével (PIPs, proteasome interacting proteins) kölcsönhatásban eluálódtak az oszlopról. ATP jelenlétében a PIP –k leválnak a 26S proteaszómáról, és ezt a folyamatot a 26S proteaszóma RP-ra és CP-ra történő szétválása, valamint az Rpn10 alegység disszociációja kíséri. Azok a 26S proteaszóma partikulumok, melyek nem kapcsolódnak PIP-kezel, azaz épp nem végeznek proteolízist *in vivo*, nem szerelődnek szét ATP jelenlétében. Ugyanakkor ezek a 26S proteaszóma partikulumok ATP hiányában válnak szét RP-ra és CP-ra, de ebben az esetben az Rpn10 alegység stabilan a RP része marad, abból nem válik ki. Ez a kétféle szétválási folyamat nagyon hasonló a mi *in vitro* rendszerünkben megfigyelt szétválási folyamatokhoz. A Zn²⁺ esetleges szerepének kimutatása ebben a folyamatban további bizonyítékkal szolgálhat a cink-hatás alátámasztására.

Transzgénikus *Drosophila melanogaster* törzsekkel végzett *in vivo* kísérleteink azt mutatták, hogy a p54 N-terminális felének és a teljes hosszúságú p54 alegységnek a túltermelése nem okoz fenotipikus változást. Ugyanakkor azt találtuk, hogy a teljes hosszúságú alegység és az N-terminális p54 képes beépülni a RP-ba, míg a C-terminális p54 nem, ami összhangban áll az irodalmi adatokkal, melyek szerint a p54 fehérje N-terminális fele felelős az alegység RP-ba történő beépüléséért (75).

A C-terminális p54 fehérje túltermelése L3 lárvaállapotban bekövetkező letalitást eredményezett. Ezen mutáns lárvák esetében azt találtuk, hogy a kontroll törzshöz képest kisebb az agyuk és az imágó korongjaik, mely fenotípus gátolt proteaszóma funkcióra utal, az előbelük pedig kitágult, mely többek között a gátolt felszívódás vagy perisztaltika következménye lehet.

A Strep-taggal vagy dupla taggal ellátott (Strep-FLAG) p54 C-terminális fehérjét túltermelő transzgénikus *Drosophila* törzsekből készített mintákból végzett Strep-Tactin vagy FLAG affinitás kromatográfiát követő tömegspektrometriai vizsgálatokból, valamint a CBD-p54 rekombináns fehérjével végzett *in vitro* kísérleteket követő tömegspektrometriai vizsgálatokból valószínűsíthető, hogy a C-terminális p54 fehérje (és valószínűleg a teljes hosszúságú is) *Drosophilában* ubikvitinálódik. Ez az eredmény nem meglepő az irodalmi adatok ismeretében, mivel nemrégiben számos 26S proteaszómális alegység ubikvitinációját kimutatták. Egyrészt Ventadour és munkatársai több 20S proteaszóma alegységnek

poliubikvitinált formáit tisztították proteaszóma gátló szerekkel kezelt C2C12 sejtekből (198). Másrészt egy nemrégiben közölt megfigyelés szerint az élesztő p54 fehérje *in vitro* ubikvitinálódik (199). Crosas és munkatársai egy proteaszómához kapcsolódó fehérjét (PIP), a Hul5 nevű ubikvitin ligázt vizsgálták. Kísérleteik során olyan ubikvitin konjugátumokat kerestek, melyek a *hul5Δ* mutánsban hipoubikvitinálódnak. Az ubikvitint hatszor hisztidinnel jelölt formában expresszáztatták, majd a teljes sejt extraktumból nem-denaturáló körülmények között, proteaszóma inhibitor jelenlétében nikkell affinitás kromatográfiával kitisztították az ubikvitin konjugátumokat. Az affinitás kromatográfia eluátumait immunoblot analízissel és tömegspektrometriával vizsgálva azt találták, hogy az Rpn10 alegység többszörösen ubikvitinált. Mind a vad típusú, mind a *hul5Δ* mutánsban ki tudták mutatni az Rpn10 ubikvitinált formáit, de a négy ubikvitin egységnél többet tartalmazó formák mennyisége a *hul5Δ* mutánsban nagymértékben lecsökkent. A Hul5 tehát E4 enzimeként (ubikvitin lánc elongációs faktor) hat az Rpn10 számára. A Hul5 által katalizált ubikvitin lánc hosszabbítás elősegíti az Rpn10 proteaszóma általi lebontását. Elképzelhető tehát, hogy az általunk is megfigyelt, a C-terminális p54 alegységnek a proteaszómán kívül kialakuló alacsony monomerszámú ubikvitinált formái a proteaszómális lebontási útvonal stabilizálódott intermedierejei, melyek az N-terminális fél hiányában nem tudnak beépülni a proteaszómába, így nem tudnak Hul5 függő módon poliubikvitinálódni és a proteaszóma által lebomlani. Ugyan az élesztő Hul5 fehérjének *Drosophila* homológját még nem találták meg, ez nem zárja ki egyéb proteaszóma függő E4 enzimek létezésének lehetőségét ebben a fajban is. Ugyanakkor számos ubikvitin receptor ubikvitinációját kimutatták (200-203). Ezeknek a módosításoknak legtöbb esetben különböző szabályozó szerepet tulajdonítanak. Az ubikvitin konjugáció gyakran blokkolja a receptor funkciót azáltal, hogy a receptor ubikvitin kötő helyét elfoglalja. A p54 fehérje esetében is elképzelhető ilyen szabályozó szerepű ubikvitináció, mely esetleg a multiubikvitinált szubsztrátok megkötését, vagy a proteaszómán kívül bizonyos fehérjékkel történő kölcsönhatását befolyásolhatja. Kísérleteink alapján valószínűsítjük, hogy az ubikvitináción kívül egyéb poszttranszlációs módosítás is kialakulhat a p54 fehérjén a proteaszóma RP-ából történő disszociációját követően. Erre utal a Zn²⁺ hatására a RP-ből disszociált p54 keresztkötési technikával kimutatott kölcsönhatása az Smt3 SUMO-aktiváló enzimmel, illetve az élesztő két hibrid kísérletben és a pull-down kísérletekben kimutatott kölcsönhatása mind az Smt3 SUMO

aktiváló enzimmel és a DmUbc9 SUMO-konjugáló enzimmel. A szumoilált forma meglétét tömegspektrometiával még nem sikerült bizonyítani, de számos adat fellelhető az irodalomban, miszerint a SUMO- és az ubikvitin rendszer kölcsönhat (204, 205), és arra is sok példa van, hogy ugyanaz a fehérje egyaránt szubsztrátja az ubikvitináló és a szumoiláló enzimeknek (206, 207). Az ubikvitináció és szumoiláció történhet ugyanazon a lizin oldalláncon is, ilyenkor a kétféle módosítás egymást kizárja, egymással ellentétes útvonalak felé irányítva a fehérjét (208). Úgy gondoljuk, a módosított p54 formák a fehérje extraproteasómális funkcióiban játszhatnak szerepet. Nem kizárt, hogy a p54 ubikvitinált és szumoilált formáinak egymástól eltérő szerepe van a proteasómán kívül. A különböző módosítások valószínűleg dinamikus egyensúlyban vannak egymással, és a proteasómával történő kapcsolódás során átrendeződnek, esetleg bizonyosak, mint például a szumoiláció megszűnnek, esetleg egyes módosítások eltávolítása feltétele a proteasómába történő visszaépülésnek, mely az N-terminális fél hiányában nem történik meg, így a különböző módosított formák a C-terminális p54 félen stabilizálódnak és ezáltal kimutathatóvá válnak. Ezek a felhalmozódott és stabilizálódott formák okozhatják a C-terminális p54-et túltermelő állapotok esetében a letalitást.

A vad típusú *Drosophila* embriókban nagy mennyiségű, az anya petesejtjéből származó 26S proteasóma található, mely készlet a lárvális fejlődési állapotok során fokozatosan kimerül. A bábállapot első néhány órájában a 26S proteasóma koncentrációja hirtelen megnő: valószínűleg az újonnan szintetizálódott 26S proteasómák szükségesek a lárvális fehérjék lebontásához (135). Így tehát az L3 lárvaállapotra a proteasóma mennyisége drasztikusan lecsökken. A hőszökkel indukálható törzsek esetében azonban megfigyeltük, hogy minél későbbi fejlődési állapotban indítjuk be a transzgen expresszióját, annál későbbre tolódik ki a letalitás. Ha például a C-terminális p54 fehérje termelését a bebábozódást követően, 8 napos kor után indítjuk be, letális fenotípust nem figyelhetünk meg. Ugyanakkor Western blot kísérlettel ezen bábokban és felnőtt állatokban is ki tudtuk mutatni a p54 fehérje C-terminális felének magas fokú expresszióját, és affinitás kromatográfiát követően a C-terminális p54 poszttranszgenetikusan módosított formáit is. Úgy tűnik tehát, hogy ezen fél p54 fehérjének és módosított formáinak az endogén proteasómához viszonyított relatív mennyisége a legfontosabb tényező a letalfázis kialakításában. Ennek egyik oka lehet, hogy a C-terminális fél, mely az ubikvitinált szubsztrátfehérjék megkötéséért felelős, megköti, és ezáltal gátolja

valamely szubsztrát(ok) proteaszómális degradációját, mely(ek) lebontása az L3 lárvaállapot végén a fejlődés továbbhaladása szempontjából eszenciális. Az is elképzelhető, hogy ebben a poszt szintetikus formájában a C-terminális p54 fehérje hozzákapszolódik bizonyos faktorokhoz, melyeket nagy moláris feleslege következtében kitirálhat a proteaszómáról, esetleg elvonhat más fontos celluláris folyamatoktól.

Mindenképpen további vizsgálatok szükségesek tehát, melyek feltárják a p54 ubikvitin receptor alegység extraproteaszómális szerepe(i)t, és melyek közelebb visznek a fehérjének a multiubikvitinált szubsztrát kiválasztás során bekövetkező ingázó ciklusának részletes felderítéséhez.

Irodalomjegyzék

(1)

Regulated protein degradation

Alexander Varshavsky

Trends in Biochemical Sciences Vol. 30 No. 6 June 2005

(2)

The ubiquitin proteolytic system

From the vague idea, through basic mechanisms, and onto human diseases and drug targeting

Aaron Ciechanover

Neurology 2006; 66 (Suppl 1): S7-S19

(3)

A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes.

Ciechanover A, Hod Y, Hershko A. Biochem Biophys Res Commun. 1978 Apr 28;81(4):1100-5.

(4)

Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis.

Hershko, A. et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 1783-1786

(5)

Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown.

Hershko A, Heller H, Elias S, Ciechanover A. J. Biol. Chem. 1983 Jul 10; 258(13):8206-14.

(6)

The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease.

Baumeister, W. et al. (1998) Cell 92, 367-380.

(7)

Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell cycle mutant ts85,

Finley *et al.*, *Cell* **37** (1984), pp. 43–55.

(8)

In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue.

A. Bachmair *et al.*, *Science* **234** (1986), pp. 179–186.

(9)

The degradation signal in a short-lived protein.

A. Bachmair and A. Varshavsky, *Cell* **56** (1989), pp. 1019–1032.

(10)

The yeast DNA repair gene *RAD6* encodes a ubiquitin-conjugating enzyme.
S. Jentsch *et al.*, *Nature* **329** (1987), pp. 131–134.

(11)

The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses.

D. Finley *et al.*, *Cell* **48** (1987), pp. 1035–1046.

(12)

The yeast cell cycle gene *CDC34* encodes a ubiquitin-conjugating enzyme.

M.G. Goebel *et al.*, *Science* **241** (1988), pp. 1331–1335.

(13)

The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis.

D. Finley *et al.*, *Nature* **338** (1989), pp. 394–401.

(14)

A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein.

V. Chau *et al.*, *Science* **243** (1989), pp. 1576–1583.

(15)

In vivo degradation of a transcriptional regulator: the yeast Mat α 2 repressor.

M. Hochstrasser and A. Varshavsky, *Cell* **61** (1990), pp. 697–708.

(16)

Cis–trans recognition and subunit-specific degradation of short-lived proteins.

E.S. Johnson *et al.*, *Nature* **346** (1990), pp. 287–291.

(17)

The recognition component of the N-end rule pathway.

B. Bartel *et al.*, *EMBO J.* **9** (1990), pp. 3179–3189.

(18)

The short-lived Mat α 2 transcriptional regulator is ubiquitinated *in vivo*.

M. Hochstrasser *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88** (1991), pp. 4606–4610.

(19)

The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis.

Voges D, Zwickl P, Baumeister W. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:1015-68.

(20)

Release of a macromolecular protein component from human erythrocyte ghosts.

Harris JR. 1968. *Biochim. Biophys. Acta* 150: 534–7

(21)

Cation-sensitive neutral endopeptidase: isolation and specificity of the bovine pituitary enzyme.

Wilk S, Orlowski M. 1980. *J. Neurochem.* 35: 1172– 82

(22)

A multicatalytical protease complex from pituitary that forms enkephalin and enkephalin containing peptides

Orlowski M. 1981. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101: 814– 22

(23)

Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex.

Wilk S, Orlowski M. 1983. *J. Neurochem.* 40: 842– 49

(24)

The quaternary structure of carp muscle alkaline protease.

Hase J, Kobashi K, Nakai N, Iwata K, Takadera T. 1980. *Biochim. Biophys. Acta* 611: 205– 13

(25)

The 22 S cylinder particles of *Xenopus laevis*. I. Biochemical and electron microscopic characterization.

Kleinschmidt JA, Hügle B, Grund C, Franke WW. 1983. *Eur. J. Cell Biol.* 32: 143– 56

(26)

Purification and characterization of a multicatalytic high-molecular-mass proteinase from rat skeletal muscle.

Dahlmann B, Kuehn L, Rutschmann M, Reinauer H. 1985. *Biochem. J.* 228: 161– 70

(27)

Purification of a liver alkaline protease which degrades oxidatively modified glutamine synthetase. Characterization as a high molecular weight cysteine proteinase.

Rivett AJ. 1985. *J. Biol. Chem.* 260: 12600– 6

(28)

The prosome: an ubiquitous morphologically distinct RNP particle associated with repressed mRNPs and containing specific ScRNA and a characteristic set of proteins.

Schmidt HP, Akhayat O, Martins De Sa C, Puvion F, Koehler K, Scherrer K. 1984. *EMBO J.* 3: 29– 34

(29)

The 19S ring-type particles of *Drosophila*. Cytological and biochemical analysis of their intracellular association and distribution.

Kloetzel PM, Falkenburg PE, Hossli P, Glatzer KH. 1987. *Exp. Cell Res.* 170: 204– 13

(30)

Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome).

Arrigo AP, Tanaka K, Goldberg AL, Welch WJ. 1988. *Nature* 331: 192–94

(31)

Drosophila small cytoplasmic 19S ribonucleoprotein is homologous to the rat multicatalytic proteinase.

Falkenburg PE, Haass C, Kloetzel PM, Niedel B, Kopp F, et al. 1988. *Nature* 331: 190–92

(32)

Identification of a fourth class of proteins linked to the murine major histocompatibility complex.

Monaco JJ, McDevitt HO. 1982. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 3001–5

(33)

The multicatalytic proteinase (prosome) is ubiquitous from eukaryotes to archaebacteria.

Dahlmann B, Kopp F, Kuehn L, Niedel B, Pfeifer G, et al. 1989. *FEBS Lett.* 251: 125–31

(34)

Zwickl P, Goldberg AL, Baumeister W. 1999. In *Proteasomes*, ed. DH Wolf, W Hilt. Austin: Landes Biosci. In press

(35)

The first characterization of a eubacterial proteasome: the 20S complex of Rhodococcus.

Tamura T, Nagy I, Lupas A, Lottspeich F, Cejka Z, et al. 1995. *Curr. Biol.* 5: 766–74

(36)

Proteasomes and other self-compartmentalizing proteases in prokaryotes.

De Mot R, Nagy I, Walz J, Baumeister W. 1999. *Trends Microbiol.* 7: 88–92

(37)

Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease.

Seemüller E, Lupas A, Stock D, Löwe J, Huber R, Baumeister W. 1995. *Science* 268: 579–82

(38)

Proteasomes: destruction as a programme.

Hilt W, Wolf DH. 1996. *Trends Biochem. Sci.* 21: 96–102

(39)

Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution.

Groll M, Ditzel L, Löwe J, Stock D, Bochtler M, et al. 1997. *Nature* 386: 463–71

(40)

The genetics of proteasomes and antigen processing.

Monaco JJ, Nandi D. 1995. *Annu. Rev. Genet.* 29: 729– 54

(41)

Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing.

Pamer E, Cresswell P. 1998. *Annu. Rev. Immunol.* 16: 323– 58

(42)

Duplicated proteasome subunit genes in *Drosophila melanogaster* encoding testes-specific isoforms.

Yuan X, Miller M, Belote JM. 1996. *Genetics* 144: 147– 57

(43)

Electron microscopy and image analysis of the multicatalytic proteinase.

Baumeister W, Dahlmann B, Hegerl R, Kopp F, Kuehn L, Pfeifer G. 1988. *FEBS Lett.* 241: 239– 45

(44)

The three-dimensional structure of proteasomes from *Thermoplasma acidophilum* as determined by electron microscopy using random conical tilting.

Hegerl R, Pfeifer G, Pühler G, Dahlmann B, Baumeister W. 1991. *FEBS Lett.* 283: 117– 21

(45)

Localization of subunits in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum* by immunoelectron microscopy.

Grziwa A, Baumeister W, Dahlmann B, Kopp F. 1991. *FEBS Lett.* 290: 186– 90

(46)

Subunit stoichiometry and three-dimensional arrangement in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum*.

Pühler G, Weinkauff S, Bachmann L, Müller SA, Engel A, et al. 1992. *EMBO J.* 11: 1607– 16

(47)

Proteasomes from *Dictyostelium discoideum*: characterization of structure and function.

Schauer TM, Nesper M, Kehl M, Lottspeich F, Müller-Taubenberger A, et al. 1993. *J. Struct. Biol.* 111: 135– 47

(48)

The three-dimensional structure of proteasomes from *Thermoplasma acidophilum* as determined by electron microscopy using random conical tilting.

Hegerl R, Pfeifer G, Pühler G, Dahlmann B, Baumeister W. 1991. *FEBS Lett.* 283: 117– 21

(49)

Conformational constraints in protein degradation by the 20S proteasome.

Wenzel T, Baumeister W. 1995. *Nat. Struct. Biol.* 2: 199– 204

(50)

A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation.
Brannigan JA, Dodson G, Duggleby HJ, Moody PCE, Smith JL, et al. 1995. *Nature* 378: 416–19

(51)

Catalytic triads and their relatives.
Dodson G, Wlodawer A. 1998. *Trends Biochem. Sci.* 23: 347– 52

(52)

Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution.
Löwe J, Stock D, Jap B, Zwickl P, Baumeister W, Huber R. 1995. *Science* 268: 533– 39

(53)

Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin.
Fenteany G, Standaert RF, Lane WS, Choi S, Corey EJ, Schreiber SL. 1995. *Science* 268: 726– 31

(54)

Covalent modification of the active site threonine of proteasomal beta subunits and the *Escherichia coli* homolog HslV by a new class of inhibitors.
Bogyo M, McMaster JS, Gaczynska M, Tortorella D, Goldberg AL, Ploegh H. 1997. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6629– 34

(55)

Substrate binding and sequence preference of the proteasome revealed by active-site-directed affinity probes.
Bogyo M, Shin S, McMaster JS, Ploegh HL. 1998. *Chem. Biol.* 5: 307– 20

(56)

Active site-directed inhibitors of *Rhodococcus* 20 S proteasome. Kinetics and mechanism.
McCormack T, Baumeister W, Grenier L, Moomaw C, Plamondon L, et al. 1997. *J. Biol. Chem.* 272: 26103– 9

(57)

Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids.
Adams J, Behnke M, Chen SW, Cruikshank AA, Dick LR, et al. 1998. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8: 333– 38

(58)

Inhibition of the chymotrypsin-like activity of the pituitary multicatalytic proteinase complex.
Vinitzky A, Michaud C, Powers JC, Orłowski M. 1992. *Biochemistry* 31: 9421– 28

(59)

Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules.

Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, et al. 1994. *Cell* 78: 761– 71

(60)

Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists.

Lee DH, Goldberg AL. 1998. *Trends Cell Biol.* 8: 397– 403

(61)

PRE2, highly homologous to the human major histocompatibility complex-linked RING10 gene, codes for a yeast proteasome subunit necessary for chymotryptic activity and degradation of ubiquitinated proteins.

Heinemeyer W, Gruhler A, Mohrle V, Mahe Y, Wolf DH. 1993. *J. Biol. Chem.* 268: 5115– 20

(62)

The PRE4 gene codes for a subunit of the yeast proteasome necessary for peptidylglutamyl-peptide-hydrolyzing activity. Mutations link the proteasome to stress- and ubiquitin-dependent proteolysis.

Hilt W, Enenkel C, Gruhler A, Singer T, Wolf DH. 1993. *J. Biol. Chem.* 268: 3479– 86

(63)

Contribution of proteasomal beta-subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants.

Dick TP, Nussbaum AK, Deeg M, Heinemeyer W, Groll M, et al. 1998. *J. Biol. Chem.* 273: 25637– 46

(64)

Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1.

Nussbaum AK, Dick TP, Keilholz W, Schirle M, Stevanovic S, et al. 1998. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 12504– 9

(65)

Range of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomes.

Kisselev AF, Akopian TN, Goldberg AL. 1998. *J. Biol. Chem.* 273: 1982– 89

(66)

Multiple forms of the 20 S multicatalytic and the 26 S ubiquitin/ATP-dependent proteases from rabbit reticulocyte lysate.

Hoffman L, Pratt G, Rechsteiner M. 1992. *J. Biol. Chem.* 267: 22362– 68

(67)

Purification and characterization of a multiprotein component of the *Drosophila* 26 S (1500 kDa) proteolytic complex.

Udvardy A. 1993. *J. Biol. Chem.* 268: 9055– 62

(68)

Identification, purification, and characterization of a high molecular weight, ATP-dependent activator (PA700) of the 20 S proteasome.

Chu-Ping M, Vu JH, Proske RJ, Slaughter CA, DeMartino GN. 1994. *J. Biol. Chem.* 269: 3539– 47

(69)

Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm.

Peters JM, Franke WW, Kleinschmidt JA. 1994. *J. Biol. Chem.* 269: 7709– 18

(70)

Structural features of the 26 S proteasome complex.

Peters JM, Cejka Z, Harris JR, Kleinschmidt JA, Baumeister W. 1993. *J. Mol. Biol.* 234: 932– 37

(71)

Identification, purification, and characterization of a PA700-dependent activator of the proteasome.

DeMartino GN, Proske RJ, Moomaw CR, Strong AA, Song X, et al. 1996. *J. Biol. Chem.* 271: 3112– 18

(72)

PA700, an ATP-dependent activator of the 20 S proteasome, is an ATPase containing multiple members of a nucleotide-binding protein family.

DeMartino GN, Moomaw CR, Zagnitko OP, Proske RJ, Chu-Ping M, et al. 1994. *J. Biol. Chem.* 269: 20878– 84

(73)

Subunits of the regulatory complex of the 26S protease.

Dubiel W, Ferrell K, Rechsteiner M. 1995. *Mol. Biol. Rep.* 21: 27– 34

(74)

Unified nomenclature for subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome regulatory particle.

Finley D, Tanaka K, Mann C, Feldmann H, Hochstrasser M, et al. 1998. *Trends Biochem. Sci.* 23: 244– 45

(75)

A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3.

Glickman MH, Rubin DM, Coux O, Wefes I, Pfeifer G, et al. 1998. *Cell* 94: 615– 23

(76)

Sequence analysis of the AAA protein family.

Beyer A. 1997. *Protein Sci.* 6: 2043– 58

(77)

A 200-amino acid ATPase module in search of a basic function.

Confalonieri F, Duguet M. 1995. *BioEssays* 17: 639– 50

(78)

The evolution of the conserved ATPase domain (CAD): reconstructing the history of an ancient protein module.

Swaffield JC, Purugganan MD. 1997. *J. Mol. Evol.* 45: 549– 63

(79)

The AAA team: related ATPases with diverse functions.

Patel S, Latterich M. 1998. *Trends Cell Biol.* 8: 65– 71

(80)

Assembly of the 26 S complex that degrades proteins ligated to ubiquitin is accompanied by the formation of ATPase activity.

Armon T, Ganoth D, Hershko A. 1990. *J. Biol. Chem.* 265: 20723– 26

(81)

Activation of the multicatalytic protease. The 11 S regulator and 20 S ATPase complexes contain distinct 30-kilodalton subunits.

Hoffman L, Rechsteiner M. 1994. *J. Biol. Chem.* 269: 16890– 95

(82)

The multicatalytic and 26 S proteases.

Rechsteiner M, Hoffman L, Dubiel W. 1993. *J. Biol. Chem.* 268: 6065– 68

(83)

Eubacterial proteasomes.

Lupas A, Zühl F, Tamura T, Wolf S, Nagy I, et al. 1997. *Mol. Biol. Rep.* 24: 125– 31

(84)

Protein translocation channels in the proteasome and other proteases.

Larsen CN, Finley D. 1997. *Cell* 91: 431– 4

(85)

Defective mitosis due to a mutation in the gene for a fission yeast 26S protease subunit.

Gordon C, McGurk G, Dillon P, Rosen C, Hastie ND. 1993. *Nature* 366: 355– 57

(86)

Isolation and characterization of SUG2. A novel ATPase family component of the yeast 26 S proteasome.

Russell SJ, Sathyanarayana UG, Johnston SA. 1996. *J. Biol. Chem.* 271: 32810– 17

(87)

Alterations in a yeast protein resembling HIV Tat-binding protein relieve requirement for an acidic activation domain in GAL4.

Swaffield JC, Bromberg JF, Johnston SA. 1992. *Nature* 357: 698– 700

(88)

S. cerevisiae 26S protease mutants arrest cell division in G2/metaphase.

Ghislain M, Udvardy A, Mann C. 1993. *Nature* 366: 358– 62

(89)

Identification of a set of yeast genes coding for a novel family of putative ATPases with high similarity to constituents of the 26S protease complex.

Schnall R, Mannhaupt G, Stucka R, Tauer R, Ehnle S, et al. 1994. *Yeast* 10: 1141– 55

(90)

The mating-type region of *Schizosaccharomyces pombe* contains an essential gene encoding a protein homologous to human modulators of HIV transactivation.

Michael H, Schmidt H, Fleck O, Gutz H, Liedtke C, et al. 1994. *Gene* 145: 205– 10

(91)

Cloning and expression of a yeast gene encoding a protein with ATPase activity and high identity to the subunit 4 of the human 26 S protease.

Lucero HA, Chojnicki EWT, Mandiyan S, Nelson H, Nelswon N. 1995. *J. Biol. Chem.* 270: 9178– 84

(92)

A proteasome cap subunit required for spindle pole body duplication in yeast.

McDonald HB, Byers B. 1997. *J. Cell Biol.* 137: 539– 53

(93)

Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome.

Rubin DM, Glickman MH, Larsen CN, Dhruvakumar S, Finley D. 1998. *EMBO J.* 17: 4909– 19

(94)

Characteristics of 26 S proteases from fission yeast mutants, which arrest in mitosis.

Seeger M, Gordon C, Ferrell K, Dubiel W. 1996. *J. Mol. Biol.* 263: 423– 31

(95)

The XPB subunit of repair/transcription factor TFIIH directly interacts with SUG1, a subunit of the 26S proteasome and putative transcription factor.

Weeda G, Rossignol M, Fraser RA, Winkler GS, Vermeulen W, et al. 1997. *Nucleic Acids Res.* 25: 2274– 83

(96)

A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II.

Kim YJ, Bjorklund S, Li Y, Sayre MH, Kornberg RD. 1994. *Cell* 77: 599– 608

(97)

A highly conserved ATPase protein as a mediator between acidic activation domains and the TATA-binding protein.

Swaffield JC, Melcher K, Johnston SA. 1995. *Nature* 374: 88– 91

(98)

A cDNA for a protein that interacts with the human immunodeficiency virus Tat transactivator.

Nelbock P, Dillon PJ, Perkins A, Rosen CA. 1990. *Science* 248: 1650– 53

(99)

New human gene encoding a positive modulator of HIV Tat-mediated transactivation.

Shibuya H, Irie K, Ninomiya-Tsuji J, Goebel M, Taniguchi T, Matsumoto K. 1992. *Nature* 357: 700– 2

(100)

Subunit 4 of the 26 S protease is a member of a novel eukaryotic ATPase family.

Dubiel W, Ferrell K, Pratt G, Rechsteiner M. 1992. *J. Biol. Chem.* 267: 22699– 702

(101)

The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B.

Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T. 1994. *Cell* 78: 773– 85

(102)

Resistance to diverse drugs and ultraviolet light conferred by overexpression of a novel human 26 S proteasome subunit.

Spataro V, Toda T, Craig R, Seeger M, Dubiel W, et al. 1997. *J. Biol. Chem.* 272: 30470– 75

(103)

A repetitive sequence in subunits of the 26S proteasome and 20S cyclosome (anaphase-promoting complex).

Lupas A, Baumeister W, Hofmann K. 1997. *Trends Biochem. Sci.* 22: 195– 96

(104)

Identification of ubiquitin-like protein-binding subunits of the 26S proteasome.

Saeki Y, Sone T, Toh-e A, Yokosawa H. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Aug 30;296(4):813-9.

(105)

Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains.

Elsasser S, Gali RR, Schwickart M, Larsen CN, Leggett DS, Muller B, Feng MT, Tubing F, Dittmar GA, Finley D. *Nat Cell Biol.* 2002 Sep;4(9):725-30.

(106)

Homologues of 26S proteasome subunits are regulators of transcription and translation.

Aravind L, Ponting CP. 1998. *Protein Sci.* 7: 1250– 54

(107)

The PCI domain: a common theme in three multiprotein complexes.

Hofmann K, Bucher P. 1998. *Trends Biochem. Sci.* 23: 204– 5

(108)

The COP9 complex is conserved between plants and mammals and is related to the 26S proteasome regulatory complex.

Wei N, Tsuge T, Serino G, Dohmae N, Takio K, et al. 1998. *Curr. Biol.* 8: 919– 22

(109)

Structure of cDNAs encoding human eukaryotic initiation factor 3 subunits. Possible roles in RNA binding and macromolecular assembly.

Asano K, Vornlocher HP, Richter-Cook NJ, Merrick WC, Hinnebusch AG, Hershey JW. 1997. *J. Biol. Chem.* 272: 27042– 52

(110)

JAMM: a metalloprotease-like zinc site in the proteasome and signalosome.

Ambroggio XI, Rees DC, Deshaies RJ *PLoS Biol.* 2004 Jan;2(1):E2.

(111)

Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome.

Verma R, Aravind L, Oania R, McDonald WH, Yates JR 3rd, Koonin EV, Deshaies RJ. *Science.* 2002 Oct 18;298(5593):611-5.

(112)

A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome.

Yao T, Cohen RE. *Nature.* 2002 Sep 26;419(6905):403-7.

(113)

Use of RNA interference and complementation to study the function of the Drosophila and human 26S proteasome subunit S13.

Lundgren J, Masson P, Realini CA, Young P. *Mol Cell Biol.* 2003 Aug;23(15):5320-30.

(114)

Complementary roles for Rpn11 and Ubp6 in deubiquitination and proteolysis by the proteasome.

Guterman A, Glickman MH. *J Biol Chem.* 2004 Jan 16;279(3):1729-38.

(115)

The regulatory complex of *Drosophila melanogaster* 26S proteasomes. Subunit composition and localization of a deubiquitylating enzyme.

Holz H, Kapelari B, Kellermann J, Seemuller E, Sumegi M, Udvardy A, Medalia O, Sperling J, Muller SA, Engel A, Baumeister W. *J Cell Biol.* 2000 Jul 10;150(1):119-30.

(116)

The ubiquitin-conjugation system.

Jentsch S. 1992. *Annu. Rev. Genet.* 26: 179– 207

(117)

Ubiquitin-dependent protein degradation.

Hochstrasser M. 1996. *Annu. Rev. Genet.* 30: 405– 39

(118)

The ubiquitin system.

Varshavsky A. 1997. *Trends Biochem. Sci.* 22: 383– 7

(119)

The ubiquitin system.

Hershko A, Ciechanover A. 1998. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 425– 79

(120)

Multiubiquitin chains linked through lysine 48 are abundant in vivo and are competent intermediates in the ubiquitin proteolytic pathway.

van Nocker S, Vierstra RD. 1993. *J. Biol. Chem.* 268: 24766– 73

(121)

Stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* is strongly correlated with assembly of a novel type of multiubiquitin chain.

Arnason T, Ellison MJ. 1994. *Mol. Cell. Biol.* 14: 7876– 83

(122)

A uniform isopeptide-linked multiubiquitin chain is sufficient to target substrate for degradation in ubiquitin-mediated proteolysis.

Gregori L, Poosch MS, Cousins G, Chau V. 1990. *J. Biol. Chem.* 265: 8354– 57

(123)

The N-end rule.

Varshavsky A. 1992. *Cell* 69: 725– 35

(124)

A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination.

Spence J, Sadis S, Haas AL, Finley D. 1995. *Mol. Cell. Biol.* 15: 1265–73

(125)

Quantitative analysis of in vitro ubiquitinated cyclin B1 reveals complex chain topology.

Kirkpatrick DS, Hathaway NA, Hanna J, Elsasser S, Rush J, Finley D, King RW, Gygi SP. *Nat Cell Biol.* 2006 Jul;8(7):700-10.

(126)

A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates.

Deveraux Q, Ustrell V, Pickart C, Rechsteiner M. 1994. *J. Biol. Chem.* 269: 7059–61

(127)

Mapping the ubiquitin-binding domains in the p54 regulatory complex subunit of the *Drosophila* 26S protease.

Haracska L, Udvardy A. 1997. *FEBS Lett.* 412: 331–36

(128)

Multiubiquitin chain binding and protein degradation are mediated by distinct domains within the 26 S proteasome subunit Mcb1.

Fu HY, Sadis S, Rubin DM, Glickman M, van Nocker S, et al. 1998. *J. Biol. Chem.* 273: 1970–81

(129)

Characterization of two polyubiquitin binding sites in the 26 S protease subunit 5a.

Young P, Deveraux Q, Beal RE, Pickart CM, Rechsteiner M. 1998. *J. Biol. Chem.* 273: 5461–67

(130)

Novel regulation of the helix-loop-helix protein Id1 by S5a, a subunit of the 26 S proteasome.

Anand G, Yin XY, Shahidi AK, Grove L, Prochownik EV. 1997. *J. Biol. Chem.* 272: 19140–51

(131)

Purification and characterization of the antisecretory factor: a protein in the central nervous system and in the gut which inhibits intestinal hypersecretion induced by cholera toxin.

Lonnroth I, Lange S. 1986. *Biochim. Biophys. Acta* 883: 138–44

(132)

Molecular cloning and expression of a pituitary gland protein modulating intestinal fluid secretion.

Johansson E, Lonnroth I, Lange S, Jonson I, Jennische E, Lonnroth C. 1995. *J. Biol. Chem.* 270: 20615–20

(133)

ATPase and ubiquitin-binding proteins of the yeast proteasome.

Rubin DM, van Nocker S, Glickman M, Coux O, Wefes I, et al. 1997. *Mol. Biol. Rep.* 24: 17–26

(134)

The multiubiquitin-chain-binding protein Mcb1 is a component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a nonessential, substrate-specific role in protein turnover.

van Nocker S, Sadis S, Rubin DM, Glickman M, Fu H, et al. 1996. *Mol. Cell. Biol.* 16: 6020–28

(135)

Deletion of proteasomal subunit S5a/Rpn10/p54 causes lethality, multiple mitotic defects and overexpression of proteasomal genes in *Drosophila melanogaster*

Szlanka T, Haracska L, Kiss I, Deák P, Kurucz É, Andó I, Virágh E and Udvardy A. *J Cell Sci.* 2003 Mar 15;116(Pt 6):1023-33.

(136)

Developmentally regulated, alternative splicing of Rpn10 gene generates multiple forms of 26S proteasomes

Kawahara H, Kasahara M, Nishiyama A, Saeki Y, Yokosawa H, Shimbara M, Murata S, Chiba T, Suzuki K, Tanaka K. *EMBO*, Vol. 19, No. 15, 4144-4153., 2000

(137)

A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal.

Lam YA, Lawson TG, Velayutham M, Zweier JL, Pickart CM. *Nature.* 2002 Apr 18;416(6882):763-7.

(138)

Transferring substrates to the 26S proteasome.

Hartmann-Petersen R, Seeger M, Gordon C. *Trends Biochem. Sci.* Vol. 28 No. 1 2003 Jan.

(139)

The regulation of proteasome degradation by multi-ubiquitin chain binding proteins.

Miller J, Gordon C. *FEBS Letters* 579 (2005) 3224-3230.

(140)

Delivery of ubiquitinated substrates to protein-unfolding machines.

Elsasser S, Finley D. *Nat Cell Biol.* 2005 Aug;7(8):742-9.

(141)

Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast.

Sun Z-W, Allis C. D. *Nature* Vol. 418, 2002 Jul. 4

(142)

Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling.
Mukhopadhyay D, Riezman H. *Science*. 2007 Jan 12;315(5809):201-5.

(143)

Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery.

Patnaik A, Chau V, Wills JW. *Related Articles, Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Nov 21;97(24):13069-74.

(144)

The 19S regulatory complex of the proteasome functions independently of proteolysis in nucleotide excision repair.

Russell SJ, Reed SH, Huang W, Friedberg EC, Johnston SA. *Mol Cell*. 1999 Jun;3(6):687-95.

(145)

Ubiquitylation and cell signaling.

Haglund K, Dikic I. *Related Articles, EMBO J*. 2005 Oct 5;24(19):3353-9. Epub 2005 Sep 8. Review.

(146)

The proteasome: an utility tool for transcription?

Collins GA, Tansey WP. *Curr Opin Genet Dev*. 2006 Apr;16(2):197-202.

(147)

The 19S regulatory particle of the proteasome is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II.

Ferdous A, Gonzalez F, Sun L, Kodadek T, Johnston SA. *Mol Cell*. 2001 May;7(5):981-91.

(148)

A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems.

Hofmann K, Falquet L. *Trends Biochem. Sci.* (2001) 26, 347-350

(149)

Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains.

C.R. Wilkinson *et al.*, *Nat. Cell Biol.* **3** (2001), pp. 939–943.

(150)

Budding yeast Dsk2p is a polyubiquitin-binding protein that can interact with the proteasome.

M. Funakoshi *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99** (2002), pp. 745–750.

(151)

Recognition of specific ubiquitin conjugates is important for the proteolytic functions of the ubiquitin-associated domain proteins Dsk2 and Rad23.

H. Rao and A. Sastry, *J. Biol. Chem.* **277** (2002), pp. 11691–11695.

(152)

Pleiotropic defects caused by loss of the proteasome-interacting factors Rad23 and Rpn10 of *Saccharomyces cerevisiae*.

Lambertson D, Chen L, Madura K. *Genetics*. 1999 Sep;153(1):69-79.

(153)

Ubiquitin-like proteins and Rpn10 play cooperative roles in ubiquitin-dependent proteolysis.

Saeki Y, Saitoh A, Toh-e A, Yokosawa H. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 May 10;293(3):986-92.

(154)

Rad23 links DNA repair to the ubiquitin/proteasome pathway.

C. Schaubert *et al.*, *Nature* **391** (1998), pp. 715–718.

(155)

Interaction of hHR23 with S5a. The ubiquitin-like domain of hHR23 mediates interaction with S5a subunit of 26 S proteasome.

Hiyama H, Yokoi M, Masutani C, Sugawara K, Maekawa T, Tanaka K, Hoeijmakers JH, Hanaoka F. *J Biol Chem*. 1999 Sep 24;274(39):28019-25.

(156)

The hPLIC proteins may provide a link between the ubiquitination machinery and the proteasome.

M.F. Kleijnen *et al.*, *Mol. Cell* **6** (2000), pp. 409–419.

(157)

Defective excision of pyrimidine dimers and interstrand DNA crosslinks in rad7 and rad23 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.

Miller RD, Prakash L, Prakash S. *Mol Gen Genet*. 1982;188(2):235-9.

(158)

The *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair gene RAD23 encodes a nuclear protein containing an ubiquitin-like domain required for biological function.

Watkins JF, Sung P, Prakash L, Prakash S. *Mol Cell Biol*. 1993 Dec;13(12):7757-65.

(159)

Proteolysis of a nucleotide excision repair protein by the 26 S proteasome.

Lommel L, Ortolan T, Chen L, Madura K, Sweder KS. *Curr Genet*. 2002 Oct;42(1):9-20.

(160)

Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains.

Elsasser S, Gali RR, Schwickart M, Larsen CN, Leggett DS, Muller B, Feng MT, Tubing F, Dittmar GA, Finley D. *Nat Cell Biol*. 2002 Sep;4(9):725-30.

(161)

UBA domains of DNA damage-inducible proteins interact with ubiquitin.
B.L. Bertolaet *et al.*, *Nat. Struct. Biol.* **8** (2001), pp. 417–422.

(162)

Rad23 promotes the targeting of proteolytic substrates to the proteasome.
Chen L, Madura K. *Mol Cell Biol.* 2002 Jul;22(13):4902-13.

(163)

Rad23 and Rpn10 serve as alternative ubiquitin receptors for the proteasome.
Elsasser S, Chandler-Militello D, Muller B, Hanna J, Finley D. *J Biol Chem.* 2004 Jun 25;279(26):26817-22.

(164)

Multiubiquitin Chain Receptors Define a Layer of Substrate Selectivity in the Ubiquitin-Proteasome System
Verma R., Oania R, Graumann J., Deshaies R. J., *Cell*, Vol. 118,99-110, July 9, 2004

(165)

p97, a protein coping with multiple identities.
P.G. Woodman, , *J. Cell Sci.* **116** (2003), pp. 4283–4290.

(166)

Mobilization of processed, membrane-tethered SPT23 transcription factor by CDC48(UFD1/NPL4), a ubiquitin-selective chaperone.
M. Rape, T. Hoppe, I. Gorr, M. Kalocay, H. Richly and S. Jentsch, *Cell* **107** (2001), pp. 667–677.

(167)

Direct binding of ubiquitin conjugates by the mammalian p97 adaptor complexes, p47 and Ufd1–Npl4.
H.H. Meyer, Y. Wang and G. Warren, *EMBO J.* **21** (2002), pp. 5645–5652.

(168)

The Ubx2 and Ubx3 cofactors direct Cdc48 activity to proteolytic and nonproteolytic ubiquitin-dependent processes.
R. Hartmann-Petersen, M. Wallace, K. Hofmann, G. Koch, A.H. Johnsen, K.B. Hendil and C. Gordon, *Curr. Biol.* **14** (2004), pp. 824–828.

(169)

Shp1 and Ubx2 are adaptors of Cdc48 involved in ubiquitin-dependent protein degradation.
C. Schuberth, H. Richly, S. Rumpf and A. Buchberger, *EMBO Rep.* **5** (2004), pp. 818–824.

(170)

Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol.

J.C. Young, V.R. Agashe, K. Siegers and F.U. Hartl, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5** (2004), pp. 781–791.

(171)

Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system.

C. Esser, S. Alberti and J. Hohfeld, *Biochim. Biophys. Acta* **1695** (2004), pp. 171–188.

(172)

The ubiquitin-related BAG-1 provides a link between the molecular chaperones Hsc70/Hsp70 and the proteasome.

J. Luders, J. Demand and J. Hohfeld *J. Biol. Chem.* **275** (2000), pp. 4613–4617.

(173)

p62, a phosphotyrosine-independent ligand of the SH2 domain of p56lck, belongs to a new class of ubiquitin-binding proteins.

R.K. Vadlamudi, I. Joung, J.L. Strominger and J. Shin *J. Biol. Chem.* **271** (1996), pp. 20235–20237.

(174)

Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation.

M.L. Seibenhener, J.R. Babu, T. Geetha, H.C. Wong, N.R. Krishna and M.W. Wooten, *Mol. Cell. Biol.* **24** (2004), pp. 8055–8068.

(175)

Structural and functional studies of mutations affecting the UBA domain of SQSTM1 (p62) which cause Paget's disease of bone.

R. Layfield, B. Ciani, S.H. Ralston, L.J. Hocking, P.W. Sheppard, M.S. Searle and J.R. Cavey *Biochem. Soc. Trans.* **32** (2004), pp. 728–730.

(176)

Solution structure of atypical protein kinase C PB1 domain and its mode of interaction with ZIP/p62 and MEK5,

Y. Hirano, S. Yoshinaga, K. Ogura, M. Yokochi, Y. Noda, H. Sumimoto and F. Inagaki, *J. Biol. Chem.* **279** (2004), pp. 31883–31890.

(177)

The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity.

Braun, B. C.;Glickman, M.;Kraft, R.;Dahlman, B.;Kloetzel, P. M.;Finley, D.; Schmidt, M. *Nat. Cell Biol.* 1999;1:221–226.

(178)

Recognition of misfolding proteins by PA700, the regulatory subcomplex of the 26S proteasome.

Strickland E., Hakala K., Thomas P. J., DeMartino G. N. *J. Biol. Chem.* 2000;275:5565–5572.

(179)

The axial channel of the proteasome core particle is gated by Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release.

Koehler A., Cascio P., Legget D.S., Woo K. M., Goldberg A. L., Finley D. *Mol. Cell.* 2001;7:1143–1152.

(180)

Uch2/Uch37 is the major deubiquitinating enzyme associated with the 26S proteasome in fission yeast.

Stone M, Hartmann-Petersen R, Seeger M, Bech-Otschir D, Wallace M, Gordon C., *J Mol Biol.* 2004 Nov 26;344(3):697-706.

(181)

Complementary roles for Rpn11 and Ubp6 in deubiquitination and proteolysis by the proteasome.

Guterman A, Glickman MH., *J Biol Chem.* 2004 Jan 16;279(3):1729-38. Epub 2003 Oct 27.

(182)

Assembly of the *Drosophila* 26S proteasome is accompanied by extensive subunit rearrangements.

Kurucz, É.; Andó, I.; Sümegi, M.; Hölzl, H.; Kapelari, B.; Baumeister, W.; Udvardy, A. *Biochem. J.* 2002; 365:527–536.

(183)

The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome.

Glickman, M.H.; Rubin, D. M.; Fried, V.; Finley, D. *Mol. Cell. Biol.* 1998;18:3149–3162.

(184)

Metal substitutions and inhibition of thermolysin: spectra of the cobalt enzyme.

Holmquist B., Vallee B. L. *J. Biol. Chem.* 1974; 249:4601–4607.

(185)

The molecular weight and properties of a neutral metallo-endopeptidase from rabbit kidney brush border.

Kerr, M. A.; Kenny, A. J. *Biochem. J.* 1974;137:489–495.

(186)

Inhibition of carboxypeptidase a by excess Zn^{2+} : analysis of the structural determinant by X-ray crystallography.

Gomez-Ortiz M., Gomish-Rüth F. X., Huber R., Avilés F. X. *FEBS Lett.* 1997;400:336–340.

(187)

Multiple forms of the 20S multicatalytic and the 26S ubiquitin/ATP-dependent proteases from rabbit reticulocyte lysate.

Hoffman L., Pratt G., Rechsteiner M. *J. Biol. Chem.* 1992;267:22362–22368.

(188)

The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical application.

Csermely P., Schnaider T., Söti C., Prohászka Z., Nardai G. *A comprehensive review. Pharmacol. Ther.* 1998;79:129–168.

(189)

The molecular chaperone Hsp90 plays a role in the assembly and maintenance of the 26S proteasome.

Imai J., Maruya M., Yashiroda H., Yahara I., Tanaka K. *EMBO J.* 2003;22:3557–3567.

(190)

Cloning and developmental expression of a nuclear ubiquitin-conjugating enzyme (DmUbc9) that interacts with small heat shock proteins in *Drosophila melanogaster*.

Joanisse, D. R.; Inaguma, Y.; Tanguay, R. M. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 1998;244:102–109.

(191)

Cloning and functional characterization of a mammalian Zn²⁺ transporter that confers resistance to Zn²⁺.

Palmiter, R. D. and Findley, S. D. (1995) *EMBOJ.* 14, 639–649

(192)

Zn²⁺ transporter LIVI controls epithelial-mesenchymal transition in zebrafish gastrula organizer.

Yamashita, S., Miyagi, C., Fukada, T., Kagara, N., Che, Y.-S. and Hirano, T. (2004) *Nature (London)* 429, 298–302

(193)

Overview of mammalian Zn²⁺ transporters.

Kambe, T., Yamaguchi-Iwai, Y., Sasaki, R. and Nagao, M. (2004) *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 49–68

(194)

A proteome-wide approach identifies sumoylated substrate proteins in yeast.

Panse, V. G., Hardeland, U., Werner, T., Kuster, B. and Hurt, E. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 41346–41351

(195)

Pyrrolidine dithiocarbamate and Zn²⁺ inhibit proteasome-dependent proteolysis.

Kim I., Kim C. H., Kim J. H., Lee J., Choi J. J., Chen Z. A., Lee G. M., Chung K. C., Hsu C. Y., Ahn Y. S. *Exp. Cell Res.* 2004;298:229–238.

(196)

A 26S protease subunit that binds ubiquitin conjugates.

Deveraux Q., Ustrell V., Pickart C., Rechsteiner M. *J. Biol. Chem.* 1994;269:7059–7061.

(197)

ATP hydrolysis-dependent disassembly of the 26S proteasome is part of the catalytic cycle.

Babbitt, S. E.; Kiss, A.; Deffenbaugh, A. E.; Chang, Y.-H.; Bailly, E.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Buranda, T.; Sklar, L. A.; Baumler, J., et al. *Cell (Cambridge, Mass.)*. 2005;121:553–565.

(198)

A new method of purification of proteasome substrates reveals polyubiquitination of 20 S proteasome subunits.

J Biol Chem. 2007 Feb 23;282(8):5302-9. Epub 2006 Dec 21.

Ventadour S, Jarzaguet M, Wing SS, Chambon C, Combaret L, Bechet D, Attaix D, Taillandier D.

(199)

Ubiquitin Chains Are Remodeled at the Proteasome by Opposing Ubiquitin Ligase and Deubiquitinating Activities

Bernat Crosas, John Hanna, Donald S. Kirkpatrick, Dan Phoebe Zhang, Yoshiko Tone, Nathaniel A. Hathaway, Christa Buecker, David S. Leggett, Marion Schmidt, Randall W. King, Steven P. Gygi and Daniel Finley

Cell, Vol 127, 1401-1413, 29 December 2006

(200)

Identification of HHR23A as a substrate for E6-associated protein-mediated ubiquitination.

Kumar, S., Talis, A., and Howley, P. (1999). *J. Biol. Chem.* 274, 18785-18792.

(201)

A ubiquitin-binding motif required for intramolecular monoubiquitylation, the CUE domain.

Shih, S.C., Prag, G., Francis, S.A., Sutanto, M.A., Hurley, J.H., and Hicke, L. (2003). *EMBO J.* 22, 1273-1281.

(202)

When ubiquitin meets ubiquitin receptors: a signalling connection.

Di Fiore, P.P., Polo, S., and Hofmann, K. (2003). *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 491-497.

(203)

Regulation of ubiquitin-binding proteins by monoubiquitination.

Hoeller, D., Crosetto, N., Blagoev, B., Raiborg, C., Tikkanen, R., Wagner, S., Kowanetz, K., Breitling, R., Mann, M., Stenmark, H. et al. (2006). *Nat. Cell Biol.* 8, 163-169.

(204)

Mutual interactions between the SUMO and ubiquitin systems: a plea of no contest.
Ulrich HD. Trends Cell Biol. 2005 Oct;15(10):525-32. Epub 2005 Aug 25. Review

(205)

Regulation of gross chromosomal rearrangements by ubiquitin and SUMO ligases in *Saccharomyces cerevisiae*.

Motegi A, Kuntz K, Majeed A, Smith S, Myung K., Mol Cell Biol. 2006 Feb;26(4):1424-33

(206)

DNA repair factor XPC is modified by SUMO-1 and ubiquitin following UV irradiation.

Wang QE, Zhu Q, Wani G, El-Mahdy MA, Li J, Wani AA., Nucleic Acids Res. 2005 Jul 19;33(13):4023-34.

(207)

Regulation of the Ets-1 transcription factor by sumoylation and ubiquitylation.

Ji Z, Degerny C, Vintonenko N, Deheuninck J, Foveau B, Leroy C, Coll J, Tulasne D, Baert JL, Fafeur V. Oncogene. 2007 Jan 18;26(3):395-406. Epub 2006 Jul 24.

(208)

Opposing effects of ubiquitin conjugation and SUMO modification of PCNA on replicational bypass of DNA lesions in *Saccharomyces cerevisiae*.

Haracska L, Torres-Ramos CA, Johnson RE, Prakash S, Prakash L., Mol Cell Biol. 2004 May;24(10):4267-74.

(209)

Overview of mammalian zinc transporters

T. Kambe, Y. Yamaguchi-Iwai, R. Sasaki, M. Nagao, CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 61 (2004) 49-68.

(210)

Zinc and health: current status and future directions. Function and mechanism of zinc metalloenzymes.

McCall KA, Huang C, Fierke CA, J. Nutr. 130:1437S-1446S,2000.

(211)

The biochemical basis of zinc physiology.

Vallee B. L., Falchuk K.H., (1993) Physiol. Rev. 73:79-118.

(212)

The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc.

Berg J. M., Shi Y., (1996) Science 271:1081-1085.

(213)

Zinc coordination, function and structure of zinc enzymes and other proteins.

Vallee B. L., Auld D. S., (1990) Biochemistry 29:5647-5659.

(214)

Active zinc binding sites of zinc metalloenzymes.

Vallee B. L., Auld D. S., (1992) *Matrix Suppl.* 1: 5-19.

(215)

Functional zinc-binding motifs in enzymes and DNA-binding proteins.

Vallee B. L., Auld D. S., (1992) *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 93: 47-65.

(216)

Zinc fingers, zinc clusters, and zinc twists in DNA-binding protein domains.

Vallee B. L., Coleman J. E., Auld D. S., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 999-1003.

(217)

Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells.

Beyersmann D., Haase H., (2001) *Biometals* 14: 331-341.

(218)

Human zinc deficiency.

Hambidge M., (2000) *J. Nutr.* 130: 1374S-1377S.

(219)

The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia.

Koh J. Y., Suh S. W., Gwag B. J., He Y. Y., Hsu C. Y., Choi D. W., (1996) *Science* 272: 1013-1016.

Összefoglaló

Az ubikvitin-proteaszóma rendszer felelős az intracelluláris fehérjék szabályozott lebontásáért. A rendszer első komponense az ubikvitinációt végző enzimkaszád, mely felismeri a rövid életidejű fehérjékben megtalálható ún. degradációs szignálokat, és egy multiubikvitin láncot alakít ki rajtuk, kijelölve ezen fehérjéket a lebontásra. A multiubikvitinált fehérjéket a 26S proteaszóma ismeri fel és bontja le, ami a másik fő komponense az ubikvitin-proteaszóma rendszernek. A 26S proteaszóma, ez a nagy multiprotein komplex, egy ATP-függő folyamat során áll össze két alkomplexumból: a katalitikus core partikulumból (CP) és a regulátor partikulumokból (RP). A CP egy nem-specifikus proteáz, ami nem tud különbséget tenni multiubikvitinált és nem ubikvitinált fehérjék között.

A RP-ok, melyek a CP alapjaihoz kapcsolódnak, biztosítják a 26S proteaszóma szelektivitását a multiubikvitinált szubsztrátfehérjék irányába; kitekerik a szubsztrátfehérjéket chaperone-szerű aktivitásuk révén, felnyitják a CP csatornáját, lehasítják a szubsztrátfehérjéken lévő ubikvitin egységeket, és betáplálják a bontásra szánt fehérjéket a CP-ba. A RP-kat feloszthatjuk az alap (base) és a fedél (lid) alkomplexumokra. Az ATP-áz gyűrű, három nem-ATP-áz alegységgel együtt formálja a bázis szubkomplexet, míg a fedél szubkomplex csak nem-ATP-áz alegységekből áll. Egyikük, az Rpn11/p37B fedél alegység, mely egy újszerű Zn^{2+} metalloproteáz domént tartalmaz, felelős a multiubikvitinált szubsztrátfehérjék ubikvitin egységeinek lehasításáért. A Zn^{2+} eltávolítása, illetve az aktív hely cink-koordinációban résztvevő hisztidin aminosavainak mutációja tönkreteszi a deubikvitináló aktivitást és meggátolja a szubsztrátfehérjék lebontását.

A másik fontos szerepet betöltő és egyben vizsgálódásaink tárgyát képező RP alegység, a p54 ubikvitin-kötő alegység, mely képes a multiubikvitinált fehérjék megkötésére. A multiubikvitinált fehérjék felismerése és megkötése a celluláris homeosztázis szempontjából a RP-ok legkritikusabb funkciói közé tartozik. Noha a p54 ubikvitin receptor alegység és egyéb proteaszóma-kölcsönható fehérjék szerepét a szubsztrátfelismerésben igen széles körben tanulmányozták, a p54-nek a multiubikvitinált szubsztrátfelismerésben betöltött szerepében még tisztázásra váró kérdések vannak. A p54 által történő szubsztrátfelismerést ugyanis

kétféleképp képzelhetjük el. Ha feltételezzük, hogy a p54 a RP felszínén exponált pozícióban helyezkedik el, a szubsztrátfelismerés végbemehet az alegység proteaszómához kötött állapotában. Mivel azonban a p54 az egyetlen proteaszóma alegység, mely RP-kötött és szabad formában is megtalálható a legtöbb élőlényben, egy ingázó ciklust is feltételezhetünk a szubsztrátkiválasztás során: e szerint, miután a p54 disszociál, a szabad alegység megköti a multiubikvitinált szubsztrátfehérjét, majd visszakapcsolódik a proteaszómába ezáltal prezentálva a fehérjét lebontásra.

Az a felfedezés, hogy a Zn^{2+} eltávolítása az Rpn11 izopeptidáz doménjéről nemcsak az Rpn11 deubikvitináló aktivitását rontja el, hanem az egész proteaszómális degradációs ciklust felfüggeszti, azt sugallta, hogy a 26S proteaszóma bizonyos funkciója(i) az RP alegységek Zn^{2+} koordinálta kölcsönhatásai révén valósul(nak) meg.

A feltételezett Zn^{2+} -függő alegység-kölcsönhatások tanulmányozására azt a stratégiát választottuk, hogy megvizsgáljuk az exogén Zn^{2+} -nek a RP alegységek kölcsönhatásaira gyakorolt hatását. Ehhez részlegesen tisztított 26S proteaszóma preparátumot inkubáltunk $200\mu M$ Zn^{2+} jelenlétében vagy a nélkül, és elválasztottuk ATP tartalmú natív gélen, mely Zn^{2+} hozzáadásával vagy a nélkül készült. A kontroll minta immunoblot analízise a konvencionális natív poliakrilamid gél mintázatot adta: két 26S proteaszóma sávot, melyek a 26S proteaszóma egy, illetve két regulátor komplexet tartalmazó formáinak felelnek meg, és a szabad CP-ot. Mindkét 26S proteaszóma sáv erős peptidáz aktivitást mutatott a fluorigén peptid gél felülrétegzési kísérletek során. Egészen más mintázatot kaptunk Zn^{2+} jelenlétében. A 26S proteaszóma két formáját nem lehetett megfigyelni, a RP és a CP teljes mennyisége szabad partikulumként volt jelen, és a p54 teljes mértékben disszociált a RP-ről. A gél felülrétegzési kísérlet a peptidáz aktivitás elvesztését mutatta Zn^{2+} jelenlétében.

Zn^{2+} eltávolítás hatására, melyet $200\mu M$ 1,10-fenantrolin hozzáadásával értünk el, a 26S proteaszóma mindkét elektroforetikus variánsa visszaalakult, a p54 visszaépült az újra összeszerelődött proteaszómába, és a 26S proteaszóma visszanyerte peptidáz aktivitását.

A p54 Zn^{2+} -indukálta disszociációját, és a szabad alegységnek nem proteaszómális fehérjékkel történő lehetséges kölcsönhatásait bifunkciós keresztkötőszerrel végzett kísérletekkel vizsgáltuk, a kölcsönható fehérjéket immunprecipitációval tisztítottuk és tömegspektrometriai vizsgálattal azonosítottuk. A proteaszómából disszociált p54

kölcsönható partnerei között a Hsp82 hőszokkfehérjét és az Smt3 SUMO-aktiváló enzimet sikerült azonosítanunk.

A p54 fehérje és az Smt3 SUMO-aktiváló enzim kölcsönhatását élesztő két-hibrid kísérlettel is sikerült alátámasztani. Élesztő két-hibrid technikával a p54-nek az Smt3 SUMO-aktiváló enzimmel kialakított kölcsönhatásán kívül a DmUbc9 SUMO-konjugáló enzimmel történő kölcsönhatását is kimutattuk. Mindkét fehérje, valamint a Hsp82 is kölcsönhatott a p54 fehérjével *in vitro* kötési (pull-down) kísérletekben, mely eredmények nagymértékben alátámasztották tömegspektrometriával kapott adatainkat.

Az exogén Zn^{2+} hozzáadás, majd a Zn^{2+} -elvonás hatásának vizsgálata során tehát azt találtuk, hogy a *Drosophila* 26S proteaszóma Zn^{2+} jelenlétében RP és CP alkomplexumokra disszociál és a p54 alegység leválik a proteaszómáról. A p54 disszociációja intenzív átrendeződéseket eredményez a fedél alkomplexumban és a 26S proteaszóma peptidáz aktivitásának elvesztéséhez vezet. A Zn^{2+} -indukálta strukturális és funkcionális változások teljes mértékben reverzibilisek; a Zn^{2+} eltávolítását követően a p54 visszaépül a RP-ba, a 26S proteaszóma újra összeszerelődik és visszanyeri peptidáz aktivitását. A p54 Zn^{2+} -indukálta disszociációját követően kölcsönhat egy sor fehérjével, többek között a Hsp82-vel. A Hsp82 fehérjének a 26S proteaszóma összeszerelődésében és strukturális integritásának fenntartásában betöltött szerepét ismerve (189) feltételezhetjük, hogy a p54-gyel kölcsönható fehérjéknek szerepe lehet a 26S proteaszóma újra összeszerelődésében. A Zn^{2+} -ciklus során a p54 reverzibilisen ingázik az RP-hoz kötött és szabad állapotok között, mely jelenség nagyban alátámasztja az ingázó modell helyességét.

A p54 ciklikus változásának *in vivo* tanulmányozására transzgenikus *Drosophila melanogaster* törzseket hoztunk létre.

A p54 fehérjének két fontos doménje van: a von Willebrand A típusú domén, ami a fehérje N-terminális felén helyezkedik el, és az UIM domének (ubiquitin interaction motif), melyek a fehérje C-terminális felén helyezkednek el. Irodalmi adatok szerint a fehérje N-terminális fele felelős a p54-nek a RP-ba történő beépüléséért, az UIM domének pedig a multiubikvitinált fehérjék megkötéséért. Arra szeretnénk volna választ kapni, hogy mi ezen domének hatása *in vivo*, azaz mi történik, ha túltermeltetjük őket *Drosophilában*. Ezért olyan transzgenikus *Drosophila* törzseket hoztunk létre, melyek a teljes hosszúságú p54 fehérjét vagy annak C- illetve N-terminális felét termelik. Azok a *Drosophila* törzsek, melyek a p54 N-terminális

felét embrionális kortól kezdve, minden szövetben expresszálták, nem mutattak semmilyen fenotipikus változást, noha a p54 N-terminális fehérje magas szinten termelődött ezekben az állatokban. A p54 N-terminális felét termelő muslicákból gélszűrési kromatográfiával sikerült kimutatni, hogy e fél p54 darab képes beépülni a proteaszómába. Ezzel szemben minden olyan transzgénikus állat, mely a p54 C-terminális felét általános driver irányítása alatt termelte, legkésőbb az L3 lárvastádiumban elpusztult. Ezen állatok esetén is kimutattuk a C-terminális p54 fehérje termelődését, mely embrionális kortól kezdve végig az egyedfejlődés során az N-terminális félhez hasonlóan magas szinten expresszáldott. Ezen mutáns lárvák esetén azt találtuk, hogy a kontroll törzshöz képest kisebb az agyuk és az imágó korongjaik, mely fenotípus gátolt proteaszóma funkcióra utal. A legmeglepőbb fenotípusa azonban ezeknek a lárváknak az előbél kitágulása, mely többek között a gátolt perisztaltika eredménye lehet.

Mivel *in vitro* eredményeink azt mutatták, hogy a proteaszóma RP-ából disszociált p54 kölcsönhat számos nem-proteaszómális fehérjével, melyek közül bizonyosaknak szerepe lehet a p54 proteaszómába történő visszaépülésében, míg másoknak a p54 esetleges poszttranszlációs módosításában, ezért további célul tűztük ki, annak megállapítását, hogy a p54-nek milyen szerepe, sorsa van a proteaszómán kívül és, hogy azonosítsuk kölcsönható partnereit, és esetleges poszttranszlációs módosításait. Annak érdekében, hogy megtaláljuk és azonosítsuk ezeket a fehérjéket, illetve a poszttranszlációsán módosított formákat, létrehoztunk olyan transzgénikus *Drosophila* törzseket is, melyek a p54 különböző formáinak affinitás taggel ellátott változatait expresszálják. E célra az ún. Strep-címkét választottuk, melynek előnye, hogy egy rövid tag, mely gyors, egy lépésben történő tisztítást tesz lehetővé fiziológiai körülmények között.

Transzgénikus *Drosophila* törzsekkel termeltethető módon, Strep-taggel rendelkező formában a következő p54-származékokat állítottuk elő: a teljes hosszúságú p54-et, annak N-terminális felét, C-terminális felét és a teljes hosszúságú p54 fehérjének egy pontmutáns változatát, melyben a 11-es pozícióban lévő aszparaginsavat arginin aminosavra cseréltünk ki (D11R), és amely mutációt hordozó p54 fehérje élesztőben, irodalmi adatok szerint nem képes beépülni a proteaszómába.

Hasonlóan a tag nélküli változatokhoz, az N-terminális, valamint a teljes hosszúságú és a pontmutáns Strep-taggel ellátott p54-et termelő muslicák életképesek, nem mutatnak

fenotipikus változást, míg a Strep-taggal rendelkező C-terminális p54-et termelő törzsek egy része a tag nélküli változathoz hasonlóan késői L3 lárvaállapotig, míg 1-2 törzs bábállapotig élt el. Ez a különbség valószínűleg az expresszió szintjének különbségével magyarázható.

Ezen kívül olyan transzgénikus *Drosophila* törzseket is előállítottunk, melyek a p54 C-terminális fehérje dupla, Strep- illetve FLAG-taggal rendelkező változatát termelik. A dupla taggal ellátott p54 változatot termelő törzsek a tag nélküli és az egyszeres taggal rendelkező változatot termelő törzsekkel ellentétben életképeseknek bizonyultak. Emellett olyan törzseket is létrehoztunk, melyek hőmérséklet-függő módon termelik a Strep-taggal ellátott p54 C-terminális felét.

A Strep-taggal rendelkező törzsek vizsgálata során elsőként Strep-affinitás kromatográfiás tisztítást végeztünk a taggal ellátott C-terminális p54 fehérjét expresszáló, illetve kontroll L3 állapotú lárvákból készült extraktumokból. Azt találtuk, hogy a C-terminális p54 fehérjét expresszáló törzsek eluátumaiban számos magasabb molekulatömegű p54 származék dúsul fel, melyek a p54 C-terminális fehérje poszt-szintetikusán módosított formáinak jelenlétére utaltak. Úgy gondoljuk, ezen formák jelenléte megmagyarázhatja a túltermelt C-terminális p54 által okozott letalitást, ezért a továbbiakban ezen módosított p54 származékok azonosítására összpontosítottunk. A Strep-taggal ellátott p54 C-terminális fehérjét termelő törzsekkel végzett Strep-affinitás kromatográfia eluátumait kétdimenziós gélelektroforézissel vizsgáltuk, mivel az első dimenzióban alkalmazott, a C-terminális p54 fehérje és módosított formáinak extrém savas izoelektromos pontját kihasználó izoelektromos fókuszálási lépés, majd az ezt követő SDS-PAGE megfelelő elválasztást és tisztaságot eredményezett a tömegspektrometriai vizsgálatokhoz.

Sikerült ugyanakkor a p54 fehérje módosított formáit *in vitro* is kialakítani. Ehhez a p54 fehérje C-terminális felének kitin-kötő doménnel fuzionált formáját használtuk, melyet *E. coli*-ban termeltettünk, kitin gyöngyökön immobilizáltunk, és *Drosophila* embriókból készült kivonattal inkubáltunk ATP jelenlétében.

MALDI-TOF tömegspektrometriával mind az *in vivo*, mind az *in vitro* mintákból sikerült kimutatni, hogy a poszt-szintetikusán módosított formák a p54 fehérje ubikvitinált formáinak felelnek meg.

Végső soron azt reméljük, hogy a p54 extraproteasómális sorsának tanulmányozása segíteni fog minket, a p54-nek az ingázó ciklusban és a multiubikvitinált szubsztrátfelismerésben betöltött szerepének megértésében.

Summary

The ubiquitin-proteasome system is responsible for the controlled proteolysis of intracellular proteins. The first component of this system, the ubiquitinating enzyme cascade recognizes the different degradation signals present in short-lived proteins and, by attaching a multiubiquitin chain, marks these proteins for degradation. Multiubiquitinated proteins are recognized and selectively degraded by the 26S proteasome, which is the second main component of the ubiquitin-proteasome system. In an ATP-dependent reaction, this large multiprotein complex is assembled from two subcomplexes: the catalytic core particle (CP) and the regulatory particles (RPs). The CP is a non-specific protease, which cannot discriminate between multiubiquitinated and non-ubiquitinated proteins.

The RPs, which can be split into base and lid subcomplexes, are attached to one or both ends of the CP, ensure the selectivity of the 26S proteasome for multiubiquitinated proteins, unfold the substrate proteins by their chaperone-like activity, open the gated channel of the CP, reprocess the ubiquitin residues of the substrate proteins and feed them into the CP. Six ATPase subunits of the RP, forming a heterohexameric ring, mediate most of these ATP-dependent reactions. The ATPase ring, together with three non-ATPase subunits, forms the base subcomplex, while the lid subcomplex is composed entirely of non-ATPase subunits. One of the lid subunits, Rpn11, in *Drosophila* p37B, which contains a novel Zn²⁺-metalloprotease domain, is responsible for reprocessing the ubiquitin moieties of the multiubiquitinated substrate proteins. The deubiquitinating activity of Rpn11, which is strictly coupled to substrate degradation, is dependent on the unimpaired Zn²⁺-isopeptidase function of the subunit. Removal of Zn²⁺ or mutation of the active site histidines suspends the deubiquitinating activity and stabilizes the substrate proteins.

Another important subunit of the base subcomplex is the p54 protein, which is the ubiquitin receptor of the proteasome. The selective recognition and binding of multiubiquitinated proteins are the primary and, from the aspect of cellular homeostasis, the most critical functions of the RPs. The p54 subunit of the RP fulfills all the criteria of an ubiquitin receptor. Although the cooperation of p54 and other proteasome-interacting proteins in multiubiquitinated substrate recognition has been extensively analyzed, one feature of the mode of action of p54 in the substrate selection still awaits clarification. There are two

alternative scenarios for the mode of substrate selection and binding. If it is assumed that p54 is located on the surface of the regulatory particle in an exposed configuration, substrate selection may proceed in the firmly bound state of this ubiquitin receptor subunit. However, since p54 is the only RP subunit which exists in RP-bound and free forms in most organisms, a shuttling cycle of this subunit may be presumed during substrate selection: following its dissociation, the free subunit recruits multiubiquitinated substrates and, by reassociation with the RP, targets them for destruction.

The idea to examine the effect of Zn^{2+} on the structure and function of the *Drosophila* 26S proteasome came from the discovery that removal of Zn^{2+} from the Zn^{2+} -isopeptidase domain of subunit Rpn11 not only destroys the deubiquitinating activity of this subunit but also suspends the whole proteasomal degradation cycle. This finding suggested to us that certain function(s) of the 26S proteasome might be orchestrated through Zn^{2+} -coordinated interactions of RP subunits.

To examine the presumed Zn^{2+} -dependent subunit interactions our strategy was to test the effect of exogenous Zn^{2+} on the subunit interactions of the RP.

For this purpose a partially-purified 26S proteasome fraction was preincubated with or without 200 μ M $ZnCl_2$ and fractionated on a native polyacrylamide gel containing ATP and prepared with or without Zn^{2+} , respectively. Immunoblot analysis of the control sample revealed the conventional native polyacrylamide gel pattern: the two 26S bands, corresponding to doubly-capped and singly-capped 26S proteasomes, respectively, and the free CP. Both 26S bands exhibited strong peptidase activity in the fluorogenic gel overlay assay. A completely different pattern was obtained in the presence of Zn^{2+} . The two forms of the 26S proteasome were not observed, the total amount of the RP and the CP was present as free particles and all of the p54 subunits dissociated from the RP. Overlay assay revealed the loss of peptidase activity in the presence of Zn^{2+} .

Removal of Zn^{2+} , which was achieved by the addition of 200 μ M 1,10-phenanthroline, revealed that both electrophoretic variants of the 26S proteasome were reformed, subunit p54 was reincorporated into the reassembled 26S proteasome, and the peptidase activity of the 26S proteasomes was restored.

The Zn^{2+} -induced dissociation of subunit p54 and the potential interactions of the free subunit with cellular proteins were examined by cross-linking technique with a bifunctional

protein crosslinker. The cross-linked p54-interacting proteins were purified by immunoprecipitation and analyzed by mass spectrometry. The heat shock protein Hsp82 and the Smt3 SUMO-activating enzyme were identified among the cross-linked partners of the dissociated p54 protein.

We have demonstrated the interaction between the p54 and the Smt3 SUMO-activating enzyme also by the yeast two hybrid technique. Using the same technique the interaction of the p54 protein and the DmUbc9 SUMO-conjugating enzyme has been demonstrated as well. Both proteins and also the Hsp82 interacted with p54 in pull-down assays. These findings further confirmed the physiological relevance of our mass-spectrometry data.

So we have found, that in the presence of high concentration of Zn^{2+} the *Drosophila* 26S proteasome disassembles into regulatory particles and catalytic particle, which process is accompanied by the dissociation of subunit p54 from the proteasome. The disassembly of the RPs and the dissociation of p54 induces extensive rearrangements within the lid subcomplex and resulted in the loss of the peptidase activity of the 26S proteasome. The Zn^{2+} -induced structural and functional changes are fully reversible; removal of Zn^{2+} is followed by reassociation of subunit p54 to the RP, reassembly of the 26S proteasome and resumption of the peptidase activity. Following its Zn^{2+} -induced dissociation, p54 interacts with a set of non-proteasomal proteins. Hsp82 has been identified by mass spectrometry as the main p54-interacting protein. The known role of Hsp82 in the assembly and in the maintenance of the structural integrity of the yeast 26S proteasomes (189) suggested that the p54 interacting proteins may have a role in the reassembly of the 26S proteasomes. During the Zn^{2+} -cycle the p54 subunit reversibly shuttles between the RP-bound and free states which strongly supports the shuttling model during the multiubiquitinated substrate selection.

In order to examine the shuttling cycle of subunit p54 *in vivo* we have established transgenic *Drosophila melanogaster* stocks.

The p54 protein has two important domains: the von Willebrand type A domain located at the N-terminal and the two UIMs (ubiquitin interaction motifs) located at the C-terminal part of the p54 protein. According to the data found in the literature, the N-terminal half of p54 is responsible for the incorporation of p54 into the RP, and the UIM domains are responsible for the recognition of multiubiquitinated proteins. We were interested in the effect of these domains *in vivo*: what happens when we overexpress them and the full-length protein in

Drosophila. To achieve this goal we have established transgenic *Drosophila melanogaster* stocks, which express either the N-terminal or C-terminal half of p54, respectively. Flies expressing the N-terminal half of p54 under the control of one of the general drivers had no phenotypic effects, although these animals expressed the N-terminal half of this protein at high levels. We have demonstrated, by means of gel filtration chromatography that the N-terminal part of p54 is able to incorporate into the proteasome. In contrast with these findings, flies expressing the C-terminal half of subunit p54 under the control of the general drivers died in the L3 larval stage. These animals expressed the C-terminal half of subunit p54 from the early embryonic stage through the whole development also at high levels. Dissection of these mutant larvae revealed to have smaller brain and imaginal discs compared to that of the control stock, a phenotype that reflects on an impaired proteasome function. The most striking phenotype observed with these larvae is the dilatation of the foregut, which among others can be the effect of hindered absorption or peristalsis.

Our *in vitro* data showed that the dissociated p54 protein interacts with cellular proteins, some of which may have a role in the reincorporation of p54 into the proteasome, whereas others may have a role in the posttranslational modification of this protein. Therefore our next aim was to determine the potential postsynthetic modification(s) of the overexpressed transgenes to approach the extraproteasomal roles of p54. For this purpose we have established transgenic *Drosophila melanogaster* stocks, which express affinity tagged forms of subunit p54. We chose the Strep-tag, which is a short tag enabling rapid one-step purification of the protein of interest under physiological conditions. The full-length p54, its N-terminal-or C-terminal halves and a point mutant version of the full-length p54, which was demonstrated in yeast that not to be able to incorporate into the proteasome were expressed in Strep-tagged forms.

Similar to the untagged forms, flies expressing the N-terminal half of p54 protein and also the full-length and the full-length point mutant version are viable and showed no phenotypic effects, whereas some fly stocks expressing the Strep-tagged C-terminal half of p54, similar to those expressing the untagged form, died in the L3 larval stage and some others died in the pupal stage. These differences in the viability can be the effect of the difference in the expression levels between the transgenic stocks. We have also established fly stocks which express doubly-tagged (Strep-FLAG) form of the C-terminal p54 protein. In contrast with the

untagged and the Strep-tagged forms, the flies expressing the doubly tagged form of the C-terminal p54 are viable. We also established fly stocks which express the Strep-tagged C-terminal half of p54 in a heat inducible manner.

We have performed Strep-Tactin affinity purification of the induced Strep-tagged C-terminal half of subunit p54 from larvae and from non-induced control larvae. We have found that several higher molecular weight derivatives of the transgenic protein accumulate in the induced larvae. These accumulated forms, which are posttranslationally modified forms of the p54 protein, are completely absent in the non-induced control strains and are presumably responsible for the lethality. Therefore in the next experiments we concentrated on the identification of these posttranslationally modified forms of p54. The C-terminal half of p54 and its postsynthetically modified derivatives were purified on Strep-Tactin Macroprep column. The eluted fractions were separated by means of a 2-D gel electrophoresis technique by which we could exploit the extreme acidic isoelectric point of the C-terminal half of p54 and its modified forms and could obtain high resolution and a preparation sufficiently pure for the mass-spectrometry analysis.

In parallel with this effort, we reconstituted the modification process *in vitro* using bacterially expressed C-terminal p54-chitin-binding domain fusion protein. The recombinant protein was immobilized on chitin-beads and incubated in the presence of ATP with or without an extract prepared from *Drosophila* embryos.

Preliminary MALDI-TOF mass spectrometry data revealed that the *in vivo* and also the *in vitro* modified forms of the p54 protein are ubiquitinated.

Our final goal is to get closer to the understanding of the role of p54 in the shuttling cycle of multiubiquitinated substrate selection.

Köszönetnyilvánítás

Végül, de nem utolsósorban szeretném köszönetemet kifejezni azoknak az embereknek, akik segítettek és támogattak munkámban és a dolgozat elkészítésében.

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Udvardy Andornak, aki szeretettel és végtelen türelemmel vezetett be a molekuláris biológia és a kutató-lét rejtelmeibe és igyekezett mindig a helyes útra terelni, lelkesedésével és hitével példát mutatni.

Köszönet a rengeteg kísérletért, mely nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

Köszönet illeti Udvardy Katalint, a kísérletek „anyagi” háttérének biztosításáért, a rendre szoktatásért, az állandó segítségnyújtásért és a „gyerekeinek” nyújtott szeretetért.

Köszönet illeti kollégáimat: Szabó Áront, a Strep taggel rendelkező p54 darabokat termelő légytörzsek előállításáért és természetesen baráti és szakmai támogatásáért, Lipinszki Zoltánt a dupla taggel rendelkező C-terminális p54-et termelő légytörzsek előállításáért és a szakmai beszélgetésekért és lelkesedéséért,

Deákné Pál Margitot a légymunkába történő bevezetésért és a folyamatos elméleti, és gyakorlati segítségnyújtásért és tanácsaiért,

Dr. Deák Pétert szintén a légymunkákhoz történő elméleti hozzájárulásáért,

Dr. Ádám Gézát, Dr. Mihály Józsefet és Dr. Komonyi Orbánt, hogy a transzgénikus muslicatörzseiket rendelkezésemre bocsátották.

Dr. Medzihradszky F. Katalinnak, Dr. Hunyadi-Gulyás Évának és Klement Évának a tömegspektrometriai vizsgálatokért tartozom köszönettel.

Nótári Péternének, Icunak a technikai feltételek megteremtését köszönöm.

Ezen kívül köszönettel tartozom családomnak, akik támogatása és szeretete nélkül szintén nem jöhetett volna létre e dolgozat.

PHD DOLGOZAT

Kiss Petra Veronika
2007.