



BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM  
VEGYÉSZMÉRNÖKI ÉS BIOMÉRNÖKI KAR  
ALKALMAZOTT BIOTECHNOLÓGIA ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI TANSZÉK



HUN-REN TERMÉSZETTUDOMÁNYI KUTATÓKÖZPONT  
GENOM METABOLIZMUS KUTATÓCSOPORT

# KOZMA BIANKA

## TDK DOLGOZAT

A dUTPáz fehérje-kölcsönható partnereinek azonosítása és szerepének vizsgálata egér embrió modellben

Konzulens:

*Nagy Nikolett*  
tudományos segédmunkatárs  
HUN-REN TTK

*Tóth Otília*  
PhD hallgató  
BME

Témavezető:

*Prof. Dr. Vértessy G. Beáta*  
egyetemi tanár  
BME

Budapest, 2024.

# Tartalomjegyzék

## Rövidítések jegyzéke

|                                                                                                         |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Bevezetés</b>                                                                                        | <b>1</b>  |
| <b>1. Irodalmi áttekintés</b>                                                                           | <b>3</b>  |
| 1.1. Az uracil hatása a genomi integritásra . . . . .                                                   | 3         |
| 1.2. A dUTPáz enzim élettani jelentősége . . . . .                                                      | 4         |
| 1.3. A timidilát-anyagcsere, mint terápiás célpont . . . . .                                            | 5         |
| 1.4. A mikrotubuláris hálózat szerepe a sejtosztódásban . . . . .                                       | 6         |
| 1.4.1. A mikrotubuláris hálózat felépítése . . . . .                                                    | 6         |
| 1.4.2. Az acetiláció és más poszttranszlációs módosítások szerepe a mikrotubuláris hálózatban . . . . . | 8         |
| 1.4.3. A mikrotubulus-szervező központok . . . . .                                                      | 9         |
| 1.4.4. A mikrotubuláris hálózat a sejtosztódás során . . . . .                                          | 11        |
| 1.5. Az egér embrionális fejlődés korai szakasza . . . . .                                              | 13        |
| 1.5.1. A korai embrió kialakulása . . . . .                                                             | 13        |
| 1.5.2. Az embrionális őssejtek differenciálódása . . . . .                                              | 15        |
| 1.5.3. A módosított mikrotubulusok szerepe a blasztociszta állapot kialakulásáig . . . . .              | 15        |
| 1.5.4. A mitotikus orsó kialakulása korai egér embrióban . . . . .                                      | 17        |
| <b>2. Anyagok és módszerek</b>                                                                          | <b>19</b> |
| 2.1. Immunfluoreszcens festés egér embriókon . . . . .                                                  | 19        |
| 2.1.1. Az immunfluoreszcens festés lépései . . . . .                                                    | 19        |
| 2.1.2. Konfokális mikroszkópia és képfeldolgozás . . . . .                                              | 20        |

|           |                                                                                                                  |           |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2.      | Ko-immunprecipitáció . . . . .                                                                                   | 21        |
| 2.2.1.    | Eukarióta sejtek tenyésztése és fenntartása . . . . .                                                            | 21        |
| 2.2.2.    | Sejtciklus szinkronizálás G <sub>2</sub> fázisban . . . . .                                                      | 21        |
| 2.2.3.    | A ko-immunprecipitáció lépései . . . . .                                                                         | 22        |
| 2.3.      | HPLC-MS/MS alapú proteomika . . . . .                                                                            | 23        |
| 2.3.1.    | Mintaelőkészítés . . . . .                                                                                       | 24        |
| 2.3.2.    | HPLC-MS/MS mérés . . . . .                                                                                       | 25        |
| 2.3.3.    | Adatbázis-keresés . . . . .                                                                                      | 26        |
| <b>3.</b> | <b>Eredmények</b>                                                                                                | <b>27</b> |
| 3.1.      | Immunfluoreszcens festés egér blasztocisztákon a<br>dUTPáz enzim funkciójának feltérképezésére . . . . .         | 27        |
| 3.1.1.    | A dUTPáz enzim blasztomérákon belüli lokalizációja . . . . .                                                     | 27        |
| 3.1.2.    | A dUTPáz enzim és az $\alpha$ -tubulin kolokalizációja . . . . .                                                 | 30        |
| 3.2.      | A dUTPáz enzim mitózisbeli kölcsönható partnereinek azonosítása co-IP<br>kapcsolt LC-MS/MS analízissel . . . . . | 34        |
| <b>4.</b> | <b>Összefoglalás</b>                                                                                             | <b>38</b> |
|           | <b>Irodalomjegyzék</b>                                                                                           | <b>40</b> |

# Rövidítések jegyzéke

**5-FU**, 5-fluorouracil

**ATP**, adenzin-trifoszfát

**BSA**, borjú szérum albumin

**Cdk1**, ciklin-függő kináz 1

**CID**, ütközéses aktiválás

**co-IP**, ko-immunprecipitáció

**DAPI**, 2,4 diamidino-2-fenilindol

**DMEM**, Dulbecco's Modified Eagle Medium

**DNS**, dezoxiribonukleinsav

**DTT**, diklór-difenil-triklóretán

*Dut*, a dUTPáz enzimet kódoló gén egérben

*DUT*, a dUTPáz enzimet kódoló gén emberben

**DUT-N**, a *DUT* gén nukleáris izoformája emberben

**dNMP**, dezoxiribonukleotid-monofoszfát

**dTTP**, dezoitimidin-trifoszfát

**dUMP**, dezoituridin-monofoszfát

**dUTP**, dezoituridin-trifoszfát

**dUTPáz**, dezoituridin-trifoszfát-nukleotido-hidroláz

**FBS**, főtális borjúsérum

**FDR**, hamis felfedezési arány

**FdUMP**, fluorodezoituridin monofoszfát

**FdUR**, fluorodezoituridin

**FA**, hangyasav

**HCT 116**, humán vastagbélkarcinóma sejtvonat

**HPLC**, nagy teljesítményű folyadékkromatográfia

**ICM**, embriócsomó

**IP**, immunprecipitáció

**LC-MS/MS**, folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometria

**M72**, citomegalovírus dUTPáz homológia

**MTOC**, mikrotubulus-szervező központ

**MS**, tömegspektrometria  
**MS/MS**, tandem tömegspektrometria  
**NLS**, nukleáris lokalizációs szignál  
**nDut**, a *Dut* gén nukleáris izoformája egérben  
**PBS**, foszfáttal pufferolt sóoldat  
**PCM**, pericentrioláris anyag  
**PFA**, paraformaldehid  
**PTM**, poszttranszlációs módosítás  
**rNMP**, ribonukleotid-monofoszfát  
**RNS**, ribonukleinsav  
**TE**, trofektoderma  
**TFA**, trifluorecetsav  
**TRiC komplex**, T-complex protein Ring Complex  
**TS**, timidilát-szintáz  
**UDG**, uracil-DNS glikoziláz

# Bevezetés

A DNS, mint az élő szervezetek genetikai információjának hordozója, kulcsszerepet játszik az öröklődésben és a sejtek zavartalan működésének fenntartásában. Éppen ezért a DNS stabilitása és sértetlensége elengedhetetlen a genetikai információ hosszú távú megőrzéséhez, valamint a sikeres sejtosztódás szempontjából. A sejtosztódás során különösen fontos, hogy a genetikai anyag sértetlenül és hibamentesen öröklődjön az utódsejtekbe. Ennek érdekében a sejtekben számos mechanizmus működik a DNS integritásának megőrzésére. Ezek közé tartoznak a DNS-javító mechanizmusok, amelyek feladata a replikáció során keletkező hibák megelőzése és korrigálása. A preventív hibajavításban fontos szerepet játszik a dUTPáz enzim, amely a dUTP hidrolízisét katalizálja, ezáltal megelőzi az uracil timin helyetti hibás beépülését a DNS-be, valamint biztosítja a sejtek számára a dTTP nukleotid *de novo* bioszintézishez szükséges dUMP prekuzort.

Bár a dUTPáz elsődleges feladata az uracil DNS-be történő beépülésének megakadályozása, kutatások azt sugallják, hogy az enzim további fontos funkciókkal is rendelkezhet. Bizonyos biológiai folyamatokhoz, például a B-sejtek differenciációjához vagy a retrovírusokkal szembeni védekezéshez, elengedhetetlen a DNS uracilosodása. Ugyanakkor figyelembe véve, hogy a dUTPáz enzim ezekben a folyamatokban is jelen van, feltételezhető, hogy szerepe túlmutat az ismert dUTP-szint szabályozásán, és szélesebb körű biológiai jelentőséggel bírhat.

Kutatási eredmények rávilágítottak arra, hogy ez a potenciálisan eddig nem ismert funkció a sejtosztódás szabályozásához kapcsolódhat. Humán sejtekben ismert, hogy a dUTPáz a mitózis során foszforilálódik, mely citoplazmás lokalizációt eredményez. Továbbá, a dUTPáz kódoló gén kiütésével végzett kísérletek kimutatták, hogy az enzim hiánya embrionálisan letális a blasztocishta stádiumban egerekben. Legújabb kutatási eredményeink szerint a dUTPáz sejten belüli eloszlása együttes jelenlétet mutat a kromoszómák pontos szegregációját biztosító mitotikus orsó struktúráival, humán sejtvonalakban és egér embrionális fibroblasztokban. Ezen ígéretes eredmények ösztönözték a dolgozat elkészítését, amelynek célja a dUTPáz enzim fiziológiai szerepének feltérképezése, valamint funkciójának mélyebb megértése a mitotikus események lejátszódásában és az embrionális fejlődés során.

# Célkitűzés

Kutatómunkám során a dUTPáz sejtosztódásban betöltött szerepét vizsgáltam. Célul tűztem ki a dUTPáz élettani funkciójának tanulmányozását az embrionális fejlődés során egérmodellben. A kísérletekhez immunfluoreszcens festési eljárást alkalmaztam. A dUTPáz jelölésével céлом volt meghatározni az enzim lokalizációját az embrionális fejlődés során, illetve a különböző sejtípusokban. Ezen felül további kísérletek során a dUTPáz mellett jelöltem a mitózisban fontos szerepet betöltő mikrotubuláris hálózatot is a dUTPáz sejtosztódásban betöltött szerepének vizsgálatára. Munkám során 3,5, 4,5 és 6,5 napos blasztocisza állapotban lévő egér embriókon végeztem el a kísérleteket, és a mintákat fluoreszcens konfokális mikroszkóppal elemeztem. Azt találtam, hogy a dUTPáz a mitózis különböző fázisaiban kolokalizációt mutat a mikrotubuláris hálózattal, ezért céлом volt igazolni a vélhető kölcsönhatást.

A dUTPáz fehérje kölcsönható partnereinek azonosításához humán sejteket alkalmaztam. A kísérletek elvégzéséhez a mitózis fázisában dúsítottam a sejteket szinkronizálással, majd a mintákból ko-immunprecipitációt végeztem a dUTPáz fehérjére specifikus antitesttel. A mintákat előkészítettem LC-MS/MS módszerrel történő vizsgálatra, majd a mérést és az adatok kiértékelését kollaboráció keretein belül végeztem. A kapott eredmények alátámasztották a korábbi megfigyeléseinket.

A kutatómunkám során kapott eredmények a dUTPáz eddig ismeretlen funkcióját vetítik elő mind a sejtosztódás, mind az embrionális fejlődés során.

# 1. fejezet

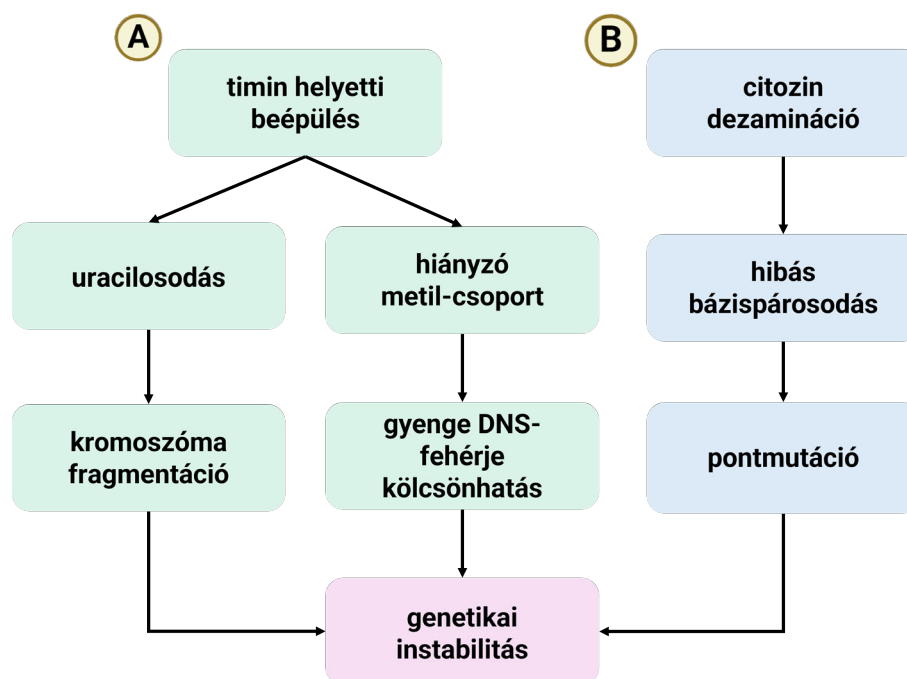
## Irodalomi áttekintés

### 1.1. Az uracil hatása a genomi integritásra

A DNS az élő szervezetek egyik legfontosabb, esszenciális alkotóeleme. Ennek köszönhetően képesek az egyes élőlények a felépítésükhöz, fenntartásukhoz és tulajdonságaik továbbadásához szükséges genetikai információt megfelelő módon megőrizni.

Érthető tehát, hogy az információ ilyen hosszútávú, generációkon keresztül tárolásához egy alapvetően stabil és kevésbé reaktív molekulára van szükség. Ez az egyik oka annak, hogy a DNS, a nukleinsavak másik nagy csoportját alkotó RNS molekulával szemben, nem ribonukleotid-monofoszfátokból (rNMP), hanem 2'-hidroxil csoporttal nem rendelkező dezoxiribonukleotid-monofoszfátokból (dNMP) épül fel. Ezen kémiai stabilitást illető különbség ellenére a DNS és az RNS báziskomponenseinek összetételében csak minimálisan tér el: mindkét makromolekula egyaránt tartalmazhat guanint, adenint és citozint, negyedik bázisként azonban a DNS-re timin, míg az RNS-re uracil jellemző.

Ugyanakkor ismert, hogy uracil bázis helytelenül a DNS-ben is megjelenhet (1.1 ábra). Egyrészt beépülhet dezoxiuridin-trifoszfát (dUTP) a dezoxitimidin-trifoszfát (dTTP) helyett, másrészt megjelenhet citozin dezaminálódása révén is. A dUTP közvetlen beépülése dTTP helyett abból adódik, hogy a replikatív DNS-polimerázok DNS szintézis közben nem képesek különbséget tenni a csupán egyetlen metil-csoportban különböző dUTP és a dTTP között [1]. Mivel mind az uracil, mind a timin adeninnel alkot bázispárt, ez a folyamat önmagában nem mutagén. Mindazonáltal a báziscsere megzavarhat bizonyos DNS-fehérje kölcsönhatásokat [2], valamint ha az ily módon hibásan beépülő uracil mennyisége jelentősen megnövekszik, az kromoszóma fragmentációhoz és sejthalálhoz is vezethet [3, 4].



1.1. ábra. Az uracil DNS-be épülésének lehetséges útvonalai, és azok hatása a genomi integritásra. (A) Az uracil nem mutagén beépülése dTTP helyett, amely a genom uracilosodásához és bizonyos DNS-fehérje kölcsönhatások megzavarásához vezethet. (B) Uracil megjelenése a DNS-ben citozin dezaminálódása révén. Az átmenetileg megjelenő hibás bázis replikáció után stabil pontmutációt eredményezhet.

Ezzel szemben a citozin dezaminációja mutagén folyamat, hiszen az uracil bázispárosítási preferenciája nem egyezik a citozinével. A deamináció következtében átmenetileg beépülő hibás uracil bázis ezáltal replikáció után stabil pontmutációt eredményezhet.

## 1.2. A dUTPáz enzim élettani jelentősége

Belátható tehát, hogy a genom uracilosodásának megelőzésében nélkülözhetetlen a megfelelő nukleotid arány fenntartása, valamint a hibát felismerő és javító folyamatokban résztvevő enzimek precíz működése. Ez utóbbi feladatért a legtöbb organizmusban - úgy mint a prokariótákban, az eukariótákban, valamint számos DNS-vírus és egyes retrovírusok esetében is [1] - két enzimes család felelős: a dezoxiuridin-trifoszfát-nukleotido-hidroláz (dUTPáz), amely megelőzi az uracil timin helyetti beépülését a dUTP hidrolízise által, valamint az uracil-DNS glikoziláz (UDG), amely kivágja az uracilt a DNS-ből, és különböző javítási folyamatokat indít el [5]. A továbbiakban a dolgozat részletesen csak a dUTPáz enzimet tárgyalja.

A dUTPáz enzim elsősorban a dUTP hidrolízisét katalizálja, amely által a sejt számára egyrészt a dTTP nukleotid *de novo* bioszintézishez szükséges dUMP prekursor, valamint szervesen pirofoszfát keletkezik, másrészt ez az enzimreakció felelős a ko-

rábban részletesen tárgyalt létfontosságú sejtes dUTP/dTTP arány alacsony szinten tartásáért [1].

Ezekkel a funkciókkal kapcsolatban nem meglepő tehát, hogy kutatási eredmények alapján a dUTPázok jelenléte esszenciális több modellorganizmusban is [6, 7]. Ezzel szemben azonban azt is kimutatták, hogy a DNS uracilosodása bizonyos biológiai folyamatokban kifejezetten hasznos [8, 9, 10] és tekintve, hogy a dUTPáz enzim ezekben a folyamatokban is jelen van, feltételezhető, hogy a dUTP-szint csökkentésében játszott elsődleges szerepe mellett más sejtfunkciókat is elláthat. Szorosan összefüggve ezzel kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy a dUTPáz kódoló *Dut* gén kiütése egérben embrionális letalitást okoz a blasztocisza állapotban [11], valamint a jelenlegi eredményeink arra utalnak, hogy a dUTPáz enzimnek szerepe lehet a sejtosztódás folyamán.

### 1.3. A timidilát-anyagcsere, mint terápiás célpont

Mindezek mellett érdemes megemlíteni, hogy a dUTP felhalmozódásából és a javítással összefüggő DNS-károsodásból következő sejthalál széleskörben kutatott és alkalmazott kemoterápiás stratégia a timidilát-anyagcsere gátlása által a vastagbélrák, tüdőrák, emlőrák, akut limfoblasztos leukémia, valamint központi idegrendszeri limfóma kezelésére is [12, 13, 14].

Az ilyen típusú terápiák két leggyakrabban alkalmazott szere a fluoropirimidin és az antifolát tartalmú készítmények [4, 15]. A fluoropirimidin kemoterápiás szerek különböző, olyan uracil analógokat tartalmaznak (pl. 5-fluorouracil (5-FU) vagy fluorodezoxiuridin (FdUR)), amelyek timinhez való hasonlóságuk miatt képesek a sejten belülre jutni ugyanazokat az útvonalakat használva, mint a természetes nukleobázis. A transzportot követően az analógok egy sor reakción keresztül fluorodezoxiuridin monofoszfáttá (FdUMP), a gyógyszer aktív hatóanyagává alakulnak. A keletkező FdUMP a timidilát-szintáz enzim (TS) inhibitoraként működik, ezzel korlátozva a dTTP elérhetőségét a DNS-szintézishez. Ezen felül a timidinszintézis antifolátokkal is gátolható. Az antifolát kemoterápiás szerek megszakítják a foláttól függő egy szénatomos metilezési reakciókat, ezáltal erős gátlói különböző folátfüggő enzimeknek, köztük a TS-nek is. Az enzim gátlása pedig ismételten a dTTP kimerüléséhez, valamint a folát újrahasznosítási és purinszintézis útvonalak megszakadásához vezet [13, 16].

Ezen terápiák hatásosságát azonban nagymértékben befolyásolja a szervezet saját hibajavító folyamatai miatt kialakuló gyógyszer-rezisztencia [16, 17, 18]. Tekintve, hogy a dUTPáz elsődleges szerepet játszik az uracil és az 5-FU beépülése elleni mechanizmus-

ban, így gátlása potenciális célponttá teszi rákkezelések során különösen dUTPáz és TS inhibitorok együttes alkalmazásával [4, 19, 20].

Ilyen kiegészítő kezelésnek szánták a kismolekulás TAS-114 gátlószert, a dUTPáz egy erős inhibitorát. Maga a TAS-114 ugyan nem rendelkezik daganattellenes hatással, azonban képes megakadályoznia a dUTP és az FdUTP monofoszfát formává történő átalakulását, ezáltal a kezelés során 5-FU származékokkal kombinálva növelheti az FdUTP mennyiségét és fokozhatja a kemoterápia hatékonyságát [21, 22]. Mindazonáltal bár a készítmény ilyen kombinációban adva a klinikai vizsgálatok során magasabb terápiás válaszarányt és tumorcsökkenést eredményezett több daganattípus esetén, azonban sem a betegek progressziómentes túlélését, sem a teljes túlélést nem javította jelentősen [23, 24].

A DNS hibajavító útvonalak mellett egyre nagyobb figyelem irányul más potenciális kemoterápiás célpontokra is, mint például a mikrotubuláris hálózatra [25, 26]. Sok természetes hatóanyag és azok analógjai (pl. paclitaxel, vindolin) képesek a szabad és/vagy közvetlenül a mikrotubulusokban lévő tubulinhoz kötni. Ezen vegyületek többsége olyan antimitotikus szer, amely a mikrotubulusok szerkezetének polimerizációs dinamikájára hatva gátolja a sejtek proliferációját [27, 28]. Mivel a sejtosztódás kritikus fázisait célozzák meg, így ezek a szerek hozzájárulnak a hatékonyabb kezelési lehetőségekhez és ígéretes alternatívát jelentenek a daganattellenes terápiákban. A gyakorlatban is alkalmazott szerek közé tartozik a Nocodazole, mely a mikrotubulusok polimerizációját gátolja, illetve a Taxol, mely a mikrotubuláris hálózat depolimerizációját gátolja. Mindkét szer feltartóztatja a sejteket a mitózis során, ezzel előidézve a sejtosztódás megakadályozását.

## **1.4. A mikrotubuláris hálózat szerepe a sejtosztódásban**

### *1.4.1. A mikrotubuláris hálózat felépítése*

A prokariótáknál jóval nagyobb és bonyolultabb eukarióta sejtek belső szerkezetét elsősorban a sejtváza biztosítja. Ezt a vázát polimerekből álló vázat jellegzetesen három fő komponens alkotja: az intermedier filamentumok, amelyek mechanikai szilárdságot biztosítanak a sejteknek, az aktin mikrofilamentumok, amelyek az alak fenntartásában, a sejtek letapadásában és mozgásában játszanak szerepet, valamint a továbbiakban részletesebben tárgyalt mikrotubuláris hálózat [29].

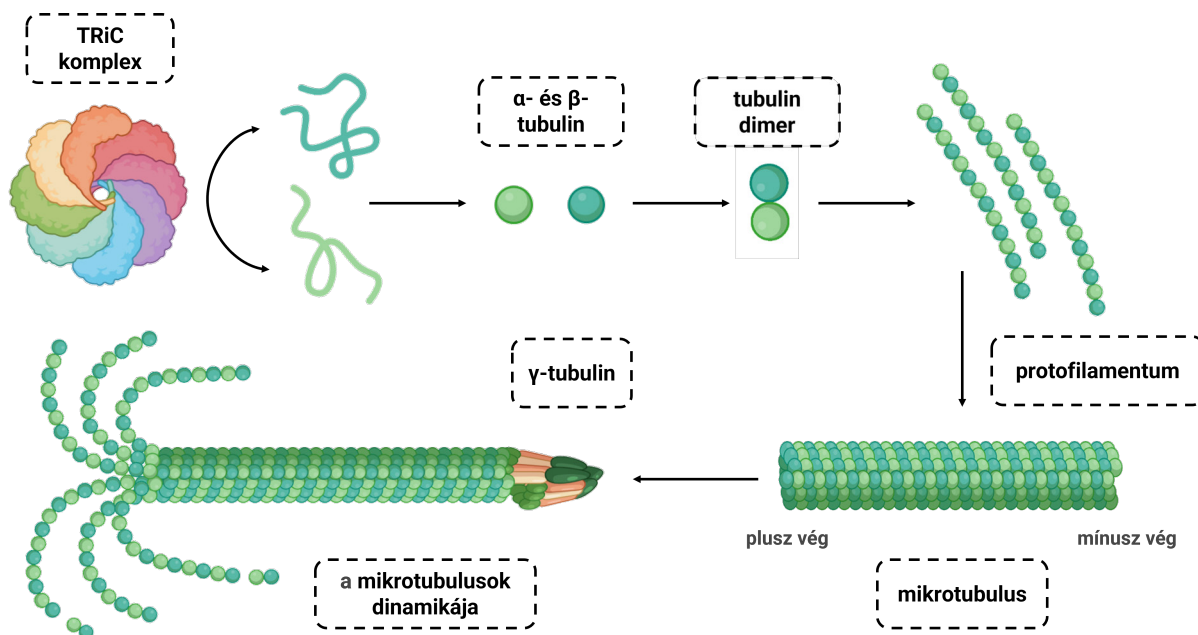
A mikrotubulusok működése és szerkezete igen hasonló minden eukariótában. Egyrészt legfőképpen a sejt belső rendezettségéért felelősek - beleértve a sejtmag és az organellek elhelyezkedését - valamint nélkülözhetetlenek különböző transzportfolyamatokban, a kromoszómák szegregációjában sejtosztódáskor, és a csillók és ostorok

vázának kialakításában is [30]. Másfelől kiemelendő, hogy a sejtváza ezen elemei együttesen óriási hordozófelületet képeznek, amelyhez számos makromolekula, például enzimek is képesek kötődni, és az így kialakult mikrokörnyezet igen optimális az általuk katalizált reakciók számára [31, 32].

Szerkezetét tekintve a mikrotubuláris hálózat alapegysége egy evolúciósan erősen konzervált fehérje, a tubulin, amely egy  $\alpha$ - és  $\beta$ -tubulinból álló heterodimer. A polimerizációs folyamat során a tubulin alegységei között kétféle kapcsolat alakul ki: egyrészt a dimerek "fej-vég" kötődéssel úgynevezett protofilamentumokat hoznak létre, másrészt a protofilamentumok oldalirányból párhuzamosan összekapcsolódva alkotják magát az üreges, de viszonylag merev mikrotubulust (1.2. ábra). Egy ilyen szerkezet jellemzően tíz-tizenöt protofilamentumból áll, ahol az  $\alpha$ -tubulin a mikrotubulus lassabban növekvő (mínusz) végénél, míg a  $\beta$ -tubulin a gyorsabban növekvő (plusz) végnél helyezkedik el [33, 34].

Ahhoz azonban, hogy ez a két alegység dinamikusan össze tudjon kapcsolódni szükség van egy chaperone fehérjére is, az úgynevezett TRiC komplexre (T-complex protein Ring Complex) [35]. Ez az eukarióta chaperon a citoszolikus fehérjék körülbelül 10%-ának, többek között a tubulinnak és az aktinnak segít a natív konformációjuk kialakításában egy ATP-vezérelt konformációs ciklus révén, azonban pontos mechanizmusa a különböző szubsztrátjai esetében nem ismert [35]. Szerkezetét tekintve nyolc különböző, meghatározott sorrendű alegységből áll, amelyek két egymással szemben elhelyezkedő gyűrűt formálnak [36]. A megfelelő energiaszintek kialakításához a gyűrűk egymás után aktiválódnak, és lépésről-lépésre közvetítik a tubulin fehérjék feltekeredését. Ez a lépés mindazonáltal kulcsfontosságú a megfelelő mikrotubuláris hálózat kialakulásához is, hiszen a TRiC komplex segítségével az újonnan szintetizált tubulin monomerek hajlamosak aggregátumokat képezni [37].

Mindezekon kívül az  $\alpha$ - és  $\beta$ -tubulin heterodimerek mellett léteznek olyan nem-mikrotubuláris tubulinok is, amelyek elsődlegesen a mikrotubulus-szervező központokban lokalizálódnak. Ezek közé tartozik a  $\gamma$ -tubulin, amely alapvető szerepet játszik a mikrotubulusok szervezésében [38], valamint a kevésbé ismert  $\delta$ - és  $\epsilon$ -tubulin, amelyek elősegítik a centriólumban lévő mikrotubulus tripletek stabilitását, illetve a ciliák kialakulását (lásd az 1.4.3-es fejezet) [39, 40]. Bár pontos működési mechanizmusuk még nem teljesen tisztázott, ugyanakkor mutációik jelentős károsodást okozhatnak a tubulin-alapú struktúrákban, ami szokatlan mitózist, súlyosabb esetben pedig sejthalált is eredményezhet [41, 42].



1.2. ábra. A mikrotubulusok dinamikus szerkezetének kialakulása.

Számos citoszolikus fehérjéhez hasonlóan az  $\alpha$ - és  $\beta$ -tubulin alegységek natív konformációjának kialakulását is a TRiC komplex segíti. Miután az alegységek megfelelő térszerkezetet öltenek, tubulin heterodimerekké asszociálódnak, majd polimerizálódnak, protofilamentumokat alkotva. Végül mikrotubulusok jellemző szerkezete 10-15 protofilamentum oldalirányú összekapcsolódásával formálódik meg. Az így kialakult mikrotubulus aszimmetrikus szerkezettel rendelkezik: az  $\alpha$ -tubulin a lassabban növekvő (mínusz) végén helyezkedik el, míg a  $\beta$ -tubulin a gyorsabban növekvő (plusz) vég felé orientálódik. Ez az aszimmetria különös jelentőséggel bír: a plusz végén koncentrált tubulin heterodimerek folyamatos asszociációja és disszociációja biztosítja a mikrotubulus dinamikus növekedését vagy rövidülését.

#### 1.4.2. Az acetiláció és más poszttranszlációs módosítások szerepe a mikrotubuláris hálózatban

A mikrotubuláris hálózat összetett működése számos különböző szinten valósul meg, melyek között kiemelt szerepet játszanak a poszttranszlációs módosítások (PTM-ek) [43]. Ezek olyan kémiai módosítások, amelyek szabályozzák a fehérjék aktivitását, lokalizációját és kölcsönhatásait más molekulákkal, lehetővé téve a sejt váz dinamikus átrendeződését a különféle ingerekre adott válaszként. Emellett a PTM-ek nagyfokú komplexitást és heterogenitást biztosítanak egyéb géntermékek számára is, mind minőségi, mind mennyiségi szempontból; lehetővé téve a precíz tér- és időbeli szabályozást a fehérjeaktivitásban [44]. Működési zavaruk számos betegség, így például a mellrák, a cukorbetegség és különféle neurológiai rendellenességek kialakulásában is szerepet játszhatnak, melyek eredete gyakran a korai embrionális fejlődés során fellépő PTM-zavarokhoz vezethető vissza [45, 46, 47].

Általánosságban elmondható, hogy a PTM-ek aminosav oldalláncokon vagy peptidkötéseken történnek, és többnyire enzimatikusan irányított folyamatok [48]. A legismertebb citoskeletális PTM-ek közé tartozik a foszforiláció, a glikoziláció, és az ubiquitiná-

ció; valamint a mikrotubulusokat alkotó tubulinok esetében kiemelkedő szerepet játszó tirozináció/detirozináció, (poli)glutamiláció, (poli)gliciláció és acetiláció [49, 50, 51].

Az említett poszttranszlációs módosítások közül különösen jelentős az acetiláció, amelyet eddig főként az  $\alpha$ - és a  $\beta$ -tubulinon írtak le. Funkcióját tekintve kulcsszerepet játszik a tubulinok módosításában, különösen a sejtosztódás során, amikor az acetilált mikrotubulusok jelentős gazdagodása figyelhető meg a központi mitotikus orsóban és a középtestben [52]. Emellett kölcsönhatásban áll más poszttranszlációs módosításokkal, mint például a foszforilációval vagy az ubiquitinációval, amelyek tovább befolyásolhatják az acetilált fehérjék biológiai funkcióját [53]. Az  $\alpha$ -tubulin acetilációja a már kialakult mikrotubulus polimerek belső felszínén történik. Ezt a poszttranszlációs módosítást először csillók és ostorok belső felépítésében figyelték meg, majd később bizonyos sejttípusok citoplazmás mikrotubulusain és az embrionális fejlődés különböző stádiumaiban is azonosították [54, 55, 56]. Noha az  $\alpha$ -tubulin acetilációja gyakran stabilabb és rugalmasabb mikrotubulusokkal társul, az acetiláció önmagában nem feltétlenül eredményez stabilizációt [57]. Ennek egyik oka lehet, hogy az acetiláció nem idéz elő közvetlen szerkezeti változást a mikrotubulusokban, hanem az azokhoz kapcsolódó fehérjékre gyakorolt hatás révén növeli a stabilitást [58, 59]. A  $\beta$ -tubulin acetilációja főként a nem-polimerizált tubulinon fordul elő, és hatással van a tubulin polimerizációs kinetikájára [60].

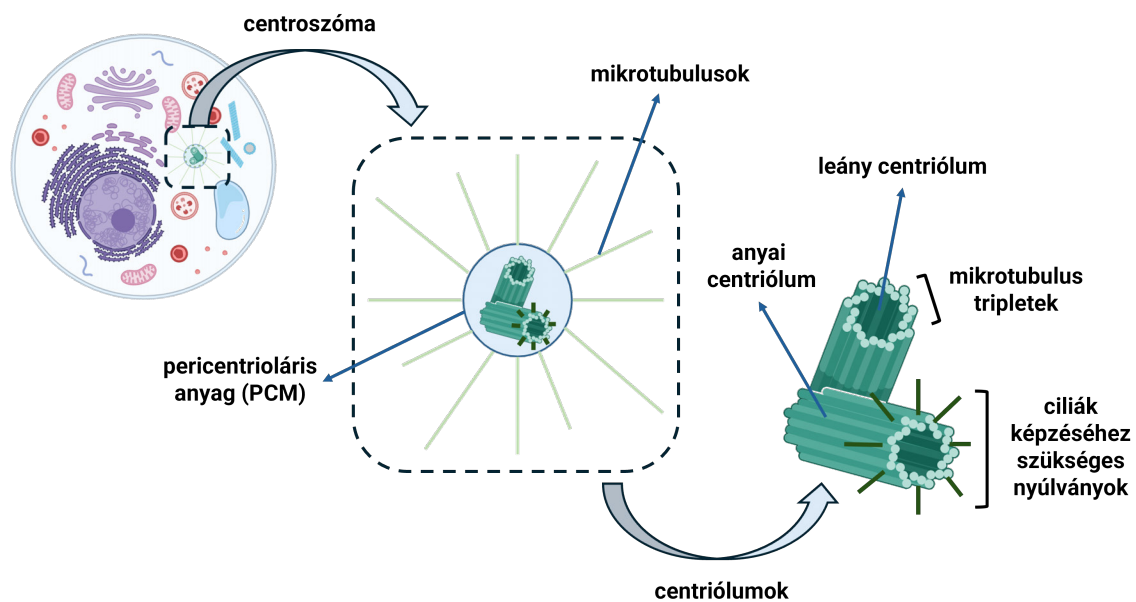
### 1.4.3. A mikrotubulus-szervező központok

A mikrotubulusok térbeli elrendeződését a sejtben elsősorban az úgynevezett mikrotubulus-szervező központok (microtubule-organizing center - MTOC) irányítják [61, 62, 63]. Állati sejtekben a legfontosabb MTOC a centroszóma, amely a sejtmag közelében található, körülbelül 1-1,5  $\mu\text{m}$  átmérőjű organelum [64]. Mivel kívülről nem határolja membrán, így anyaga nem különül el élesen a citoplazmától. Felépítése jellegzetesen két fő részre bontható: a centriólumokra és a körülöttük lévő pericentrioláris anyagra (PCM) (1.3. ábra) [65].

A legtöbb [66], gerinceseknél előforduló sejttípus egyetlen egy vagy két centriólum-párral rendelkezik, melyek kilenc sugarasan elrendezett tubuluscsoportból épülnek fel [67]. Ezek a tubuluscsoportok mindegyike három, poli-glutamilált  $\alpha$ - és  $\beta$ -tubulinból álló mikrotubulusból szerelődik össze [68], és így együttesen egy jellegzetes hengeralakú struktúrát hoznak létre [67]. Bár alapszerkezetüket tekintve nagyon hasonlóak, a centroszóma két centrióluma morfológiailag nem teljesen azonos (1.3. ábra). Az érettebb anyai centriólum, amely már legalább egyszer végighaladt a sejtcikluson, képes a plazmamembránhoz kapcsolódni és egyedülálló nyúlványokat kialakítani, amelyek szerepet játszanak a mikrotubulusok és az úgynevezett ciliák rögzítésében. Ezek a nem

mozgékony csillók kiterjednek az extracelluláris térbe, így a sejt számára mind belső, mind külső jelátviteli központként szolgálnak olyan meghatározó biológiai folyamatokban, mint a sejtek proliferációja, az embrionális neurális cső és a fejlődő végtagok kialakulása vagy a fényérzékelés a retinában [65, 69, 70]. Ezzel szemben az éretlen leány centriólumról, amely még nem ment át teljes sejtcikluson, kezdetben hiányoznak ezek a nyúlványok, így nem képes ciliák képzésére, és kevesebb mikrotubulus kapcsolódik hozzá [71]. A következő sejtciklusban azonban fokozatosan differenciálódik, és funkcionálisan, valamint szerkezetileg is azonos lesz az anyai centriólummal [72].

Mindezek mellett a centriólumok egy másik jelentős funkcióval is rendelkeznek, ugyanis a közel száz azonosított centroszóma fehérje és jelátviteli molekula jelentős hányada a tubuluscsoportoknál és a ciliák környezetében lokalizálódik [73]. Sokuk szerepe a centroszómában még nem teljesen tisztázott, de jól szemléltetik az organelum összetett működését: míg egyes fehérjék állandóan jelen vannak bizonyos sejt folyamatok zavartalan működésének biztosítása érdekében, addig mások átmenetileg toborzódnak, elősegítve a sejtciklus szabályozásának egyes lépéseit, különösen a G<sub>2</sub>-fázis és mitózis közötti átmenet során [74].



### 1.3. ábra. A centroszóma és a centriólumok felépítése.

Állati sejtekben a legfontosabb mikrotubulus-szervező központ a sejtmag közelében elhelyezkedő centroszóma, amely két fő részre, a centriólumokra és a pericentrioláris anyagra (PCM) osztható. A centriólumok kilenc, sugár szerűen elrendezett tubulustripletből állnak, jellegzetes henger alakú struktúrát hozva létre. Bár a két centriólum alapszerkezetében hasonló, morfológiailag eltérőek. Az érettebb anyai centriólum képes a plazmamembránhoz kapcsolódni, és nyúlványokat kialakítani a mikrotubulusok és ciliák rögzítéséhez. Ezzel szemben az éretlen leány centriólumról kezdetben hiányoznak ezek a nyúlványok, így éréséig főként a sejt jelátviteli folyamataiban betöltött szerepe dominál. A centriólumokat körülvevő PCM különféle makromolekulák összessége, melyek szabályozzák a mikrotubulusok szervezését és biztosítják a megfelelő kinetikai környezetet a sejtosztódás során.

A centroszóma fehérjék egy további jelentős csoportja a centroszóma másik lényeges komponensében, a pericentrioláris anyagban helyezkedik el. [73, 75]. A PCM olyan különböző, speciális makromolekulák összessége, amelyek szabályozzák az anyagok szállítását, a fehérjék lebontását, valamint sejtosztódás során kedvező kinetikai környezetet biztosítanak a mikrotubulusok nukleációjához és szerkezeti központként szolgálnak a mikrotubulusok mínusz végeinek rögzítéséhez [76]. Ez utóbbi alapvetően az itt elhelyezkedő  $\gamma$ -tubulinból álló gyűrűknek köszönhető; két  $\gamma$ -tubulin molekula ugyanis képes fehérjék egy csoportjával olyan komplexet alkotni, amely polimerizációs magként működik az  $\alpha$ - és  $\beta$ -tubulin heterodimerek számára [77].

A centriólumokhoz hasonlóan a pericentrioláris anyag is dinamikus, sejtciklusfüggő átalakulásokon megy keresztül. A legtöbb állati sejtben ugyanis a PCM mennyisége jelentősen megnövekszik az anyai centriólum körül a centroszóma érés folyamán, miközben a sejt mitózisa készül [76, 78, 79]. Ennek a fokozott PCM felhalmozódásnak köszönhetően ezek a centroszómák képesek jóval több mikrotubulust szervezni, melyek létfontosságú szerepet játszanak a mitotikus orsó kialakításában és megfelelő pozicionálásában [61].

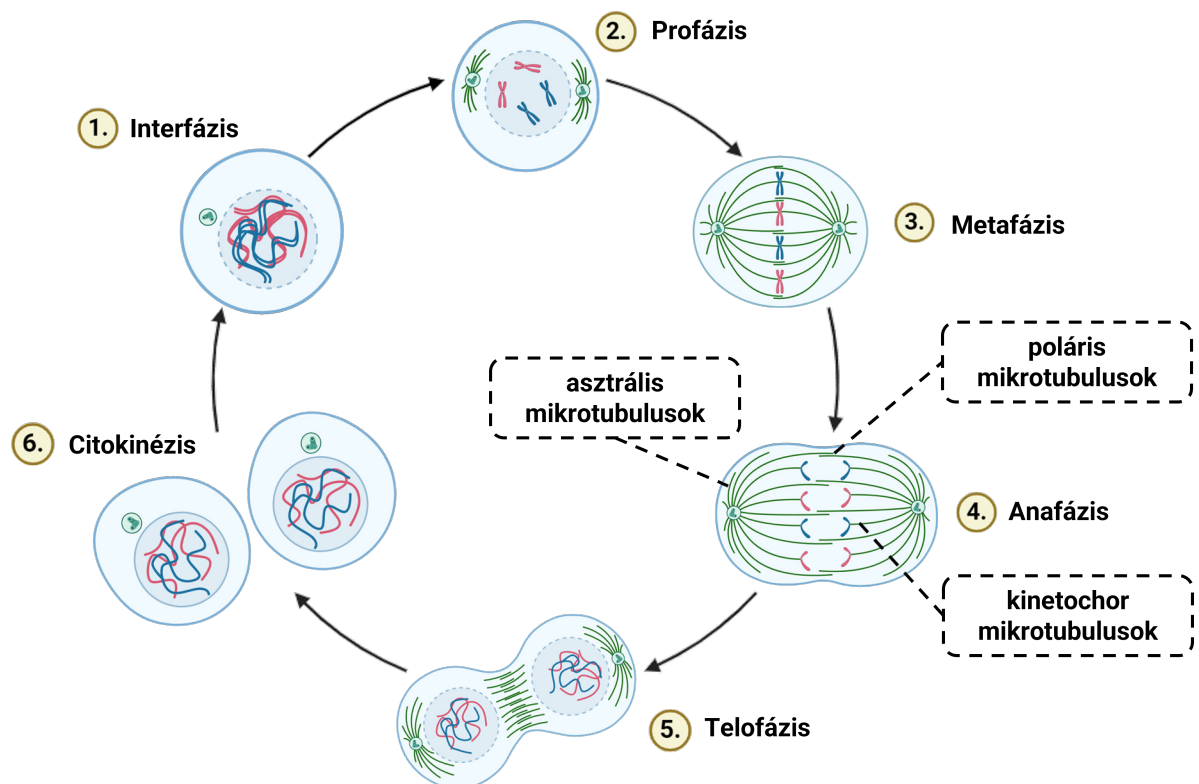
#### *1.4.4. A mikrotubuláris hálózat a sejtosztódás során*

Az interfázistól eltérően a centroszómák szerepében és elhelyezkedésében is jelentős változások mennek végbe amikor egy sejt osztódni kezd és mitózisba lép. A centroszómák ekkor megkezdik szervezni is a mitotikus orsó mikrotubulusait, amely elengedhetetlen a kromoszómák pontos szegregálásához az utódsejtek között, valamint a helyes sejtosztódáshoz (1.4. ábra) [80, 81].

A folyamat során először a meglévő anyai centriólumok replikálódnak, két leány centriólumot hozva létre, amelyek az anyai centriólumokra merőlegesen helyezkednek el [72]. Az így megkettőződött centroszómák egészen a mitózis kezdetéig együtt maradnak [82], azonban amint a sejt profázisba lép a közöttük lévő kapcsolat felbomlik, és megkezdődik a szétválásuk folyamata. Ehhez nagymértékben hozzájárul, hogy az interfázisban kialakult mikrotubulus-váz depolimerizálódik, valamint megnő a centroszómák mikrotubulus-szervező aktivitása, ezáltal körülöttük nagy sebességgel képződnek új mikrotubulusok, amelyek tolóerejükkel segítik a centroszómák eltávolodását egymástól a sejtmag két ellentétes oldalára [81, 83]. Ahogy a két centroszóma egyre messzebb kerül, úgy kezd el kialakulni egy új, ellentétes irányultságú, tükrörszimmetrikus mikrotubulus-hálózat [84].

A tényleges, érett mitotikus orsó azonban csak a prometáfázis során áll teljes mértékben össze, amikor a sejtmaghártya végleg széttöredezik, egyszersmind a mikrotubulusok hozzáférnek a kondenzált kromoszómákhoz [80, 85]. Az így kialakult hálózat ekkor

már három, jól megkülönböztethető mikrotubulusból áll: asztrális, poláris és kinetochor mikrotubulusokból (1.4. ábra). Ezek eltérő szerepe alapvető fontosságú a sejtek pontos és hatékony osztódásához, biztosítva, hogy minden leánysejt megkapja a megfelelő genetikai információt, valamint hogy az osztódási folyamat ellenőrzött és rendezett módon menjen végbe [84]. Ahogy a mitózis előrehalad, az asztrális és poláris mikrotubulusok stabilizálják és a sejtmembránhoz rögzítik az orsót, a kinetochor mikrotubulusok pedig a kromoszómákhoz kapcsolódnak. A létrejövő ellentétes húzó- és taszítóerők révén a kromoszómák így az orsó két pólusától egyenlő távolságra lévő metafázisos síkba kényszerülnek [86].



1.4. ábra. A mitózis szemléltető ábrázolása.

Mitózis során a mikrotubuláris hálózat kulcsszerepet játszik az osztódó sejtek kromoszómáinak szegregálásában. A centroszómból kiinduló mikrotubulusok dinamikusan változó bipoláris orsót alkotnak, amely háromféle különböző mikrotubulust tartalmaz: a kinetochor mikrotubulusokat, amelyek a kromoszómákhoz kapcsolódnak; az asztrális mikrotubulusokat, amelyek az orsót a sejtmembránhoz rögzítik; és a poláris mikrotubulusokat, amelyek a sejtosztódás során a két sejt középpont távolodását segítik.

A kialakult, immáron metafázisos orsó egy igen összetett, dinamikus egyensúlyi állapotban van, ahol az asztrális és poláris mikrotubulusok plusz végei felváltva növekednek és zsugorodnak. Mindeközben a kinetochor mikrotubulusok húzóereje csillapodik, a kromoszómák pedig enyhén oszcillálnak a kijelölt síkjuk mentén és várják az anafázis megkezdésére adott jelet [80, 83, 87]. Amint ez bekövetkezik, az anafázis a kromoszómák gyors szétválásával indul meg, ahol a kinetochor mikrotubulusok depolimerizációja révén a leánykromoszómák a sejt ellentétes pólusai felé vándorolnak. Emellett a pó-

lusok is távolodni kezdenek egymástól, az átfedésben lévő poláris mikrotubulusok szétcsúszásának eredményeként. [88].

Az anafázis végére az ellentétes pólusokon elhelyezkedett leánykromatidák elkezdnek dekondenzálódni. Ezt követően a mitózis végső szakaszában, a telofázisban, kialakul az új sejtmaghártya mindkét kromatida-csoport körül, létrehozva a két utódsejt interfázisos sejtmagját [89]. Az új sejtmagok létrejöttével egyúttal a mitózis is befejeződik, a mitotikus orsó minden eleme végérvényesen depolimerizálódik és tubulin monomerekké esik szét. Ezek később a keletkező utódsejtek citoszkeletonjának összeállításához fognak majd felhasználódni [80, 81].

Ahhoz hogy a sejt végleg befejezze az osztódást, már csak a citoplazma megfelelő elosztásának, a citokinézisnek kell végbemennie. Megjegyzendő, hogy a már szétesett mikrotubulusok szerepe ebben a fázisban sem elhanyagolható: az utódsejtek befűződésének síkját ugyanis a korábbi orsó helyzete határozza meg [90].

## **1.5. Az egér embrionális fejlődés korai szakasza**

### *1.5.1. A korai embrió kialakulása*

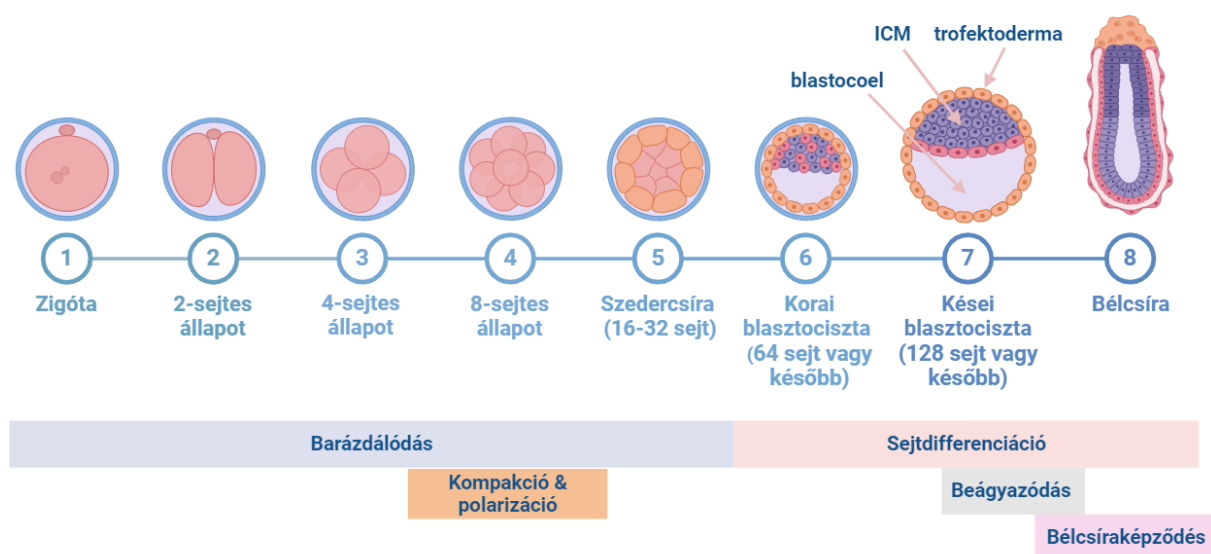
A megtermékenyített egér petesejt (zigóta) először olyan korai osztódások sorozatán megy keresztül, amelyek során egyre több és egyre kisebb sejt, úgynevezett blasztoméra képződik oly módon, hogy minden osztódási kör után megduplázódik az embrió teljes sejtszáma, a mérete azonban közel változatlan marad. Ha a fejlődés ezen kezdeti szakaszában vizsgáljuk az embriót, azt tapasztaljuk, hogy a felszínén egyre több barázda alakul ki; ezért ezt a folyamatot barázdálódásnak nevezzük. A barázdálódás egészen a szedercsíra állapotig tart, és fokozatosan egy 2, 4, 8, 16, majd 32-sejtes embriót eredményez [91]. Ugyanakkor annak érdekében, hogy ezeket a stádiumokat a fejlődő embrió sikeresen elérje, a barázdálódás mellett nélkülözhetetlen, hogy számos morfogenetikai esemény is végbemenjen (1.5. ábra).

Az első ilyen esemény nyolcsejtes állapotban következik be, amikor minden blasztoméra az úgynevezett kompakción megy keresztül [92, 93]. Ekkor az embrió külső régiójában a sejtek szorosabb kapcsolatot alakítanak ki egymással, tömör, ellaposodó struktúrát hozva létre. Ezek után a blasztomérák polarizálódni kezdenek, egy kifelé néző apikális és egy befelé néző bazolaterális régiót hozva létre [94].

A kompakciót és a polarizációt követően a nyolcsejtes embrió sikeresen, további két osztódási cikluson megy keresztül, nyolc sejtesből tizenhatra, majd tizenhat sejtesből harminckettőre növekedve. Ezek az osztódási folyamatok azonban már valóban két, a korábbiaktól jól megkülönböztethető sejtcsoportot hoznak létre: azok a blasztomérák,

amelyek a barázdák tengelye mentén osztódnak, két külső, poláris leánysejtet hoznak létre, míg azok, amelyek osztódása a barázdák tengelyére merőlegesen játszódik le egy külső poláris és egy belső nem poláris leánysejtet hoznak létre [95].

Ennek a jelenségnek igen fontos élettani szerepe van. A 32-sejtes, szedercsíra állapottól kezdődően ugyanis ez a két sejtcsoport eltérő fejlődési sorssal rendelkezik: a külső sejtek a trofektoderma réteget alkotják, amely hozzájárul a méhlepény kialakulásához, míg a belső sejtekből fejlődik ki az embriócsomó (inner cell mass - ICM), amelyből később az embrió lesz [96, 97]. Ezzel párhuzamosan, ahogy az embrió sejtjei különválnak és teljesen elköteleződnek, egy folyadékkal teli üreg, az úgynevezett blastocoel kezd kialakulni, amely megjelenésével az egér embrió már blasztocisztának számít. Ezután még további 24 órán keresztül érik, mielőtt megkezdheti a beágyazódás folyamatát.



1.5. ábra. Az egér embrionális fejlődés korai szakaszainak szemléltető ábrázolása.

Felül: az egér embrió fejlődési stádiumai a megtermékenyített petesejttől a bélcsíráképződésig. Alul: a folyamat során megjelenő sejtosztódások és morfológiai változások, amelyek fokozatosan vezetnek az elsődleges szövetek kialakulásához.

A blasztociszta beágyazódása körülbelül 5 nappal a megtermékenyítés után történik és egy intenzív sejtvándorlással járó folyamat, a bélcsíráképződés (gasztruláció) követi. A bélcsíráképződés során alakul ki a három fő csíralemez: a belső csíralemez (endoderma), a középső csíralemez (mezoderma) és a külső csíralemez (ektoderma). A külső csíralemez a központi idegrendszert és a bőr felső rétegét adja. A középső csíralemez alkotja később a test izomsejtjeit és a kötőszöveteket, míg a belső csíralemezből alakul ki a tápcsatorna és más belső szervek. Ahogy az egyes szervtelepek helyzete meghatározódik, úgy rögzül a kifejlett egér testének végső szerkezeti elrendezése is [98].

### 1.5.2. *Az embrionális őssejtek differenciálódása*

A sejt differenciálódás kulcsfontosságú biológiai folyamat a többsejtű organizmusok fejlődésében, növekedésében és szaporodásában, amely lehetővé teszi, hogy különböző sejt típusok alakuljanak ki, melyek szükségesek a szövetek és szervek felépítéséhez. A differenciálódás összetett menetét a génexpresszió szabályozása, jelátviteli utak, epigenetikai módosítások és a környező mikroökológiai tényezők irányítják [99, 93].

A differenciálódás egyedülálló képességével többek között az őssejtek is rendelkeznek, melyek képesek a folyamatos önmegújulásra. Azonban a különböző típusú őssejtek általában eltérő életkorokban fordulnak elő a szervezetben. Kezdetben, az embrionális fejlődés során a korai stádiumú blasztomérák totipotens sejtek, amelyek még bármely sejt típusra differenciálódhatnak. Egy emlős blasztociszta embrionális őssejtjei ugyanakkor már pluripotensnek számítanak, mivel fejlődési potenciáljuk korlátozott; az ICM csak a három csíralemez sejtjeivé differenciálódhat, míg a trofoblaszt csak a placentát alkothatja [100, 101].

A fejlődés részeként a pluripotens sejtek először multipotens sejtekké válnak, amelyek számos különböző sejt típus kialakítására képesek egy adott sejt vonalon belül. A multipotens sejtek végül tovább alakulnak oligopotens sejtekké, amelyek csak néhány sejt típusra képesek differenciálódni, vagy unipotens sejtekké, amelyek csak egyetlen adott sejt típust képesek létrehozni.

Az embrionális őssejtekkel ellentétben a felnőtt szövetekben található őssejtek általában multipotensek. Ezek a sejtek is képesek további sejt típusokká differenciálódni, de fő szerepük a folyamatosan megújuló szövetek fenntartása és a sérülések regenerálása [102].

### 1.5.3. *A módosított mikrotubulusok szerepe a blasztociszta állapot kialakulásáig*

Az embrionális fejlődés már a megtermékenyítéstől a beágyazódásig rendkívül összetett és precízen összehangolt folyamatokat igényel annak érdekében, hogy a szimmetrikus és aszimmetrikus sejt osztódások, valamint a szedercsíra és a blasztociszta megfelelő kialakulása biztosított legyen. Ebben a szabályozott fejlődési folyamatban kiemelkedő szerepet játszanak a sejt ciklus-specifikus poszttranszlációs módosítások, amelyek a genetikai és epigenetikai tényezők mellett kulcsfontosságúak az embrió fejlődésének irányításában [43].

Emlősökben, így egérben is az első ilyen ismert PTM a második meiotikus blokk feloldása és a meiózis folytatása, amely jellemzően a megtermékenyítő spermium hatására történik. Ezt a folyamatot jelentős citoskeletális átrendeződés és szerkezeti átalakulás követi, mely során az  $\alpha$ -tubulin specifikus térbeli és időbeli acetilációja figyelhető meg a mikrotubulusok mentén [52]. Először a meiózis során az anafázisos orsó mikrotubulusai acetilálódnak, telofázisra azonban kizárólag a meiotikus középtest marad acetilált. Később a meiózist követően, a mitózis során is megfigyelhető egy tubulin-acetilációs mintázat, amely az újonnan képződő sejtek citoskeletális stabilitásában játszhat szerepet. Az első mitózis után az acetilált mikrotubulusok kezdetben metafázisban a centroszómák körül jelennek meg. Anafázisban jelenlétük fokozódik a mitotikus orsón, azonban telofázisban szelektív deacetiláció lép fel, kivéve a középtest mikrotubulusait, amelyek továbbra is acetiláltak maradnak. A késői blasztocishta stádiumban az osztódások során már sem a citoplazmás, sem a metafázisos orsó mikrotubulusai nem mutatnak acetilációt, csupán a középtest esetében figyelhető meg ez a módosítás.

A korai sejtosztódások mellett a poszttranszlációs módosítások kulcsfontosságú szerepet játszanak a kompakció és a polarizáció folyamataiban is. Megfigyelték, hogy a 8-sejtes stádiumban, amikor a sejtek trofektodermává és embriócsomóvá differenciálódnak, a citoplazmás mikrotubulusok részpopulációiban tirozinált és acetilált  $\alpha$ -tubulin van jelen. Az acetiláció ekkor főként a sejtek külső részein, a kortikális régiókban halmozódik fel, különösen a sejtek közötti kontaktzónákban.

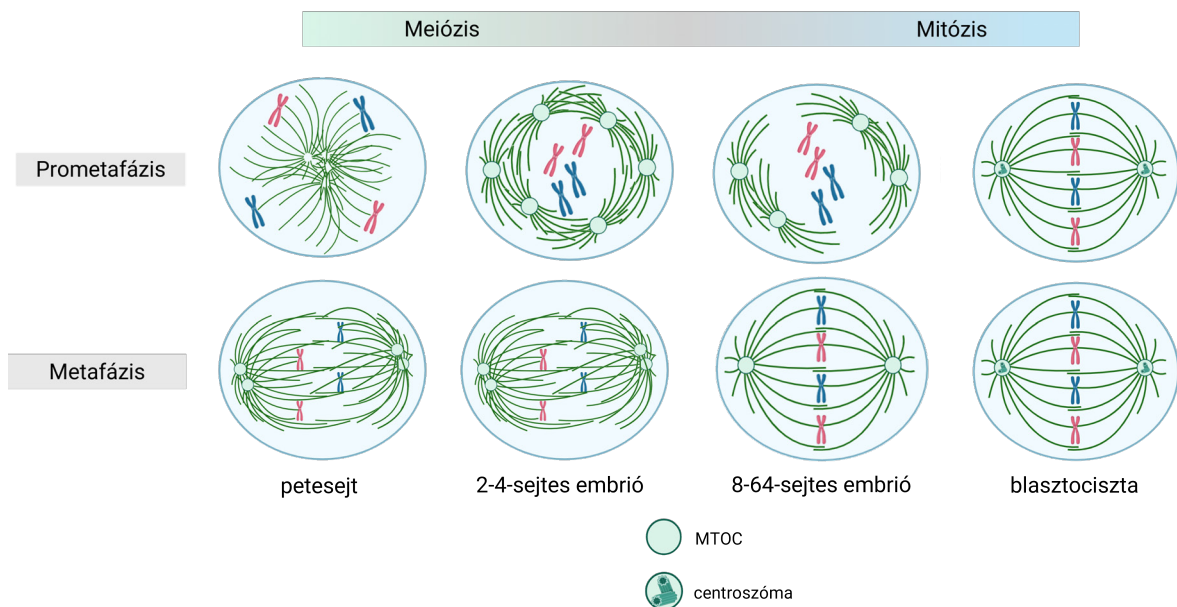
Hasonló mikrotubulus-módosítási mintázatot figyeltek meg a 16-sejtes stádiumban is, ahol a trofektodermát képző sejtek kortikális mikrotubulusai acetilálódtak [103]. Ez a jelenség összhangban áll a polarizált vese epiteliális sejtek PTM-mintázatával, ahol a háromdimenziósan polarizált sejtek több olyan acetilált mikrotubulust tartalmaznak, amelyek fokozatosan a szövet külső régió felé orientálódnak [104].

Mindazonáltal ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a mikrotubulusok dinamikája a külső és belső sejtrégiókban jelentős eltéréseket mutat a morfogenezis során. A blasztocishta kialakulásakor a trofektodermát alkotó külső, poláris réteg fokozatosan a hámrétegre jellemző tulajdonságokat ölt. Ennek következtében a sejtek háromdimenziós polarizációt alakítanak ki, amelyet bizonyos mikrotubulus populációk aktív acetilációja jellemez. Bár a PTM pontos szerepe az embrionális fejlődés ezen szakaszában még nem teljesen tisztázott, valószínűsíthető, hogy a differenciációhoz szükséges fehérjeszintézis növekedése fokozza a mikrotubulusok mentén történő célzott anyagszállítás iránti igényt, amelyet a stabilabb acetilált  $\alpha$ -tubulin biztosíthat [43].

### 1.5.4. A mitotikus orsó kialakulása korai egér embrióban

A meióziszról mitózisra való átmenet létfontosságú az emlős sejtek fejlődése során. A folyamat meghatározó sajátossága, hogy a centroszómális orsó kialakulása előtt az egér korai fejlődésének első néhány sejtciklusa még acentroszómális, azaz centroszóma-független osztódást mutat [105].

Míg a legtöbb szervezetben a spermium biztosítja az egyetlen centriólumpárt a zigótának, hiszen a petesejt centriólumai még a megtermékenyítés előtt degenerálódnak [106, 107]; addig rágcsálóknál a spermium centriólumai is eltűnnek [108]. Centroszóma hiányában így közvetlenül a megtermékenyítést követően, az első három embrionális sejtosztódás orsóképződési mechanizmusa még leginkább a meiózishoz hasonlít. Ekkor a mikrotubulusok térbeli elrendeződéséért a petesejttől örökölt pericentrin fehérjében gazdag MTOC-k felelősek, amelyek véletlenszerűen oszlanak el a citoplazmában és az orsó pólusainál. Ez a véletlenszerű elhelyezkedés osztódáskor multipoláris orsót eredményez. Továbbá megfigyelték, hogy interfázisban a citoplazmás MTOC-k által létrehozott mikrotubulusok viszonylag rövidek, és nem alkotnak térkitöltő mikrotubulus-hálózatot sem [109].



1.6. ábra. A meióziszból mitózisba történő átmenet az egér embrionális fejlődésének kezdeti szakaszán. A folyamat egyik meghatározó jellemzője, hogy az egér korai fejlődésének első néhány sejtciklusában centroszóma-független, multipoláris orsó alakul ki, mielőtt a tipikus bipoláris orsó megjelenne a mitotikus osztódás során. [105]

Nyolcsejtes stádiumtól kezdve a citoplazmás MTOC-k fokozatosan elveszítik aktivitásukat [109]. Ezzel szemben az orsó pólusainál elhelyezkedő MTOC-k megnövekednek, és a belőlük kiinduló mikrotubulusok egyre inkább polimerizálódnak. A prometafázis során ekkor először egy átmeneti multipoláris orsó alakul ki, amely már egy hosszanti tengely mentén szerveződik, de még nem kizárólagosan a pólusoknál. A korai osztódá-

soktól eltérően azonban ez az orsó metafázisra megnyúlik és a pericentrin pontszerűen a két pólusra koncentrálódik, egy tipikus bipoláris orsóra hasonlítva [105].

Ugyanezen kutatás eredményei továbbá arra is rámutattak, hogy a kései blasztociszta állapot elérésekor mind az interfázisos, mind az osztódó sejtekben elektronmikroszkóppal csupán egy vagy két fényes MTOC észlelhető a sejtmag közelében. Profázis során ezek az MTOC-k szétválnak, és metafázisra két jól azonosítható pontra összpontosulnak. Ekkor már valószínűleg működő centroszómákról beszélhetünk, amit megerősít a centriólumok elektronmikroszkópos észlelhetősége 64-sejtes állapotban [110], valamint az egyik centroszómális komponens, a centrin kolokalizációja is ebben a két pontban. A centroszómák megjelenésével ezek a sejtosztódások immár tipikus mitózisként definiálhatók.

## 2. fejezet

# Anyagok és módszerek

### 2.1. Immunfluoreszcens festés egér embriókon

#### 2.1.1. Az immunfluoreszcens festés lépései

A dolgozat elkészítéséhez az egerek szaporítását, az embriók tenyésztését, valamint az embrionális immunfestés kihívásainak megfelelő kivitelezését kollaboráció keretein belül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Genetika és Biotechnológia Intézetben végeztük Dr. Gócza Elen segítségével.

A felhasználni kívánt embriókat szuperovulált vemhes nőstény egerek petevezetőjét átmosva izolálták, majd üvegkapilláris és kézi pipetta segítségével gyűjtötték össze a folyadékból. A kinyert, 2-sejtes állapotú embriókat ezt követően több cseppben alaposan átmosták, majd médium cseppekbe helyezték továbbtenyésztésre. Az *in vitro* tenyésztés 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> mellett zajlott, 3,5, 4,5 és 6,5 napig, a blasztociszta állapot eléréséig. Ezt követően az immunfluoreszcens festéshez az embriókat 100 µl 0,1% BSA-t (Bovine Serum Albumin, Pierce™, Thermo Scientific™) tartalmazó PBS (Phosphate-buffered saline 1X, Thermo Scientific™) cseppekben mosták szobahőmérsékleten 1 percre, majd előmelegített 4% paraformaldehidet (PFA) és 0,1% BSA-t tartalmazó PBS oldatban 3 órán keresztül 37 °C-on egy 4-lyukú plate-en fixálták azokat.

Fixálás után az embriókat Petri-csészékre kirakva 0,01% BSA-t tartalmazó PBS oldatban (BSA/PBS) 100 µl-es cseppekben ismételtén átmostuk 2×5 percre, először szobahőmérsékleten, majd 4 °C-on, fénytől védve. A permeabilizálást 0,1% Triton™ X-100 oldattal (Thermo Scientific™) végeztük, majd 1 órán át blokkoltunk szobahőmérsékleten 2% BSA-t, valamint 5% szamar szérumot tartalmazó PBS blokkoló pufferrel. Blokkolást követően az inkubálást az elsődleges antitestekkel (2.1. táblázat: anti-tubulin és anti-dUTPáz) 2 órán keresztül, 50 µl-es cseppekben szobahőmérsékleten, fénytől védve végeztük, majd az embriókat BSA/PBS cseppekben 3×5 percre mostuk. A festést a másod-

lagos antitestekkel folytattuk (2.1. táblázat: anti-patkány Alexa 488 és anti-egér Alexa 633), ismételt 50 µl-es cseppekben, 1 órán keresztül inkubálva szobahőmérsékleten és fénytől védve.

Ezt követően az embriókat 2×5 percig 100 µl BSA/PBS cseppekben mostuk szobahőmérsékleten, majd 1:10 000 arányú 0,01%BSA-PBS-ben hígított DAPI-val (4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma-Aldrich®) további 15 percig kezeltük, fénytől védve. Újabb háromszori mosás után végül az embriókat mikroszkópos megfigyelő kamrára kihelyezve egyenként 10 µl DAPI Fluoroshield™ (Sigma-Aldrich®) médiumba ágyaztuk. A kamrát fedőlemezekkel lefedve, 4 °C-on, fénytől védve tároltuk az immunfluoreszcens képek elkészítéséig.

| Elsődleges antitest neve                                                                   | Gyártó             | Hígítási arány           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------------|
| Anti- $\alpha$ -Tubulin antibody,<br>Mouse monoclonal                                      | Sigma-Aldrich®     | 1:1000<br>(0,1% BSA-PBS) |
| Anti-dUTPase antibody,<br>Rat monoclonal                                                   | Sigma-Aldrich®     | 1:1000<br>(0,1% BSA-PBS) |
| Másodlagos antitest neve                                                                   | Gyártó             | Hígítási arány           |
| Goat anti-Rat IgG (H+L) Cross-Adsorbed<br>Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 488             | Thermo Scientific™ | 1:1000<br>(0,1% BSA-PBS) |
| Goat anti-Mouse IgG (H+L)<br>Highly Cross-Adsorbed<br>Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 633 | Thermo Scientific™ | 1:1000<br>(0,1% BSA-PBS) |

2.1. táblázat. Az immunfluoreszcens festés során használt antitestek.

### 2.1.2. Konfokális mikroszkópia és képfeldolgozás

Az egér embriókról készült immunfestett képeket Zeiss LSM 710 lézerpasztázó konfokális mikroszkóppal rögzítettem, amely Zeiss AXIO Observer Z1 inverz állványt használ, transzmissziós (HAL), UV (HBO) és lézeres megvilágítással. A képekhez Plan-Apochromat 20×/0,8 M27 (száraz) és Plan-Apochromat 63×/1,4 olajos DIC M27 (immerziós) objektívet használtam. A felvételek során a mikroszkópot a Zen Black 2.3 szoftverrel vezéreltem. A DAPI festéket 405 nm-es diódalézerrel, az Alexa Fluor 488-at 488 nm-es argon lézerrel, míg az Alexa Fluor 633-at 633 nm-es hélium/neon lézerrel gerjesztettem, szekvenciális képalkotási módszerrel, minimalizálva a fluorofórok közötti áthallást. A háttérzaj csökkentésére a Zeiss Zen Blue 2.3 Lite szoftvert alkalmaztam, az immunfluoreszcens képek megjelenítését pedig az ImageJ (Fiji) programmal végeztem.

## 2.2. Ko-immunprecipitáció

A különböző biológiai folyamatokban gyakran előfordul, hogy egy fehérje nem önmagában, hanem egy komplex részeként vesz részt, ennél fogva a fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálata a tudományos kutatások középpontjába került. A kölcsönható partnerek azonosítására az utóbbi években az immunprecipitáció (IP) és a ko-immunprecipitáció (co-IP) vált az egyik legelterjedtebb módszerre [111]. Az IP során specifikus antitesteket alkalmaznak Protein A/G affinitásgyöngyökkel kombinálva, lehetővé téve a fehérje-antitest komplexek izolálását [112].

A co-IP lényegében az IP továbbfejlesztett változata, amely során a kísérlet nemcsak az elsődleges célfehérjére (az antigénre), hanem az ahhoz natív kölcsönhatások révén kötődő további makromolekulákra is koncentrálnak. Egy tipikus co-IP kísérlet több lépésből áll: először a fehérje extraktumot (általában sejtlizátumot) készítik elő, majd az antitestet affinitásgyöngyökhöz kapcsolják. Ezután a specifikus fehérjekomplexet megtisztítják úgy, hogy a nem kötődött fehérjéket eltávolítják, míg az antigén és az ahhoz kötődő kölcsönható fehérjék eluálódnak. Végül a tisztított fehérjekomplexeket leggyakrabban tömegspektrometriával vagy Western blot analízissel azonosítják [112].

### 2.2.1. *Eukarióta sejtek tenyésztése és fenntartása*

A kísérletek során HCT 116 (ATCC® CCL-247™, Imanis Life Sciences) sejtvonalat alkalmaztam. A sejteket 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> mellett tenyésztettem magas glükóz- és piruváttartalmú DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco™) tápoldatban, amelyet 10% FBS-sel (Fetal Bovine Serum, Gibco™), 4% L-glutaminnal és 1% sterilre szűrt penicillin-sztreptomycin oldattal (Sigma-Aldrich®) egészítettem ki. A sejtek növekedését rendszeresen figyeltem inverz mikroszkóp segítségével, a sejtek megfelelő morfológiájának és konfluenciájának ellenőrzésére. A tápoldatot 2-3 naponta cseréltem, fenntartva a szükséges tenyésztési körülményeket.

### 2.2.2. *Sejtciklus szinkronizálás G<sub>2</sub> fázisban*

A dUTPáz mitózis alatti kölcsönható partnereinek vizsgálatához a HCT 116 sejteket a sejtciklus G<sub>2</sub> fázisában szinkronizáltam, 18 órán át 9 µM RO-3306-tal (Calbiochem™, Sigma-Aldrich®) kezelve. A RO-3306 egy specifikus sejtciklus-szinkronizáló szer, amely a ciklin-függő kináz 1 (Cdk1) aktivitását gátolja [113]. Ennek eredményeként a sejtek osztódása reverzibilisen megáll a G<sub>2</sub>/M fázis határán, lehetővé téve, hogy az inhibitor friss tápközegre cserélése révén, a kezelés megszakítását követően a sejtek jelentős része közvetlenül mitózisba lépjen.

### 2.2.3. A ko-immunprecipitáció lépései

A sejtciklus szinkronizálása után, a co-IP-hez elegendően nagy konfluencia mellett a sejteket friss, előmelegített tápba gyűjtöttem, mintánként külön Eppendorf™ csövekbe. A mérésekhez ebből a sejtmintából összesen két biológiai párhuzamost és egy negatív kontrollt állítottam elő.

Ezt követően a mintákat centrifugáltam (Eppendorf™ MiniSpin®), és a sejt pelletet megtartva kétszer mostam PBS-sel 5 percen keresztül (1800 rpm, szobahőmérsékleten). Mosás után a pelletet ötszörös mennyiségű citoplazma extrakciós pufferben (2.2. táblázat) reszuspendáltam, majd jégen 15 percig inkubáltam, időnként enyhén megrázogatva. A mintaelőkészítés során innentől kezdve minden lépést 4 °C-on végeztem, valamint a mintákat végig jégen tartottam a fehérjék szerkezeti és funkcionális stabilitásának megőrzése érdekében. Az inkubálást követően a mintákat ismételt 5 percig centrifugáltam (3000 g 4°C-on) a frakciók elválasztása érdekében. Ekkor a kapott felülúszó tartalmazta azt a citoplazma extraktumot, amelyet a továbbiakban vizsgálni kívántam. Bár a pelletben lévő sejtmagok a mérés szempontjából nem voltak relevánsak, azokat hűtve tároltam a mérés sikerességének ellenőrzéséig. A citoplazmás frakciókat új, tiszta Eppendorf™ csövekbe átmértem, majd glicerollal egészítettem ki úgy, hogy a glicerol végkoncentrációja 6,5%-os legyen a mintákban.

Ezt követően a nem-specifikus kötődések minimalizálása érdekében a mintákat Protein A/G agaróz gyöngyökkel (Pierce™, Thermo Scientific™) előtisztítottam. A gyöngyök előkészítése során mintánként 60 µl gyöngyöt 300 µl mosó pufferrel (2.2. táblázat) kétszer mostam 3 percen keresztül (3000 rpm, szobahőmérsékleten), ügyelve arra, hogy a gyöngyöket ne szuszpendáljam. Ezután a gyöngyökhöz hozzáadtam a glicerollal kiegészített mintákat, és 2 órán át folyamatos forgatás mellett 4 °C-on inkubáltam. Az inkubációt követően a kapott elegyet 5 percig centrifugáltam (3000 g, 4 °C-on). Az ily módon nyert tisztított felülúszókat új Eppendorf csövekbe mértem át, és mintánként 1 µl anti-dUTPáz antitestet (2.1. táblázat) adtam hozzájuk, a negatív kontrollt kivéve. Ezt követően a mintákat egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltam folyamatos forgatás mellett.

Másnap az antitestes tisztított felülúszókon mágneses Protein A/G gyöngyökkel (Pierce™, Thermo Scientific™) ko-immunprecipitációt végeztem. Ehhez a gyöngyöket először mosó pufferrel háromszor centrifugálva mostam (3000 rpm, szobahőmérsékleten), majd a mintákat hozzáadva 2 órán át 4 °C-on inkubáltam őket, folyamatosan forgatva. Az inkubációt követően mágneses tartó segítségével az Eppendorf™ csövek falához gyűjtöttem a gyöngyöket. Ekkor a gyöngyös pelleten található a mérés szempontjából releváns, kihúzott fehérjék, ezért a felülúszót leszívtam és a mérés sikerességének ellenőrzéséig félretettem. Ezután a mágneses gyöngyöket háromszor mostam 200 µl

alacsony sókoncentrációjú pufferrel (2.2. táblázat). Végül a célfehérjéket 0,1 M glicin (pH 3,5) segítségével eluáltam, úgy, hogy mintánként  $3 \times 50 \mu\text{l}$ -t adtam hozzájuk, minden lépésnél 10 percig inkubálva a mintákat szobahőmérsékleten, folyamatos forgatás mellett. Az így kapott eluátumokat egy tiszta Eppendorf™ csőben  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltam a proteomikai mérés megkezdéséig.

| Puffer neve                                    | Összetevők                     |
|------------------------------------------------|--------------------------------|
| <b>Citoplazmás extrakciós puffer (pH 7,4)</b>  | 20 mM Tris                     |
|                                                | 20 mM HCl                      |
|                                                | 10 mM NaCl                     |
|                                                | 3 mM $\text{MgCl}_2$           |
|                                                | 0,5 mM DTT                     |
|                                                | 0,05% NP-40                    |
|                                                | 1x proteáz inhibitor koktél    |
|                                                | Milli-Q® víz                   |
| <b>Mosó puffer (pH 7,4)</b>                    | 0,5% Tween-20<br>PBS-ben oldva |
| <b>Alacsony sókoncentrációjú puffer (pH 8)</b> | 150 mM NaCl                    |
|                                                | 20 mM Tris                     |
|                                                | 20 mM HCl                      |
|                                                | 2 mM EDTA                      |
|                                                | 1% Triton X-100                |
|                                                | 1x proteáz inhibitor koktél    |
|                                                | Milli-Q® víz                   |

2.2. táblázat. A ko-immunprecipitáció során használt többkomponensű pufferek.

## 2.3. HPLC-MS/MS alapú proteomika

Az folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometria (LC-MS/MS) alapú proteomika komplex biológiai mintákban az egyik legelterjedtebb eszköz a fehérjék pontos azonosítására és kvantifikálására [114]. A fehérjék közötti interakciók vizsgálatában különösen hatékony megközelítést kínál, ha ko-immunprecipitációval kombinálják, mivel így a gyenge vagy átmeneti interakcióban részt vevő fehérjék is megbízhatóan detektálhatók [115].

A módszer alkalmazásakor a vizsgálni kívánt komplex fehérjekeverékeket először izolálják, majd proteolitikus emésztésnek vetik alá. Az specifikus hasítóhelyeken végzett

emésztésből keletkező peptidtermékeket ezután folyadékkromatográfiás módszerrel (leggyakrabban valamilyen nagy szelektivitású HPLC-vel) kapcsolt tandem tömegspektrométerrel elemzik. A tandem tömegspektrométerben a peptidek azonosítása úgy történik, hogy először meghatározzák az egyes peptidek prekursor ionjainak tömeg-töltés arányát ( $m/z$ ) az MS spektrumon; majd ezt követően egy ütközési cellában még kisebb részekre, fragmens ionokra bontják őket. Végül az MS/MS spektrumon megállapítják a fragmens ionok  $m/z$  arányát is. A kiindulási mitában található fehérjék tényleges azonosítása az MS/MS spektrumok adatbázisokkal való összeegyeztetése révén történik [116].

### 2.3.1. Mintaelőkészítés

A dolgozat elkészítése során az HPLC-MS/MS mérések megfelelő végrehajtását és a proteomikai adatok kiértékelését a HUN-REN Természettudományi Kutatóközpont MS Proteomika Kutatócsoportjával együttműködésben, Dr. Drahos László és Szabó Dániel segítségével végeztem.

A HPLC-MS/MS mérés előkészítéséhez a co-IP-ből származó minták 0,1 M glicin (pH 3,5) oldószerét 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  oldatra cseréltük, Amicon Ultra (Millipore™) 10 kDa pórusméretű centrifugális szűrők segítségével. Ehhez a szűrőket először LC-MS vízzel 10 percen keresztül mostuk (13 500 g, 4 °C-on). Ezután felvittük a mintákat úgy, hogy a térfogatukat 200  $\mu\text{l}$ -re egészítettük ki 200 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  oldattal, majd 10 percig centrifugáltuk (13 500 g, 4 °C-on). Ezt a centrifugálási lépést (10 perc, 13 500 g, 4 °C-on) az oldószercsere végrehajtásához még kétszer megismételtük úgy, hogy az elsőnél 200  $\mu\text{l}$  200 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  oldatot, a másodiknál pedig 200  $\mu\text{l}$  50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  oldatot adtunk a mintákhoz.

Ezt követően a mérés előkészítését a minták emésztésével folytattuk. Ehhez először a minták hozzávetőleges fehérjekoncentrációit NanoDrop™ segítségével meghatároztuk, majd minden mintából egy körülbelül 10  $\mu\text{g}$  fehérjét tartalmazó részt LC-MS vízzel és metanollal 25  $\mu\text{l}$  végső térfogatra hígítottunk fel, 5%-os végső metanolkoncentrációval. A fehérjék denaturálását 5  $\mu\text{l}$  0,5% RapiGest SF (Waters™) hozzáadásával végeztük. Az S-S hidak redukálásához diklór-difenil-triklóretánt (DTT) adtunk a mintákhoz 12,5 mM végső koncentrációban, amivel 30 percig inkubáltunk 60 °C-on. Az alkiláláshoz jód-acetamidot használtunk 12,5 mM végső koncentrációban, amivel 30 percig sötétben inkubáltunk szobahőmérsékleten. Az enzimatis emésztést tripszin/Lys-C keverék (100:1 fehérje arány) hozzáadásával végeztük, 1 órás inkubálással 37 °C-on, amit újabb tripszin hozzáadása követett (25:1 fehérje arány), 2 órás inkubálással 37 °C-on. Az inkubáció végeztével a reakciót 1,5  $\mu\text{l}$  hangyasav (FA) hozzáadásával állítottuk le,

majd a mintát vákuumcentrifugában szárítottuk 60 °C-on a mintaelőkészítés másnapi folytatásáig.

Következő nap az emésztett mintákban található peptidek tisztítását és sótalanítását C18 centrifugáló oszlopokon (Pierce™) végeztük. Az oszlop kondicionálását és ekvilibrálását  $2 \times 200 \mu\text{l}$  50% MeOH,  $2 \times 200 \mu\text{l}$  0,5% trifluorecetsav (TFA) és 5% acetonitril hozzáadásával végeztük. Ezt követően az oszlopokat  $2 \times 200 \mu\text{l}$  0,1% TFA-val mostuk. Ezután kétszer felvittük a mintákat (amelyeket előzőleg  $50 \mu\text{l}$  0,1% TFA-ban rekonstruáltunk) az oszlopra úgy, hogy az átszűrődött, áteső folyadékot újra alkalmaztuk. A minták mosására  $2 \times 100 \mu\text{l}$  0,1% TFA-t használtunk. Végül a minták eluálását  $2 \times 50 \mu\text{l}$  70% acetonitrilt és 0,1% TFA-t tartalmazó oldattal végeztük. A centrifugáló oszlop használatának minden lépésben 1 percre centrifugáltunk 1500 rpm-en. A C18 tisztítást követően a mintákat ismét vákuumcentrifugában szárítottuk 60 °C-on, majd -4 °C-on tároltuk a HPLC-MS/MS mérés megkezdéséig.

### 2.3.2. HPLC-MS/MS mérés

A tömegspektrometriás méréseket egy Bruker™ Maxis II ETD Q-TOF műszeren végeztük, amely egy CaptiveSpray nanoBooster ionforrással és egy Ultimate 3000 nanoRSLC-vel volt összekapcsolva. A mérés elvégzéséhez a beszárított mintákat 0,1% hangyasavat tartalmazó 2%-os acetonitrilben oldottuk fel, majd a minták sótalanítására minden futtatás során  $2 \mu\text{g}$  fehérjét injektáltunk az Acclaim™ PepMap™ 100 C18 HPLC előkezelő (trap) oszlopra ( $100 \text{ \AA}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ,  $100 \mu\text{m} \times 20 \text{ mm}$ ).

A peptidek szétválasztását egy ACQUITY UPLC M-Class Peptide BEH (Waters™) C18 oszlopon ( $130 \text{ \AA}$ ,  $1,7 \mu\text{m}$ ,  $75 \mu\text{m} \times 250 \text{ mm}$ ) végeztük 48 °C-on, gradiens eluálást alkalmazva (2% B 0-tól 11 percre, majd egy 120 perces gradiens 50% B-ig). A gradienshez használt eluent A esetében víz + 0,1% FA, míg B esetében acetonitril + 0,1% FA alkotta. A tömegspektrumokat 150–2200 m/z tömegtartományban rögzítettük 3 Hz-en, míg az ütközéssel aktiválást (CID) 16 Hz-en hajtottuk végre a bőséges prekursor ionoknál, és 4 Hz-en az alacsony mennyiségűeknél. Belső standardként nátrium-formiátot használtunk, és a nyers adatokat a Compass Data Analysis 4.3 szoftverrel kalibráltuk újra.

### 2.3.3. Adatbázis-keresés

A potenciális kölcsönható partner fehérjét a Byonic™ v3.5.0 keresőmotor segítségével azonosítottuk, a SwissProt Human adatbázisban keresve (letöltve: 2024.07.18). A Byonic szoftvercsomag választását az indokolta, hogy széleskörű lehetőségeket kínál más keresőmotorokkal (például Mascot vagy SEQUEST) szemben. Három egyedi funkciója — a módosítások finomhangolása (Modification Fine Control™), a Wildcard Search™ és a glikopeptid keresés (Glycopeptide Search) — különösen hasznos az ismeretlen fehérjék vizsgálatakor. A Modification Fine Control lehetővé teszi a túl szűk vagy túl tág keresési feltételek elkerülését, ezzel megelőzve a releváns találatok elvesztését vagy álpozitív eredmények kialakulását. A Wildcard Search funkció révén váratlan, a szakirodalomban nem szereplő módosítások azonosítása is lehetővé válik. A Glycopeptide Search pedig segít a glikozilált peptidek azonosításában anélkül, hogy előzetes ismeretekkel rendelkeznénk a glikozilációs helyekről vagy az adott glikán tömegéről [100].

Az elvégzett LC-MS/MS mérések eredményeit a Byonic a következő beállított paraméterek figyelembevételével elemeztük. A fehérjeazonosítás feltételeit pedig a Scaffold 4.10-ben állítottuk be, a következő paraméterekkel: LFDR-újrapirozás 95%-os peptid konfidencia küszöbértékkel, minimum két egyedi peptid, és 1%-os fehérjeszintű hamis felfedezési arány (False Discovery Rate, FDR).

## 3. fejezet

# Eredmények

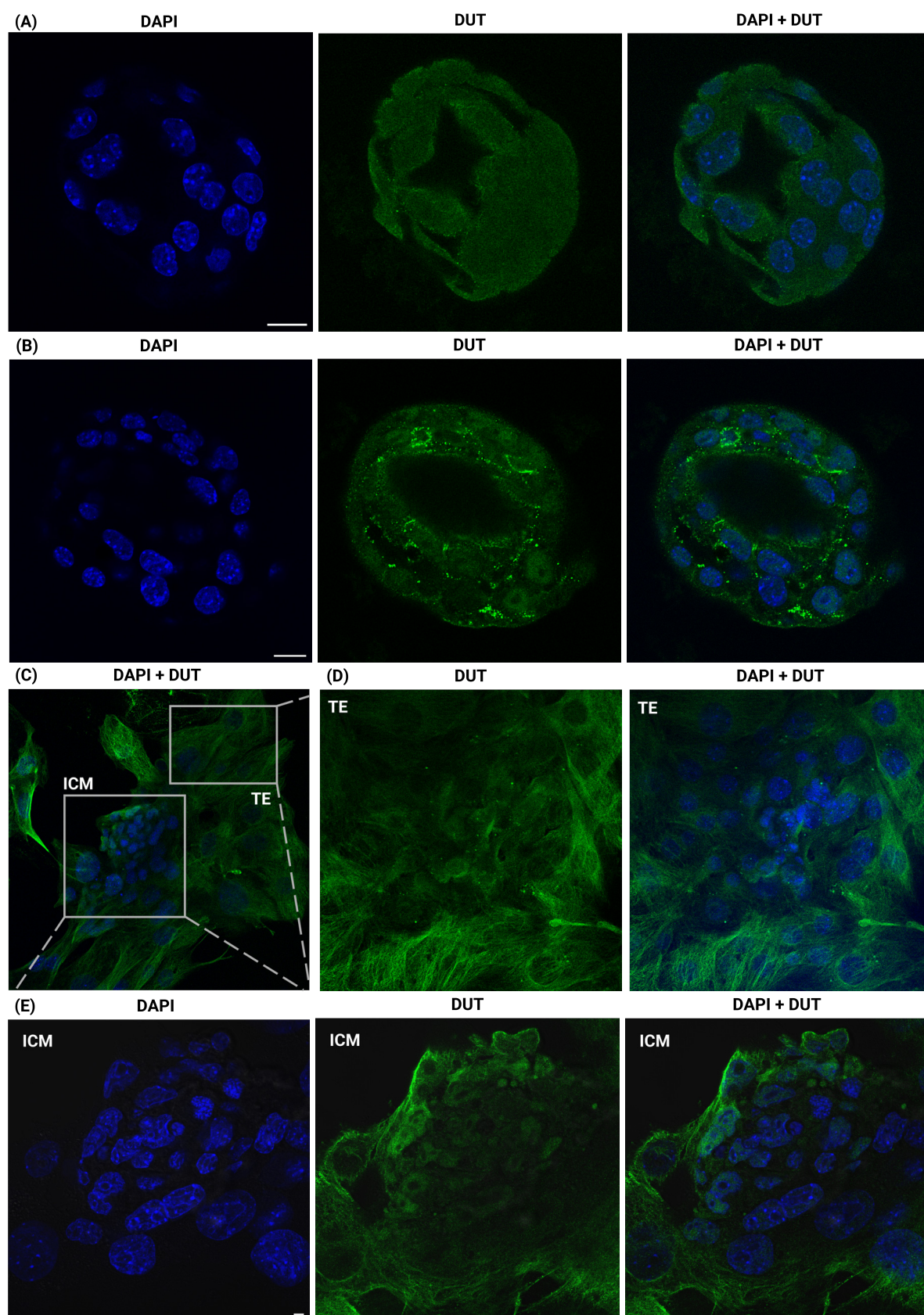
### 3.1. Immunfluoreszcens festés egér blasztocisztákon a dUTPáz enzim funkciójának feltérképezésére

#### 3.1.1. A dUTPáz enzim blasztomérákon belüli lokalizációja

Korábbi kutatási eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a dUTPáz enzim nem csupán a dUTP-szint csökkentésében játszik szerepet, hanem más sejtosztódási funkciókat is betölthet. Ezt a feltételezést tovább erősíti, hogy a dUTPáz kódozó *Dut* gén kiütése egérben korai embrionális letalitást okoz [11], arra utalva, hogy az enzim működése elengedhetetlen az embrionális fejlődés során.

A dUTPáz potenciális új funkciójának feltérképezése érdekében immunfluoreszcens festést végeztünk egér blasztocisztákon, hogy tanulmányozni tudjuk az enzim lokalizációját és különböző sejt típusokban betöltött szerepét az embrionális fejlődés folyamán. Ennek megfelelően a sejtmagokat DAPI-val, míg a dUTPáz enzimet anti-dUTPáz antitesttel jelöltük.

Az enzim blasztomérákon belüli eloszlását vizsgálva kétféle mintázatot figyeltünk meg: a fehérje helyenként mind a sejtmagban, mind a citoplazmában jelen volt; míg más sejtekben teljesen kizáródott a sejtmagból, citoplazmás lokalizációt mutatva (3.1. ábra). Ez a megfigyelés összhangban áll azzal, hogy a dUTPáz izoformái közül a többletben lévő sejtmagi izoforma (DUT-N) sejtciklus-függő dinamikát mutat humán sejtekben [117, 118, 119]. Bár az izoforma tartalmazza az emlős fajokban konzerválódott nukleáris lokalizációs szignált (NLS), önmagában ez nem elegendő a teljes sejtmagi lokalizáció biztosításához, mivel a fehérje szekvenciájának több mint háromnegyede szükséges a megfelelő orientációhoz [120, 121].



3.1. ábra. A dUTPáz sejten belüli eloszlása a különböző korú egér blasztocisztákban.

Fluoreszcens immunfestés DNS-re (kék) és dUTPáz enzimre (zöld). Skála: 20  $\mu$ m. Míg a 3,5 napos blasztocisztákban a dUTPáz kizárólag a citoplazmában lokalizálódott (A), addig a 4,5 napos blasztocisztákban már sejtmagi jelenléte is megfigyelhető volt (B). A 6,5 napos blasztocisztákban (C), amelyek megkezdték a polarizáció folyamatát, a trofektoderma (TE) sejtjeiben az enzim csak a citoplazmában volt detektálható (D), míg az ICM sejtjeiben citoplazmás és sejtmagi lokalizáció egyaránt megjelent (E).

Továbbá kimutatták azt is, hogy számos fehérje rendelkezik olyan foszforilációs hellyel az NLS szekvenciáján belül vagy annak közelében, amelynél a foszforiláció szabályozza a fehérje sejtmagi importját [122]. Az DUT-N esetében ez a foszforiláció az NLS melletti egyik szerin aminosavon következik be, és az enzim kizáródását eredményezi a sejtmagból mitózis alatt [118, 123]. Bár egér sejtekben a sejtmagi dUTPáz izoforma (nDut) foszforilációjának mechanizmusát eddig részletesen nem vizsgálták, a fehérje több mint 85%-os szekvenciaegyezést mutat a humán DUT-N-nel, és rendelkezik a foszforilációhoz szükséges kritikus hellyel is. Ezen homológia alapján feltételezhető, hogy a humán dUTPáz-hoz hasonló, foszforiláció általi szabályozás működhet egér sejtekben is a mitózis során.

Az enzim eltérő lokalizációját azonban nemcsak a sejtben belüli eloszlás variabilitása jellemezte. A dUTPáz elhelyezkedése az embriók fejlődési korától függően is változott; a 3,5, a 4,5 valamint a 6,5 napos embriók esetében különböző mértékben volt megfigyelhető az enzim sejtmagi és citoplazmás jelenléte (3.1. ábra). A 3,5 napos blasztocisztákban a dUTPáz egyértelműen a sejttagon kívül, a citoplazmában helyezkedett el (3.1A ábra). Ezzel szemben a 4,5 napos blasztocisztákban a dUTPáz már sejtmagi lokalizációt is mutatott, nem kizárólag a citoplazmában volt jelen (3.1B ábra). Ezen felül megfigyelhető intenzív pöttyös lokalizációs mintázat a citoplazmában, melyet korábban nem karakterizáltak. Az aspecifikus festődés azért nem valószínű, mert a kutatócsoport egyéb kísérleteiben is tapasztalható hasonló pöttyös festődési mintázat, főként a foszforilált dUTPáz esetében, melynek vizsgálata jelenleg is folyamatban van. Továbbá a legidősebb, 6,5 napos blasztocisztákban (3.1C ábra), amelyek már megkezdték a polarizáció folyamatát, eltérő eloszlási mintázatot figyeltünk meg a trofektoderma és az ICM sejtei között. A trofektoderma sejteiben, hasonlóan a 3,5 napos embriókhoz, a dUTPáz kizárólag a citoplazmában volt detektálható (3.1D ábra), míg az ICM sejteiben a dUTPáz már citoplazmás és sejtmagi lokalizációt is mutatott (3.1E ábra). Ezen felül a trofektoderma sejteiben jellegzetes szálas mintázat figyelhető meg a dUTPáz lokalizációjában, mely hasonlít a jól ismert mikrotubuláris hálózat mintázatához.

A fluoreszcens immunfestés eredményei összességében arra utalnak, hogy a dUTPáz sejtben belüli eloszlása szoros összefüggést mutat mind az embriók fejlődési állapotával, mind a mitotikus aktivitást mutató sejttypusok jelenlétével. Ezek a tényezők tehát együttesen befolyásolhatják az enzim sejtmagból való kizáródását és citoplazmás lokalizációját. A két jelenség közötti összefüggést tovább erősíti ezt a megfigyelést. Egyrészt ismert, hogy az nDut mRNS expressziója különösen magas olyan szervekben, ahol nagymértékű sejtosztódás figyelhető meg, mint a csecsemőmirigy és a lép [124]. Másrészt, az egér embriócsomó sejtei gyorsabban, rövidebb sejtciklusokkal osztódnak [125]. Ekkor más nukleotid prekursorok bioszintéziséért felelős enzimekhez hasonlóan az nDut kifejeződése is jelentősen megnő az S fázisban [120, 126]. Ennek következmé-

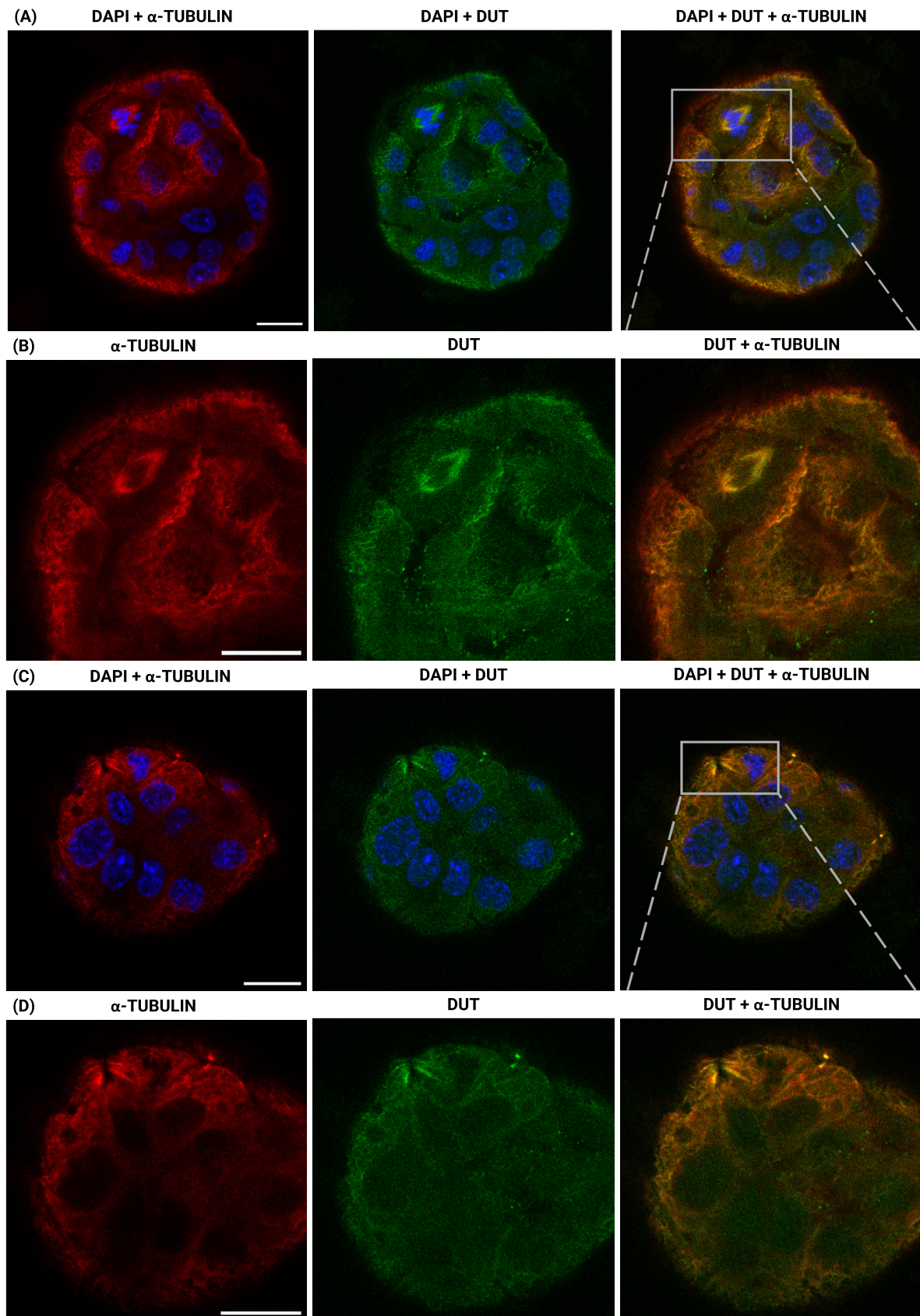
nyeként ezekben a sejtekben a dUTPáz enzim sejtmagi jelenléte is fokozódhat. Ezzel szemben, az embrionális fejlődés előrehaladtával a trofektoderma sejtek nem mutatják a sejtciklus időtartamának rövidülését, és kevesebb osztódó sejtet tartalmaznak [127]. Ennek következtében csökkentett mértékben expresszálhatják a nukleáris izoformát, ami magyarázhatja a sejtmagban tapasztalt alacsony dUTPáz szintet.

Bár a kapott eredményeink jó összhangban vannak a meglévő tudományos ismeretekkel, fontos megjegyezni, hogy a kísérleteket *in vitro* embriókkal végeztük. Korábbi kutatások pedig bizonyították, hogy az *in vitro* tenyésztett és az *in vivo* fejlődő blasztociszták sejtei között eltérések mutatkozhatnak [128]. Ezért az eredmények igazolásához szükséges a vizsgálatok *in vivo* embriókon végzett megerősítése.

### 3.1.2. A dUTPáz enzim és az $\alpha$ -tubulin kolokalizációja

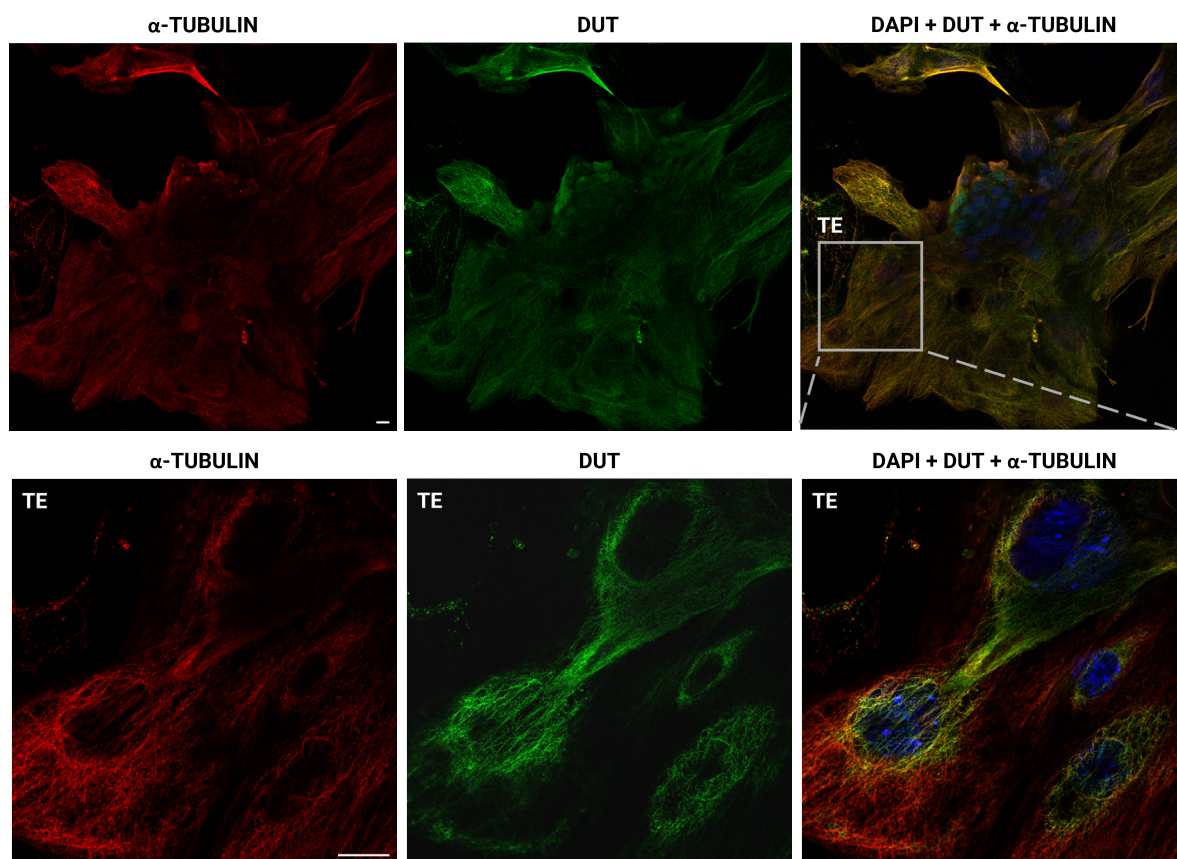
A kapott eredmények alapján a dUTPáz enzim sejten belüli lokalizációjának és az embrionális fejlődés különböző sejttypusaiban betöltött szerepének mélyebb megértéséhez további vizsgálatokat végeztünk. Célunk az enzim lehetséges kapcsolatainak feltárása volt a sejtosztódásban részt vevő egyéb sejtstruktúrákkal, különös figyelmet fordítva a mitotikus orsóra. Hiszen a kutatócsoport korábban kimutatta több humán sejtvonalon, valamint egér embrionális fibroblasztok vizsgálata során is, hogy mikrotubulus struktúrák jelentős átfedést mutatnak a dUTPáz enzim sejten belüli eloszlásával. Következésképpen a vizsgált blasztocisztákon összevetettük az enzim és a tubulin váz fluoreszcens jelölését, amely során egyértelmű kolokalizációt tapasztaltunk a két fehérje között a 3,5 és a 6,5 napos embriók esetében.

A 3,5 napos blasztociszták vizsgálata során sikerült több mitózisban lévő sejtet is detektálnunk, amelyek a sejtciklus különböző fázisaiban tartózkodtak (3.2. ábra). A kromoszómák elhelyezkedése és a mikrotubuláris hálózat szerveződése alapján egyértelműen azonosítottunk több metafázisban, valamint telofázisban lévő sejtet is. Ezek elemzésekor kiemelkedett, hogy a dUTPáz enzim és az  $\alpha$ -tubulin kolokalizációja legintenzívebben a mitotikus orsó struktúráin volt kimutatható, így a metafázisos orsón (3.2A, 3.2B ábra), valamint a telofázis során kialakuló centrális orsón (3.2C, 3.2D ábra), amely a poláris mikrotubulusokon kívül nagyon sok különböző eredetű és funkciójú fehérjét tartalmaz. A 6,5 napos embriók esetében kolokalizáció leginkább a trofektoderma sejteinél volt megfigyelhető azokban a külső felszínt növelő, ujszerű kitüremkedésekben, amelyek a hosszútávú vezikuláris transzport és az anyai szövetrel való kölcsönhatások elősegítésében játszanak szerepet (3.3. ábra).



3.2. ábra. A dUTPáz és az  $\alpha$ -tubulin kolokalizációja mitózis során 3,5 napos egér blasztocisztákon. Fluoreszcens immunfestés DNS-re (kék),  $\alpha$ -tubulinra (piros) és dUTPáz enzimre (zöld). Skála: 20  $\mu$ m. A fehérjék kolokalizációja (sárga) legintenzívebben a metafázisos orsón (A, B), valamint a telofázis során kialakuló centrális orsón (C, D) volt kimutatható.

A dUTPáz és az  $\alpha$ -tubulin együttes jelenlétét mutató megfigyelt struktúrák közös jellemzője, hogy főként acetilált mikrotubulusokból épülnek fel [52]. Ez a poszttranszlációs módosítás lehetővé teszi a mikrotubulusok aktivitásának és dinamikájának tér- és időbeli szabályozását azáltal, hogy befolyásolja a molekuláris kölcsönhatásokat, valamint a fehérjék lokalizációját és stabilitását [50, 57]. A dinamikus változás biztosítása különösen jelentős az embrionális fejlődés során, ahol az embrió mikrotubuláris hálózata az osztódások alatt összetett átrendeződéseken megy keresztül. E folyamatokhoz márpedig elengedhetetlen lehet a mikrotubulusok szelektív stabilizálása, így az  $\alpha$ -tubulinok specifikus térbeli és időbeli acetilációja. A korai osztódások során ez a poszttranszlációs módosítás egyrészt a metafázisos, valamint a centrális orsót alkotó mikrotubulusokra jellemző [52]. Az acetilált mikrotubulusok megjelenése a metafázisos orsó pólusain arra utalhat, hogy már ebben a korai fázisban megjelölődhetnek a centrális orsó maradványaiból kialakuló középtest struktúrái; még mielőtt a mitózis előrehaladtával ezek a mikrotubulusok valóban kiterjednének a centrális orsó régióira [129].



3.3. ábra. A dUTPáz és az  $\alpha$ -tubulin kolokalizációja 6,5 napos egér blasztocisztákon.

Fluoreszcens immunfestés DNS-re (kék),  $\alpha$ -tubulinra (piros) és dUTPáz enzimre (zöld). Skála: 20  $\mu$ m. A fehérjék kolokalizációja (sárga) leginkább a trofektoderma (TE) sejteinél volt megfigyelhető azokban a sejtstruktúrákban, amelyek az anyai szöveggel való kölcsönhatások és a hosszútávú vezikuláris transzport elősegítésében játszanak szerepet.

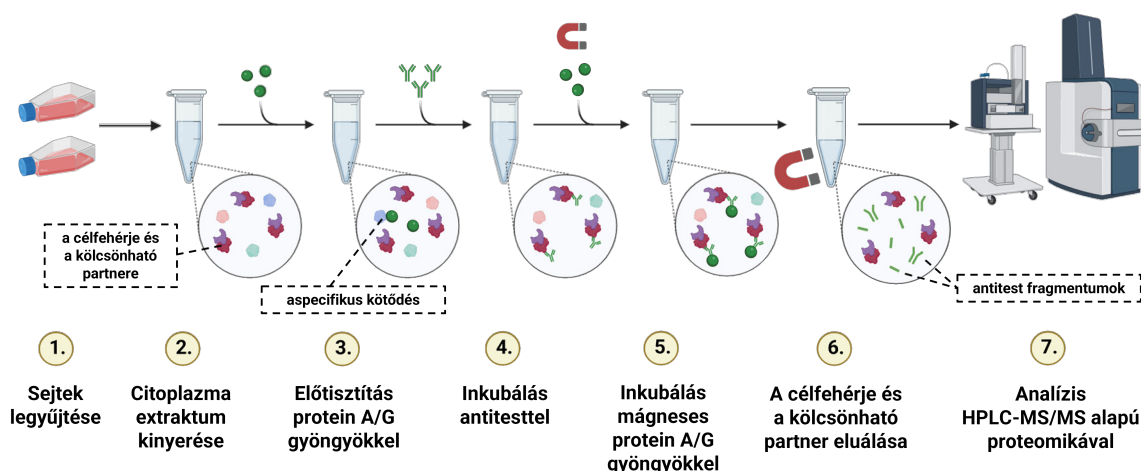
Másrészt a különböző mikrotubulusok poszttranszlációs módosulásai létfontosságúak a blasztomérák kompakciója és polarizációja során, a fejlődés ezen szakaszában kialakuló külső és belső sejtcsoportok funkcionális sokfélesége szempontjából. A külső, poláris réteg, amelyből a trofektoderma keletkezik, ekkor fokozatosan a hámrétegre jellemző tulajdonságokat vesz fel. Ennek eredményeként háromdimenziós polarizációt alakít ki, amely elengedhetetlen a környezettel való interakcióihoz és a méhlepény képzésében betöltött szerepéhez. Ezekben a háromdimenziósan polarizált sejtekben pedig kimutatták, hogy több acetilált mikrotubulus található [103, 104]. Bár e módosítások funkciója a trofektodermában még nem tisztázott, feltételezhető, hogy hozzájárul a hosszútávú irányított anyagszállításhoz a mikrotubulusok mentén [43].

Mindezeket figyelembe véve a dUTPáz enzim és az  $\alpha$ -tubulin kolokalizációjából származó eredmények alapján valószínűsíthető, hogy a dUTPáz szoros összefüggésben áll a folyamatosan alakuló mikrotubuláris hálózattal az embrionális fejlődés során. Mindez különösen érvényes a sejtosztódás és sejt differenciálódás azon szakaszaiban, ahol a sejtek poszttranszlációs módosításokkal, kiváltképpen acetilációval segített aktív citoskeletonális átrendeződést végeznek.

A dUTPáz és az  $\alpha$ -tubulin blasztomérákban megfigyelt együttes jelenléte további kísérletek elvégzését indokolta, a fehérjék közötti kölcsönhatások kimutatására. Ennek érdekében ko-immunprecipitációval kapcsolt LC-MS/MS méréseket végeztünk humán sejtvonalakkal a dUTPáz mitózisban megjelenő kölcsönható partnereinek azonosítására. A választott LC-MS/MS módszer egyik jelentős előnye a konfokális mikroszkóppal szemben, hogy az  $\alpha$ -tubulin mellett olyan fehérjepartnerek is azonosíthatók, amelyek a specifikus fluoreszcens immunfestés során nem voltak kimutathatók.

### 3.2. A dUTPáz enzim mitózisbeli kölcsönható partnereinek azonosítása co-IP kapcsolt LC-MS/MS analízissel

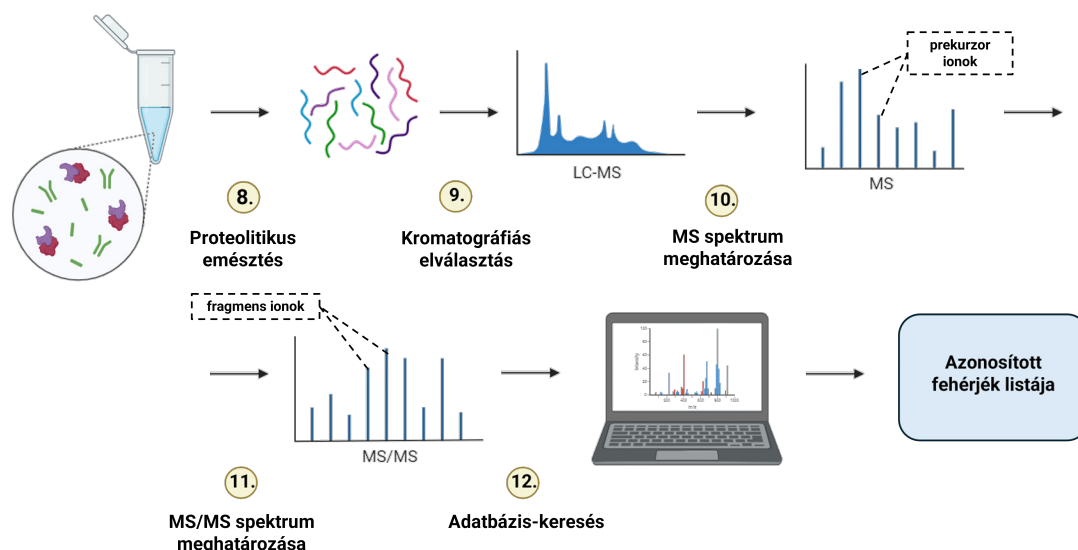
Az egér embriókon végzett fluoreszcens immunfestés eredményei alapján ko-immunprecipitációval kapcsolt LC-MS/MS méréseket végeztünk a dUTPáz kölcsönható partnereinek azonosítására humán HCT 116 sejtvonalon. Mivel a megfelelő interakciók azonosítása szempontjából kritikus volt, hogy a vizsgálatot osztódó sejteken végezzük, ezért a HCT 116 sejteket először G<sub>2</sub> fázisban szinkronizáltuk. A sejtciklus-szinkronizáló szer eltávolítását követően a sejtek jelentős része várhatóan mitózisba lépett. Mivel a dUTPáz sejtmagi izoformája döntő többségben van jelen, és célunk a mitózisbeli kölcsönhatások feltérképezése volt, ezért a vizsgálatokhoz kizárólag a kezelt sejtek citoplazmáját tártuk fel, hogy a sejtmagban lokalizálódó dUTPáz ne befolyásolja a mérési eredményeinket. A mintákat ezután dUTPáz-specifikus antitesttel konjugált mágneses protein A/G gyöngyökkel tisztítottuk (3.4. ábra). A dUTPáz és potenciális kölcsönható partnereit tartalmazó mintákat ezt követően LC-MS/MS analízissel elemeztük (3.5. ábra).



3.4. ábra. A co-IP lépései a célfehérje izolálására és a potenciális kölcsönható partnerek azonosítására.

Ekkor az LC-MS/MS mérés során vizsgált mintáink a következők voltak:

- Két biológiai párhuzamos minta a ko-immunprecipitációból, amelyek a sejtlizátumból antitesttel kinyert dUTPáz enzimet és annak potenciális kölcsönható partnereit tartalmazták.
- Egy negatív kontroll minta, amely a co-IP során antitest inkubáció nélkül került előállításra. Ez a minta a co-IP-ből származó aspecifikus fehérjekötődések kizárását szolgálta.
- Egy üres ("blank") kontroll, amely az LC-MS/MS mérés során nem tartalmazott sejtes mintát, de a mintaelőkészítési és mérési folyamatokon ugyanúgy keresztülment. Ez a kontroll az LC-MS/MS mérés során fellépő aspecifikus fehérjekötődések kiszűrését szolgálta.



3.5. ábra. AZ LC-MS/MS analízis lépései a célfehérje izolálására és a potenciális kölcsönható partnerek azonosítására.

A kapott MS/MS spektrumok adatbázisokkal való összeegyeztetése révén a peptidekből összesen 139 fehérjét azonosítottunk a mintákban, eltérő szekvencia lefedettség arányokkal. A potenciális kölcsönható partnerek feltérképezése érdekében először szűkítettük a találatokat tartalmazó listát, kiszűrve azokat a fehérjéket, amelyek vélhetően nem relevánsak a vizsgálat szempontjából. Ezek közé tartoztak a különböző keratinok, amelyek a mérések során jellegzetes szennyező fehérjeként jelentek meg, valamint a minták emésztéséhez hozzáadott tripszin. Továbbá kizárásra került a 90 kDa-os hősokk fehérje is, amely egyrészt a negatív kontrollban is detektálható volt, másrészt a hősokk fehérjék családja a tömegspektrometriás elemzések során az egyik leggyakrabban előforduló nem-specifikusan kötődő fehérjecsoportként ismert.

Ezt követően a leszűkített eredmények közül kiválasztásra kerültek azok a fehérjék, amelyek legalább 10%-os szekvenciális egyezést mutattak valamelyik kísérleti mintában, tekintve, hogy ez a mértékű fehérje lefedettség bonyolultabb proteom minták esetében elegendő az azonosításhoz [130, 131]. Mivel a vizsgált minták biológiai párhuzamosak, további fontos kritérium volt, hogy a kiválasztott fehérjék mindkét mintában jelen legyenek, még akkor is, ha az egyikben nem éri el a meghatározott szekvenciális lefedettségi értéket. A negatív és üres kontroll minták esetében azonban csak a 10%-nál alacsonyabb egyezést fogadtuk el. Az így kapott listából végül a korábbi kutatási eredmények és az irodalmi áttekintés alapján azok a találatok kerültek kiemelésre, amelyek a sejtosztódáshoz és a mikrotubuláris hálózathoz kapcsolódtak.

Ennek megfelelően a következő fehérjéket sikerült azonosítani: a humán dUTPáz enzimet, az  $\alpha$ - és  $\beta$ -tubulin egy-egy klaszterét, valamint a TRiC komplex hat alegységét (3.1. táblázat). A dUTPáz mindkét mintában kimutatott, magas szekvenciális egye-

zést mutató jelenléte, valamint annak hiánya a kontrollokban, egyértelműen igazolta a ko-immunprecipitáció sikerességét. Ezen felül megerősíti, hogy a további azonosított fehérjék valóban potenciális kölcsönható partnerekként értelmezhetők.

A dUTPáz esetében tapasztalt több mint 40%-os egyezés ugyanakkor azért nem magasabb, mert a kiértékeléshez használt adatbázisban a mitokondriális dUTPáz izoforma szekvenciája szerepel. A dUTPáz mitokondriális izoformájának első 93 aminosav hosszú régiója alkotja a mitokondriális leader szekvenciáját, mely a szekvencia 37%-a és nem része a sejtmagi izoforma szekvenciájának. Az általunk vizsgált mitotikus folyamatokban a mitokondriális izoforma nem játszik szerepet, tehát a dUTPázra vonatkozó lefedettség közel teljes.

| #  | Azonosított fehérjék (139 db)                 | Blank  | Kontroll | Minta 1 | Minta 2 |
|----|-----------------------------------------------|--------|----------|---------|---------|
| 1  | Keratin (P13645)                              | 5,31%  | 50,30%   | 46,40%  | 53,60%  |
| 2  | Keratin (P04264)                              | 14,00% | 41,60%   | 35,90%  | 48,00%  |
| 3  | Tripszin (TRYP_PIG)                           | 25,10% | 46,80%   | 31,20%  | 37,70%  |
| 4  | Keratin (P35527)                              | 9,79%  | 49,90%   | 50,40%  | 70,60%  |
| 5  | Keratin klasztere (P35908 [4])                |        | 41,20%   | 36,90%  | 61,00%  |
| 6  | dUTPáz (P33316)                               |        |          | 44,40%  | 48,40%  |
| 7  | Aktin klasztere (P63261 [7])                  |        | 30,90%   | 31,70%  | 56,80%  |
| 8  | HSP 90-béta (P08238)                          |        | 5,39%    | 12,80%  | 36,50%  |
| 11 | HSP 90-alfa (P07900)                          |        | 1,91%    | 5,76%   | 51,40%  |
| 10 | Tubulin $\beta$ -lánc klasztere (P07437 [4])  |        | 5,41%    | 14,20%  | 57,40%  |
| 15 | Tubulin $\alpha$ -lánc klasztere (P68363 [3]) |        | 6,87%    | 9,09%   | 30,40%  |
| 57 | TRiC $\alpha$ -alegység (P17987)              |        |          |         | 21,40%  |
| 60 | TRiC $\delta$ -alegység (P50991)              |        |          |         | 16,30%  |
| 66 | TRiC $\theta$ -alegység (P50990)              |        |          |         | 9,49%   |
| 67 | TRiC $\beta$ -alegység (P78371)               |        |          |         | 12,30%  |
| 76 | TRiC $\zeta$ -alegység (P40227)               |        |          |         | 11,30%  |
| 88 | TRiC $\eta$ -alegység (Q99832)                |        |          |         | 6,63%   |

### 3.1. táblázat. Az LC-MS/MS analízis során azonosított fehérjék.

A találatok szűrése közel 10%-os szekvencia-lefedettség alapján történt, legalább az egyik kísérleti mintára nézve. Az így kapott listából végül azok a találatok kerültek kiértékelésre, amelyek a sejtszótódáshoz és a mikrotubuláris hálózathoz kapcsolódtak. A dUTPáz kékkel, az erős találatokat zölddel emeltük ki. A fehérrel jelölt fehérjék az eredmények értékelése során kizárásra kerültek.

Az  $\alpha$ - és az  $\beta$ -tubulin esetében több tényezőre vezethető vissza, hogy a fehérjék az analízis során inkább klaszterként, nem pedig különálló fehérjeként jelentek meg. Egyrészt a dUTPáz kölcsönható partnereinek pontos mennyiségi és minőségi ismeretének hiánya miatt a vizsgált minták igen összetett keveréknek tekinthetők. Másrészt a szekvenciális lefedettséget illetően egyes fehérje komplexeknél előfordulhat, hogy a program nem rendelkezett elegendő egyedi peptiddel vagy fragmentummal az adott fehérjéből, így nem volt képes magabiztosan azonosítani azt. Ezek következtében a felismert fehérjék a hasonló karakterisztikájú fehérjékhez lettek csoportosítva.

Ezen felül az eredmények értékelésekor kitűnt, hogy a program a tubulin fehérjét a két minta között eltérő hatékonysággal detektálta, amit a szekvencia-lefedettség nagymértékű különbsége jól mutat. Ez a jelenség több tényező együttes hatásának eredménye lehet. Egyfelől a minták komplexitása befolyásolhatta az emésztés hatékonyságát. Továbbá, mivel a sejtciklus-szinkronizálás sohasem tökéletes, illetve nem egyforma, a sejtek csak megközelítőleg lehettek a mitózis állapotában. Ebből adódóan a fehérje eltérő mennyiségben lehetett jelen a mintákban, ami különböző mértékű peptidkimutatáshoz és lefedettséghez vezethetett.

Mindazonáltal, ezek figyelembevételével is megállapítható, hogy mind az  $\alpha$ -, mind a  $\beta$ -tubulin megfelelően erős találatként szerepel az analízisben, így potenciálisan kölcsönható partnerei lehetnek a humán dUTPáz enzimnek. Az eredményt tovább erősíti a dUTPáz és a tubulin váz kolokalizációja, amelyet egyértelműen kimutattunk az egér embriókon végzett fluoreszcens immunfestés során.

Az  $\alpha$ - és a  $\beta$ -tubulin mellett a mikrotubuláris hálózat szempontjából jelentős fehérjetalálatként azonosítottuk a TRiC komplex hat alegységét, amelyből öt érte el a kívánt szekvencia lefedettséget. Ennek ellenére a hatodik alegység is releváns találatként értelmezhető, hiszen a TRiC komplex része. Bár ezek az alegységek csupán az egyik mintában kerültek detektálásra, ez valószínűleg ismételten a sejtciklus-szinkronizáció nem 100%-os hatékonyságának tudható be.

Az azonosított TriC komplex egy a nyolc alegységből álló eukarióta chaperon, amely számos citoszolikus fehérje, köztük a tubulin és az aktin natív konformációjának kialakításában is kulcsszerepet játszik [35, 132]. Eredményeinket tovább erősíti, hogy az egérfélék családjába tartozó virális dUTPáz homológgal, a citomegalovírus M72-vel is kimutatták a TRiC komplex kölcsönhatását [133]. Továbbá ismert, hogy az M72 nem funkcionális enzim, és hiányzik belőle az az öt jellemző motívum, amelyek az enzimatis aktivitáshoz szükségesek [133, 134].

Mindezekből arra lehet következtetni, hogy a humán dUTPáz kölcsönhat mind a tubulin alegységek feltekeredését szolgáló TRiC komplex fehérjével, mind az  $\alpha$ - és a  $\beta$ -tubulinnal. A két fehérje közötti interakció pontos feltérképezéséhez további kísérletek elvégzése szükséges.

## 4. fejezet

# Összefoglalás

A DNS stabilitása elengedhetetlen a genetikai információ pontos átörökítéséhez és a sejtek normál működésének fenntartásához, ezért a sejtek több mechanizmussal védik a DNS integritását. Ezen mechanizmusok közül a dUTPáz enzim központi szerepet játszik azáltal, hogy megelőzi az uracil hibás beépülését a DNS-be, ezzel hozzájárulva a genomi integritás fenntartásához és a DNS-replikáció megbízhatóságához. Kutatócsoportunk jelenlegi eredményei arra utalnak, hogy a dUTPáz enzim más sejtfunkciókat is elláthat, és aktív résztvevője lehet a sejtosztódás és az embrionális fejlődés kritikus folyamatainak. Éppen ezért dolgozatom céljából ezen folyamatok részletes vizsgálatát tűztem ki.

Kutatásaim során immunfluoreszcens festés alkalmazásával vizsgáltam a dUTPáz enzim lokalizációját egér embriókon, az embrionális fejlődés különböző szakaszaiban. Megfigyeltem, hogy a dUTPáz sejten belüli eloszlása változik az embriók fejlődési állapotai során. Míg 3,5 napos blasztocisztákban a dUTPáz kizárólag a citoplazmában lokalizálódott, addig a 4,5 napos blasztocisztákban már sejtmagi jelenléte is megfigyelhető volt. A 6,5 napos blasztocisztákban, amelyek megkezdték a polarizáció folyamatát, a trofektoderma sejteiben az enzim csak a citoplazmában volt detektálható, míg az ICM sejteiben citoplazmás és sejtmagi lokalizáció egyaránt megjelent. Mivel a két sejtípus mitotikus aktivitása eltér, ezért ez a tényező is befolyásolhatja az enzim sejtmagból való kizáródását és citoplazmás lokalizációját. Kiemelendő, hogy a trofektoderma sejteiben a lokalizáció jellegzetes szálal mintázatot mutatott, mely hasonló volt a mikrotubuláris hálózathoz, ezért további kísérleteim során nemcsak a dUTPáz, hanem az  $\alpha$ -tubulint is jelöltem fluoreszcens festéssel.

Ezen kísérleteim során kolokalizációt figyeltem meg a dUTPáz és a mikrotubuláris hálózat között. Korai blasztociszta állapotban a metafázisos, valamint a centrális orsó struktúráiban, míg későbbi stádiumban a trofektoderma sejteiben detektáltam a dUTPáz és az  $\alpha$ -tubulin együttes jelenlétét. Feltételezhető, hogy a megfigyelt struktúrák főként acetilált mikrotubulusokból épülnek fel.

A dUTPáz és az  $\alpha$ -tubulin blasztomérákban megfigyelt mitózisbeli együttes jelenléte felvetette az enzim és a mikrotubulusok közötti kölcsönhatás lehetőségét, ami további kísérletek elvégzését indokolta. Ennek érdekében ko-immunprecipitációval kapcsolt LC-MS/MS méréseket végeztem humán sejtvonalakkal a két fehérje közötti kölcsönhatás kimutatására. A megfelelő interakciók azonosítása szempontjából kritikus volt, hogy a vizsgálatot osztódó sejteken végezzük, valamint a sejtmagban lokalizálódó dUTPáz ne befolyásolja a eredményeket, ezért a méréseket mitózisban dúsított sejtek citoplazma feltárással végeztem el.

Az analízis során mind az  $\alpha$ -, mind a  $\beta$ -tubulin megfelelően erős találatként szerepelt, amely megerősíti az egér embriókon végzett fluoreszcens immunfestés során korábban kimutatott dUTPáz és a tubulin váz kolokalizációját. Továbbá a TRiC komplex több alegységét is azonosítottam, amely a tubulinok natív konformációjának kialakításáért felelős.

Eredményeim arra utalnak, hogy a dUTPáz enzim szerepe túlmutat az uracil beépülésének megelőzésén, és fontos szerepet játszhat a sejtosztódás és az embrionális fejlődés során. A dUTPáz és a tubulin közötti interakciók részletes feltérképezése további kutatást igényel, amely célja az enzim eddig ismeretlen biológiai funkcióinak alaposabb vizsgálata. E funkciók és kölcsönhatások részletesebb megértése nemcsak az alap kutatás, hanem a terápiás alkalmazások szempontjából is kiemelkedő jelentőséggel bír. Mivel a dUTPáz és a mikrotubuláris hálózat kapcsolata esszenciális lehet a sejtosztódás kritikus fázisaiban, így a kölcsönhatás ígéretes célpont lehet daganatos megbetegedések kezelésében. A gyakorlatban alkalmazott antimitotikus kemoterápiás szerek esetén gyakori a meglévő vagy kialakuló gyógyszer-rezisztencia, így minden új, a mikrotubulusok dinamikáját befolyásoló potenciális kismolekulás inhibitor tovább növelheti a terápiák hatékonyságát.

# Irodalomjegyzék

- [1] Béata G Vértessy and Judit Tóth. Keeping uracil out of dna: physiological role, structure and catalytic mechanism of dutpases. *Accounts of chemical research*, 42(1):97–106, 2009.
- [2] Robert Ivarie. Thymine methyls and dna–protein interactions. *Nucleic acids research*, 15(23):9975–9983, 1987.
- [3] Elena A Kouzminova and Andrei Kuzminov. Chromosomal fragmentation in dutpase-deficient mutants of escherichia coli and its recombinational repair. *Molecular microbiology*, 51(5):1279–1295, 2004.
- [4] Robert D Ladner. The role of dutpase and uracil-dna repair in cancer chemotherapy. *Current Protein and Peptide Science*, 2(4):361–370, 2001.
- [5] Csaba Kerepesi, Judit E Szabó, Veronika Papp-Kádár, Orsolya Dobay, Dóra Szabó, Vince Grolmusz, and Beáta G Vértessy. Life without dutpase. *Frontiers in microbiology*, 7:1768, 2016.
- [6] HIYAM H el Hajj, H Zhang, and BERNARD Weiss. Lethality of a dut (deoxyuridine triphosphatase) mutation in escherichia coli. *Journal of bacteriology*, 170(3):1069–1075, 1988.
- [7] Michael H Gadsden, EM McIntosh, John C Game, Paula J Wilson, and RH Haynes. dutp pyrophosphatase is an essential enzyme in saccharomyces cerevisiae. *The EMBO journal*, 12(11):4425–4431, 1993.
- [8] Jonathan U Peled, Fei Li Kuang, Maria D Iglesias-Ussel, Sergio Roa, Susan L Kalis, Myron F Goodman, and Matthew D Scharff. The biochemistry of somatic hypermutation. *Annu. Rev. Immunol.*, 26(1):481–511, 2008.
- [9] Phuong Pham, Ronda Bransteitter, and Myron F Goodman. Reward versus risk: Dna cytidine deaminases triggering immunity and disease. *Biochemistry*, 44(8):2703–2715, 2005.
- [10] Nan Yan, Elizabeth O’Day, Lee Adam Wheeler, Alan Engelman, and Judy Lieberman. Hiv dna is heavily uracilated, which protects it from autointegration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(22):9244–9249, 2011.
- [11] Hajnalka Laura Pálincás, Gergely Attila Rácz, Zoltán Gál, Orsolya Ivett Hoffmann, Gergely Tihanyi, Gergely Róna, Elen Gócza, László Hiripi, and Beáta G Vértessy. Crispr/cas9-mediated knock-out of dutpase in mice leads to early embryonic lethality. *Biomolecules*, 9(4):136, 2019.
- [12] Alba Luengo, Dan Y Gui, and Matthew G Vander Heiden. Targeting metabolism for cancer therapy. *Cell chemical biology*, 24(9):1161–1180, 2017.

- [13] Michele Visentin, Rongbao Zhao, and I David Goldman. The antifolates. *Hematology/Oncology Clinics*, 26(3):629–648, 2012.
- [14] Zachary E Stine, Zachary T Schug, Joseph M Salvino, and Chi V Dang. Targeting cancer metabolism in the era of precision oncology. *Nature reviews Drug discovery*, 21(2):141–162, 2022.
- [15] James Chon, Patrick J Stover, and Martha S Field. Targeting nuclear thymidylate biosynthesis. *Molecular aspects of medicine*, 53:48–56, 2017.
- [16] Martha M Zarou, Alexei Vazquez, and G Vignir Helgason. Folate metabolism: a re-emerging therapeutic target in haematological cancers. *Leukemia*, 35(6):1539–1551, 2021.
- [17] Maria E Kitchens, Antonia M Forsthoefel, Karen W Barbour, H Trent Spencer, and Franklin G Berger. Mechanisms of acquired resistance to thymidylate synthase inhibitors: the role of enzyme stability. *Molecular pharmacology*, 56(5):1063–1070, 1999.
- [18] Christine E Canman, Theodore S Lawrence, Donna S Shewach, Hsin-Yi Tang, and Jonathan Maybaum. Resistance to fluorodeoxyuridine-induced dna damage and cytotoxicity correlates with an elevation of deoxyuridine triphosphatase activity and failure to accumulate deoxyuridine triphosphate. *Cancer research*, 53(21):5219–5224, 1993.
- [19] G Wynne Aherne and Sherael Brown. The role of uracil misincorporation in thymineless death. In *Antifolate drugs in cancer therapy*, pages 409–421. Springer, 1999.
- [20] Evan M McIntosh and Robert H Haynes. dudp pyrophosphatase as a potential target for chemotherapeutic drug development. *Acta Biochimica Polonica*, 44(2):159–171, 1997.
- [21] Kaku Saito, Hirotaka Nagashima, Kazuharu Noguchi, Kunihiro Yoshisue, Tatsushi Yokogawa, Eiji Matsushima, Takeshi Tahara, and Shigeru Takagi. First-in-human, phase i dose-escalation study of single and multiple doses of a first-in-class enhancer of fluoropyrimidines, a dudpase inhibitor (tas-114) in healthy male volunteers. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 73:577–583, 2014.
- [22] Wakako Yano, Tatsushi Yokogawa, Takeshi Wakasa, Keisuke Yamamura, Akio Fujioka, Kunihiro Yoshisue, Eiji Matsushima, Seiji Miyahara, Hitoshi Miyakoshi, Junko Taguchi, et al. Tas-114, a first-in-class dual dudpase/dpd inhibitor, demonstrates potential to improve therapeutic efficacy of fluoropyrimidine-based chemotherapy. *Molecular cancer therapeutics*, 17(8):1683–1693, 2018.
- [23] Nobuyuki Yamamoto, Hidetoshi Hayashi, David Planchard, Teresa Morán, Vanesa Gregorc, Jonathan Dowell, Hiroshi Sakai, Kiyotaka Yoh, Makoto Nishio, Alexis B Cortot, et al. A randomized, phase 2 study of deoxyuridine triphosphatase inhibitor, tas-114, in combination with s-1 versus s-1 alone in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Investigational New Drugs*, 38:1588–1597, 2020.
- [24] Akihito Kawazoe, Daisuke Takahari, Chin Keisho, Yoshiaki Nakamura, Takashi Ikeno, Masashi Wakabayashi, Shogo Nomura, Hitomi Tamura, Miki Fukutani, Nami Hirano, et al. A multicenter phase ii study of tas-114 in combination with s-1 in patients with pretreated advanced gastric cancer (epoc1604). *Gastric Cancer*, 24:190–196, 2021.
- [25] Harry J Long. Paclitaxel (taxol): a novel anticancer chemotherapeutic drug. In *Mayo Clinic Proceedings*, volume 69, pages 341–345. Elsevier, 1994.

- [26] Katherine L Schaefer. Ppar $\gamma$  inhibitors as novel tubulin-targeting agents. *PPAR research*, 2008(1):785405, 2008.
- [27] Mary Ann Jordan and Leslie Wilson. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature reviews cancer*, 4(4):253–265, 2004.
- [28] MA Jordan. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 2(1):1–17, 2002.
- [29] Frans CS Ramaekers and Fred T Bosman. The cytoskeleton and disease. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 204(4):351–354, 2004.
- [30] Jesús Avila. Microtubule functions. *Life sciences*, 50(5):327–334, 1992.
- [31] P Liang and Thomas H MacRae. Molecular chaperones and the cytoskeleton. *Journal of cell science*, 110(13):1431–1440, 1997.
- [32] Satish Bodakuntla, AS Jijumon, Cristopher Villablanca, Christian Gonzalez-Billault, and Carsten Janke. Microtubule-associated proteins: structuring the cytoskeleton. *Trends in cell biology*, 29(10):804–819, 2019.
- [33] Arshad Desai and Timothy J Mitchison. Microtubule polymerization dynamics. *Annual review of cell and developmental biology*, 13(1):83–117, 1997.
- [34] Eva Nogales, Michael Whittaker, Ronald A Milligan, and Kenneth H Downing. High-resolution model of the microtubule. *Cell*, 96(1):79–88, 1999.
- [35] Caixuan Liu, Mingliang Jin, Shutian Wang, Wenyu Han, Qiaoyu Zhao, Yifan Wang, Cong Xu, Lei Diao, Yue Yin, Chao Peng, et al. Pathway and mechanism of tubulin folding mediated by tric/cct along its atpase cycle revealed using cryo-em. *Communications Biology*, 6(1):531, 2023.
- [36] Lars Skjærven, Jorge Cuellar, Aurora Martinez, and José María Valpuesta. Dynamics, flexibility, and allostery in molecular chaperonins. *FEBS letters*, 589(19):2522–2532, 2015.
- [37] F Ulrich Hartl, Andreas Bracher, and Manajit Hayer-Hartl. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 475(7356):324–332, 2011.
- [38] Roy R Gould and Gary G Borisy. The pericentriolar material in chinese hamster ovary cells nucleates microtubule formation. *The Journal of cell biology*, 73(3):601–615, 1977.
- [39] Paul Chang and Tim Stearns.  $\delta$ -tubulin and  $\gamma$ -tubulin: two new human centrosomal tubulins reveal new aspects of centrosome structure and function. *Nature cell biology*, 2(1):30–35, 2000.
- [40] G Gemma Stathatos, Jessica EM Dunleavy, Jennifer Zenker, and Moira K O’Bryan. Delta and epsilon tubulin in mammalian development. *Trends in Cell Biology*, 31(9):774–787, 2021.
- [41] Hermann Schwarzenbacher, Johann Burgstaller, Franz R Seefried, Christine Wurmser, Monika Hilbe, Simone Jung, Christian Fuerst, Nora Dinhopf, Herbert Weissenböck, Birgit Fuerst-Waltl, et al. A missense mutation in tubd1 is associated with high juvenile mortality in braunvieh and fleckvieh cattle. *BMC genomics*, 17:1–13, 2016.
- [42] Susan K Dutcher, Naomi S Morrisette, Andrea M Preble, Craig Rackley, and John Stanga.  $\epsilon$ -tubulin is an essential component of the centriole. *Molecular biology of the cell*, 13(11):3859–3869, 2002.

- [43] Heide Schatten and Qing-Yuan Sun. Posttranslationally modified tubulins and other cytoskeletal proteins: their role in gametogenesis, oocyte maturation, fertilization and pre-implantation embryo development. *Posttranslational Protein Modifications in the Reproductive System*, pages 57–87, 2014.
- [44] Matthias Mann and Ole N Jensen. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature biotechnology*, 21(3):255–261, 2003.
- [45] Hongjun Jin and Richard C Zangar. Protein modifications as potential biomarkers in breast cancer. *Biomarker insights*, 4:BMI-S2557, 2009.
- [46] Katsutaro Morino, Kitt Falk Petersen, Sylvie Dufour, Douglas Befroy, Jared Frattini, Nadine Shatzkes, Susanne Neschen, Morris F White, Stefan Bilz, Saki Sono, et al. Reduced mitochondrial density and increased irs-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *The Journal of clinical investigation*, 115(12):3587–3593, 2005.
- [47] C-X Gong, F Liu, I Grundke-Iqbal, and K Iqbal. Post-translational modifications of tau protein in alzheimer’s disease. *Journal of neural transmission*, 112:813–838, 2005.
- [48] Brittany MacTaggart and Anna Kashina. Posttranslational modifications of the cytoskeleton. *Cytoskeleton*, 78(4):142–173, 2021.
- [49] Dorota Wloga and Jacek Gaertig. Post-translational modifications of microtubules. *Journal of cell science*, 123(20):3447–3455, 2010.
- [50] Carsten Janke and Jeannette Chloë Bulinski. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nature reviews Molecular cell biology*, 12(12):773–786, 2011.
- [51] Jennetta W Hammond, Dawen Cai, and Kristen J Verhey. Tubulin modifications and their cellular functions. *Current opinion in cell biology*, 20(1):71–76, 2008.
- [52] Gerald Schatten, Calvin Simerly, David J Asai, Ester Szöke, Peter Cooke, and Heide Schatten. Acetylated  $\alpha$ -tubulin in microtubules during mouse fertilization and early development. *Developmental biology*, 130(1):74–86, 1988.
- [53] Xiang-Jiao Yang and Edward Seto. Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications. *Molecular cell*, 31(4):449–461, 2008.
- [54] STEVEN W L’Hernault and Joel L Rosenbaum. Reversal of the posttranslational modification on chlamydomonas flagellar alpha-tubulin occurs during flagellar resorption. *The Journal of cell biology*, 100(2):457–462, 1985.
- [55] Gianni Piperno, Michel LeDizet, and XJ Chang. Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture. *The Journal of cell biology*, 104(2):289–302, 1987.
- [56] Nurit Wolf, Cathy L Regan, and Margaret T Fuller. Temporal and spatial pattern of differences in microtubule behaviour during drosophila embryogenesis revealed by distribution of a tubulin isoform. *Development*, 102(2):311–324, 1988.
- [57] Yuliya Zilberman, Christoph Ballestrem, Letizia Carramusa, Ralph Mazitschek, Saadi Khochbin, and Alexander Bershadsky. Regulation of microtubule dynamics by inhibition of the tubulin deacetylase hdac6. *Journal of cell science*, 122(19):3531–3541, 2009.

- [58] Steven W L'Hernault and Joel L Rosenbaum. Chlamydomonas. alpha.-tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the. epsilon.-amino group of a lysine. *Biochemistry*, 24(2):473–478, 1985.
- [59] Lin Li and Xiang-Jiao Yang. Tubulin acetylation: responsible enzymes, biological functions and human diseases. *Cellular and molecular life sciences*, 72:4237–4255, 2015.
- [60] Chih-Wen Chu, Fajian Hou, Junmei Zhang, Lilian Phu, Alex V Loktev, Donald S Kirkpatrick, Peter K Jackson, Yingming Zhao, and Hui Zou. A novel acetylation of  $\beta$ -tubulin by san modulates microtubule polymerization via down-regulating tubulin incorporation. *Molecular biology of the cell*, 22(4):448–456, 2011.
- [61] Paul T Conduit, Alan Wainman, and Jordan W Raff. Centrosome function and assembly in animal cells. *Nature reviews Molecular cell biology*, 16(10):611–624, 2015.
- [62] Rebecca Heald, Régis Tournebise, Anja Habermann, Eric Karsenti, and Anthony Hyman. Spindle assembly in xenopus egg extracts: respective roles of centrosomes and microtubule self-organization. *The Journal of cell biology*, 138(3):615–628, 1997.
- [63] Alexey Khodjakov, Richard W Cole, Berl R Oakley, and Conly L Rieder. Centrosome-independent mitotic spindle formation in vertebrates. *Current Biology*, 10(2):59–67, 2000.
- [64] Gary J Mack, Yongchun Ou, and JB Rattner. Integrating centrosome structure with protein composition and function in animal cells. *Microscopy Research and Technique*, 49(5):409–419, 2000.
- [65] Tiago J Dantas. Centrosomes and cilia: always at the center of the action. *Communications biology*, 3(1):785, 2020.
- [66] Mijung Kwon, Susana A Godinho, Namrata S Chandhok, Neil J Ganem, Ammar Azioune, Manuel Thery, and David Pellman. Mechanisms to suppress multipolar divisions in cancer cells with extra centrosomes. *Genes & development*, 22(16):2189–2203, 2008.
- [67] Dhivya Kumar and Jeremy Reiter. How the centriole builds its cilium: of mothers, daughters, and the acquisition of appendages. *Current opinion in structural biology*, 66:41–48, 2021.
- [68] Y Bobinnec, A Khodjakov, LM Mir, CL Rieder, B Edde, and M Bornens. Centriole disassembly in vivo and its effect on centrosome structure and function in vertebrate cells. *The Journal of cell biology*, 143(6):1575–1589, 1998.
- [69] Danwei Huangfu, Aimin Liu, Andrew S Rakeman, Noel S Murcia, Lee Niswander, and Kathryn V Anderson. Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature*, 426(6962):83–87, 2003.
- [70] Kinga M Bujakowska, Qin Liu, and Eric A Pierce. Photoreceptor cilia and retinal ciliopathies. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 9(10):a028274, 2017.
- [71] Kara B Lukasiewicz and Wilma L Lingle. Aurora a, centrosome structure, and the centrosome cycle. *Environmental and molecular mutagenesis*, 50(8):602–619, 2009.
- [72] Matthieu Piel, Pablo Meyer, Alexey Khodjakov, Conly L Rieder, and Michel Bornens. The respective contributions of the mother and daughter centrioles to centrosome activity and behavior in vertebrate cells. *The Journal of cell biology*, 149(2):317–330, 2000.

- [73] Jens S Andersen, Christopher J Wilkinson, Thibault Mayor, Peter Mortensen, Erich A Nigg, and Matthias Mann. Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature*, 426(6966):570–574, 2003.
- [74] Yingmei Wang, Ping Ji, Jinsong Liu, Russell R Broaddus, Fengxia Xue, and Wei Zhang. Centrosome-associated regulators of the g 2/m checkpoint as targets for cancer therapy. *Molecular cancer*, 8:1–13, 2009.
- [75] Joao Miguel da Conceição Alves-Cruzeiro, Ruben Nogales-Cadenas, and Alberto Domingo Pascual-Montano. Centrosomedb: a new generation of the centrosomal proteins database for human and drosophila melanogaster. *Nucleic acids research*, 42(D1):D430–D436, 2014.
- [76] Jeffrey B Woodruff, Oliver Wueseke, and Anthony A Hyman. Pericentriolar material structure and dynamics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1650):20130459, 2014.
- [77] Eileen O’Toole, Garrett Greenan, Karen I Lange, Martin Srayko, and Thomas Müller-Reichert. The role of  $\gamma$ -tubulin in centrosomal microtubule organization. *PloS one*, 7(1):e29795, 2012.
- [78] Robert E Palazzo, Jacalyn M Vogel, Bradley J Schnackenberg, Dawn R Hull, and Xingyong Wu. Centrosome maturation. *Current topics in developmental biology*, 49:449–470, 1999.
- [79] Robert Mahen and Ashok R Venkitaraman. Pattern formation in centrosome assembly. *Current opinion in cell biology*, 24(1):14–23, 2012.
- [80] Nigel Chaffey. Alberts, b., johnson, a., lewis, j., raff, m., roberts, k. and walter, p. molecular biology of the cell. 4th edn., 2003.
- [81] Bruce Alberts, Dennis Bray, Karen Hopkin, Alexander D Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. *Essential cell biology*. Garland Science, 2015.
- [82] Matthieu Piel, Pablo Meyer, Alexey Khodjakov, Conly L Rieder, and Michel Bornens. The respective contributions of the mother and daughter centrioles to centrosome activity and behavior in vertebrate cells. *The Journal of cell biology*, 149(2):317, 2000.
- [83] Juan Jesus Vicente and Linda Wordeman. Mitosis, microtubule dynamics and the evolution of kinesins. *Experimental cell research*, 334(1):61, 2015.
- [84] Torsten Wittmann, Anthony Hyman, and Arshad Desai. The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nature cell biology*, 3(1):E28–E34, 2001.
- [85] Hikoichi Sakai. Microtubules in mitosis. *Cell structure and function*, 19(2):57–62, 1994.
- [86] E Sheldon and P Wadsworth. Microinjection of biotin-tubulin into anaphase cells induces transient elongation of kinetochore microtubules and reversal of chromosome-to-pole motion. *The Journal of cell biology*, 116(6):1409–1420, 1992.
- [87] Conly L Rieder, Edwin A Davison, LC Jensen, Lynne Cassimeris, and Edward D Salmon. Oscillatory movements of monooriented chromosomes and their position relative to the spindle pole result from the ejection properties of the aster and half-spindle. *The Journal of cell biology*, 103(2):581–591, 1986.

- [88] Gary J Gorbsky, Paul J Sammak, and Gary G Borisy. Chromosomes move poleward in anaphase along stationary microtubules that coordinately disassemble from their kinetochore ends. *The Journal of cell biology*, 104(1):9–18, 1987.
- [89] Sharat Gadde and Rebecca Heald. Mechanisms and molecules of the mitotic spindle. *Current Biology*, 14(18):R797–R805, 2004.
- [90] Aaron F Straight and Christine M Field. Microtubules, membranes and cytokinesis. *Current Biology*, 10(20):R760–R770, 2000.
- [91] Yoji Kojima, Oliver H Tam, and Patrick PL Tam. Timing of developmental events in the early mouse embryo. In *Seminars in cell & developmental biology*, volume 34, pages 65–75. Elsevier, 2014.
- [92] Juan Carlos Fierro-González, Melanie D White, Juan Carlos Silva, and Nicolas Plachta. Cadherin-dependent filopodia control preimplantation embryo compaction. *Nature cell biology*, 15(12):1424–1433, 2013.
- [93] Celeste M Nelson. Mechanical control of cell differentiation: Insights from the early embryo. *Annual review of biomedical engineering*, 24(1):307–322, 2022.
- [94] CA Ziomek and MH Johnson. Cell surface interaction induces polarization of mouse 8-cell blastomeres at compaction. *Cell*, 21(3):935–942, 1980.
- [95] Martin H Johnson and Carol Ann Ziomek. Cell interactions influence the fate of mouse blastomeres undergoing the transition from the 16-to the 32-cell stage. *Developmental Biology*, 95(1):211–218, 1983.
- [96] AJ Copp. Interaction between inner cell mass and trophectoderm of the mouse blastocyst: Ii. the fate of the polar trophectoderm. *Development*, 51(1):109–120, 1979.
- [97] Anna Piliszek, Joanna B Grabarek, Stephen R Frankenberg, and Berenika Plusa. Cell fate in animal and human blastocysts and the determination of viability. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 22(10):681–690, 2016.
- [98] Katsuyoshi Takaoka and Hiroshi Hamada. Cell fate decisions and axis determination in the early mouse embryo. *Development*, 139(1):3–14, 2012.
- [99] Pedro Madrigal, Siwei Deng, Yuliang Feng, Stefania Milioti, Kim Jee Goh, Reshma Nibhani, Rodrigo Grandy, Anna Osnato, Daniel Ortmann, Stephanie Brown, et al. Epigenetic and transcriptional regulations prime cell fate before division during human pluripotent stem cell differentiation. *Nature Communications*, 14(1):405, 2023.
- [100] Theodore P Rasmussen. Embryonic stem cell differentiation: a chromatin perspective. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1:1–7, 2003.
- [101] Janet Rossant and Patrick PL Tam. Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. 2009.
- [102] Linheng Li and Hans Clevers. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *science*, 327(5965):542–545, 2010.

- [103] Evelyn Houlston and Bernard Maro. Posttranslational modification of distinct microtubule subpopulations during cell polarization and differentiation in the mouse preimplantation embryo. *The Journal of cell biology*, 108(2):543–551, 1989.
- [104] Geraldine B Quinones, Barbara A Danowski, Anjan Devaraj, Vimla Singh, and Lee A Ligon. The posttranslational modification of tubulin undergoes a switch from detyrosination to acetylation as epithelial cells become polarized. *Molecular biology of the cell*, 22(7):1045–1057, 2011.
- [105] Aurélien Courtois, Melina Schuh, Jan Ellenberg, and Takashi Hiiragi. The transition from meiotic to mitotic spindle assembly is gradual during early mammalian development. *Journal of Cell Biology*, 198(3):357–370, 2012.
- [106] Heide Schatten, Gerald Schatten, Daniel Mazia, Ron Balczon, and Calvin Simerly. Behavior of centrosomes during fertilization and cell division in mouse oocytes and in sea urchin eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(1):105–109, 1986.
- [107] D Szollosi, Patricia Calarco, and RP Donahue. Absence of centrioles in the first and second meiotic spindles of mouse oocytes. *Journal of cell science*, 11(2):521–541, 1972.
- [108] G Manandhar, P Sutovsky, HC Joshi, T Stearns, and G Schatten. Centrosome reduction during mouse spermiogenesis. *Developmental biology*, 203(2):424–434, 1998.
- [109] JACEK Z Kubiak. Cell cycle-dependent behavior of microtubules in hybrids of mouse oocytes and blastomeres. *International Journal of Developmental Biology*, 35(4):421–427, 2004.
- [110] Catherine Gueth-Hallonet, Claude Antony, Joël Aghion, Angelica Santa-Maria, Isabelle Lajoie-Mazenc, Michel Wright, and Bernard Maro.  $\gamma$ -tubulin is present in acentriolar mtocs during early mouse development. *Journal of cell science*, 105(1):157–166, 1993.
- [111] Jer-Sheng Lin and Erh-Min Lai. Protein–protein interactions: co-immunoprecipitation. *Bacterial protein secretion systems: Methods and protocols*, pages 211–219, 2017.
- [112] Eric M Phizicky and Stanley Fields. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiological reviews*, 59(1):94–123, 1995.
- [113] Lyubomir T Vassilev, Christian Tovar, Shaoqing Chen, Dejan Knezevic, Xiaolan Zhao, Hongmao Sun, David C Heimbrook, and Li Chen. Selective small-molecule inhibitor reveals critical mitotic functions of human cdk1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(28):10660–10665, 2006.
- [114] Jiapeng Li and Hao-Jie Zhu. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (lc-ms/ms)-based proteomics of drug-metabolizing enzymes and transporters. *Molecules*, 25(11):2718, 2020.
- [115] Gülkiz Baytek, Oliver Popp, Philipp Mertins, and Baris Tursun. Robust co-immunoprecipitation with mass spectrometry for caenorhabditis elegans using solid-phase enhanced sample preparation. *Biotechniques*, 72(5):175–184, 2022.
- [116] Alemayehu Godana Birhanu. Mass spectrometry-based proteomics as an emerging tool in clinical laboratories. *Clinical Proteomics*, 20(1):32, 2023.
- [117] Robert D Ladner, Dean E McNulty, Steven A Carr, Gerald D Roberts, and Salvatore J Caradonna. Characterization of distinct nuclear and mitochondrial forms of human deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase (). *Journal of Biological Chemistry*, 271(13):7745–7751, 1996.

- [118] Gergely Rona, Mary Marfori, Máté Borsos, Ildiko Scheer, Eniko Takács, Judit Toth, Fruzsina Babos, Anna Magyar, Anna Erdei, Zoltán Bozóky, et al. Phosphorylation adjacent to the nuclear localization signal of human dntpase abolishes nuclear import: structural and mechanistic insights. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 69(12):2495–2505, 2013.
- [119] Gergely Róna, Máté Borsos, Jonathan J Ellis, Ahmed M Mehdi, Mary Christie, Zsuzsanna Környei, Máté Neubrandt, Judit Tóth, Zoltán Bozóky, László Buday, et al. Dynamics of re-constitution of the human nuclear proteome after cell division is regulated by nls-adjacent phosphorylation. *Cell cycle*, 13(22):3551–3564, 2014.
- [120] Robert D Ladner and Salvatore J Caradonna. The human dntpase gene encodes both nuclear and mitochondrial isoforms: differential expression of the isoforms and characterization of a cDNA encoding the mitochondrial species. *Journal of Biological Chemistry*, 272(30):19072–19080, 1997.
- [121] Beverly A Tinkelenberg, William Fazzone, Frank J Lynch, and Robert D Ladner. Identification of sequence determinants of human nuclear dntpase isoform localization. *Experimental cell research*, 287(1):39–46, 2003.
- [122] Michelle T Harreman, Trisha M Kline, Heidi G Milford, M Beth Harben, Alec E Hodel, and Anita H Corbett. Regulation of nuclear import by phosphorylation adjacent to nuclear localization signals. *Journal of Biological Chemistry*, 279(20):20613–20621, 2004.
- [123] Robert D Ladner, Steven A Carr, Michael J Huddleston, Dean E McNulty, and Salvatore J Caradonna. Identification of a consensus cyclin-dependent kinase phosphorylation site unique to the nuclear form of human deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase ( ). *Journal of Biological Chemistry*, 271(13):7752–7757, 1996.
- [124] Nikolett Nagy, Nóra Hádinger, Otília Tóth, Gergely Attila Rácz, Tímea Pintér, Zoltán Gál, Martin Urbán, Elen Gócza, László Hiripi, László Acsády, et al. Characterization of dntpase expression in mouse postnatal development and adult neurogenesis. *Scientific Reports*, 14(1):13139, 2024.
- [125] P Barlow, DAJ Owen, and Chris Graham. Dna synthesis in the preimplantation mouse embryo. *Development*, 27(2):431–445, 1972.
- [126] Gábor Merényi, Júlia Kovári, Judit Tóth, Enik Takács, Imre Zagyva, Anna Erdei, and Beáta G Vértessy. Cellular response to efficient dntpase RNAi silencing in stable HeLa cell lines perturbs expression levels of genes involved in thymidylate metabolism. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 30(6):369–390, 2011.
- [127] GM Harlow and P Quinn. Development of preimplantation mouse embryos in vivo and in vitro. *Australian journal of biological sciences*, 35(2):187–194, 1982.
- [128] P Quinn and RG Wales. The effect of culture in vitro on the levels of adenosine triphosphate in preimplantation mouse embryos. *Reproduction*, 32(2):231–241, 1973.
- [129] William M Saxton and J Richard McIntosh. Interzone microtubule behavior in late anaphase and telophase spindles. *The Journal of cell biology*, 105(2):875–886, 1987.
- [130] Tony Ly, Arlene Whigham, Rosemary Clarke, Alejandro J Brenes-Murillo, Brett Estes, Diana Madhessian, Emma Lundberg, Patricia Wadsworth, and Angus I Lamond. Proteomic analysis of cell cycle progression in asynchronous cultures, including mitotic subphases, using PRIMMUS. *Elife*, 6:e27574, 2017.

- [131] Juri Rappsilber. The beginning of a beautiful friendship: cross-linking/mass spectrometry and modelling of proteins and multi-protein complexes. *Journal of structural biology*, 173(3):530–540, 2011.
- [132] Yijie Gao, John O Thomas, Robert L Chow, Gwo-Hwa Lee, and Nicholas J Cowan. A cytoplasmic chaperonin that catalyzes  $\beta$ -actin folding. *Cell*, 69(6):1043–1050, 1992.
- [133] Sandhya Gopal, Encarnacion Perez Jr, Amanda Y Xia, Jonathan J Knowlton, Filipe Cerqueira, Terence S Dermody, and Jason W Upton. Murine cytomegalovirus m72 promotes acute virus replication in vivo and is a substrate of the tric/cct complex. *Virology*, 522:92–105, 2018.
- [134] Andrew J Davison and Nigel D Stow. New genes from old: redeployment of dutpase by herpesviruses. *Journal of virology*, 79(20):12880–12892, 2005.