

XXXII. OTDK Biológia Szekció

Két feltételezett *Drosophila* dezubikvitiláz genetikai jellemzése

Készítette: Borkúti Péter
Biológia Msc

Témavezető: Dr. Deák Péter, tanszékvezető SZTE TTIK Genetika Tanszék

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar
Genetika Tanszék

Szeged
2014

Tartalomjegyzék:

1. Bevezetés	3.
1.1 Irodalmi áttekintés	3.
1.1.1. Az ubikvitin és az ubikvitiláció folyamata	3.
1.1.2. Dezubikvitilázok	6.
1.2. Drosophila modell organizmus	10.
2. Célkitűzések	13.
3. Anyagok és módszerek	14.
3.1. Felhasznált Drosophila melanogaster törzsek	14.
3.2. Deléciós mutáns előállítása P-elem remobilizációval	14.
3.3. Genomikus DNS izolálás	15.
3.4. Polimeráz láncreakció	16.
3.5. Gélelektroforézis	16.
3.6. A PCR fragmentek klónozása pTZ57R/T vektorba szekvenáláshoz	17.
3.6.1. Ligálás	17.
3.6.2. Transzformálás	17.
3.7. Plazmid izolálás	17.
3.8. Restrikciós emésztés	18.
3.9. Letálfázis vizsgálat	19.
4. Eredmények és megvitatásuk	20.
4.1. DUB homológok azonosítása Drosophila melanogasterben	20.
4.2. A CG4603 deléciós allél izolálása	21.
4.3. A CG4603 deléciók azonosítása	23.
4.4. A CG4603 deléciós mutánsok letálfázisának meghatározása	26.
4.5. A CG6091 deléciós allél izolálása	27.
4.6. A CG6091 deléciók azonosítása	27.
4.7. A CG6091 deléciós allél letálfázisának meghatározása	29.
5. Összefoglalás	30.
6. Irodalomjegyzék	31.
7. Köszönetnyilvánítás	34.
8. Tételes hozzájárulás	35.

1. Bevezetés

1.1. Irodalmi áttekintés

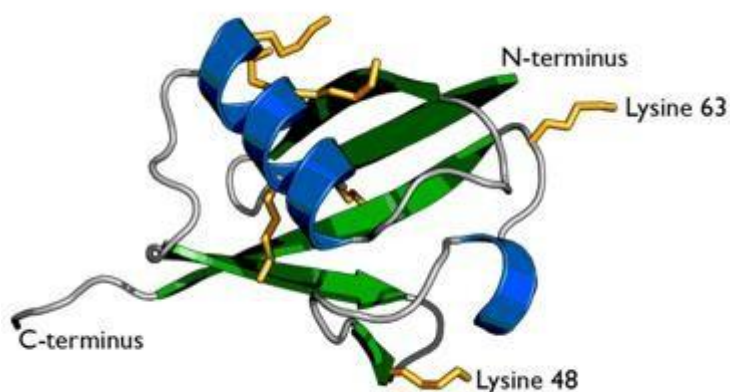
A sejtciklus egy igen szigorúan szabályozott folyamat, mivel hibái súlyos következményekkel járnának az adott sejtre, illetve organizmusra nézve. A szabályozási mechanizmus központjában a ciklin-függő kinázok (Cdk-k) és az ubikvitin-függő fehérjelebontó rendszer áll. A Cdk-k szabályozó partnerének a ciklineknek és a sejtciklus egyéb szabályozó fehérjeinek megfelelő időben történő lebontása biztosítja, hogy a sejtciklus eseményei megfelelő időben és sorrendben játszódjanak le. Az ubikvitin-függő fehérjelebontás két fázisban történik meg. Először egy enzimaszkád poliubikvitin láncsal jelöli meg a bontásra érett fehérjéket, amit a poliubikvitin receptorok ismernek fel, amelyek el is szállítják a megjelölt fehérjéket a lebontás helyszínére a 26S proteaszóma-hoz.

1.1.1. Az ubikvitin és az ubikvitiláció folyamata

A lebontásra kerülő fehérjék poszttranszlációs módosítással jelölődnek meg. A jelölő molekula a mindössze 76 aminosavból álló, 8 kDa tömegű és erősen konzervált ubikvitin. Az ubikvitin molekulák kovalensen kapcsolódnak a célfehérjékhez a karboxi-terminális – Arg-Gly-Gly76-COO⁻ motívumnál fogva. Az ubikvitin globuláris molekula (1. ábra), amelynek legfontosabb elemei a hét lizin oldallánc (K6, K11, K27, K29, K33, K48 és K63), amelyekhez izopeptid kötéssel újabb ubikvitin fehérjék kapcsolódhatnak. Az ubikvitin molekulák egy része más fehérjékkel fuzionálva szintetizálódik és egy érési folyamat során vágódik le onnét, más része pedig lineáris poliubikvitinként szintetizálódik, ami később darabolódik fel monomerekre (Wilkinson és mtsai.,1981; Herskó és mtsai.,1981)

Az ubikvitin molekula egy legalább háromtagú enzimaszkád segítségével kapcsolódik a célfehérjéhez (2. ábra). A folyamat első enzime az ubikvitin-aktiváló (E1) enzim, amely az ATP molekula energiájának felhasználásával aktiválja az ubikvitint. Az aktiválás után az E1 enzimmről az aktivált ubikvitin molekula átkerül az ubikvitin-konjugáló, vagy E2 enzimre.

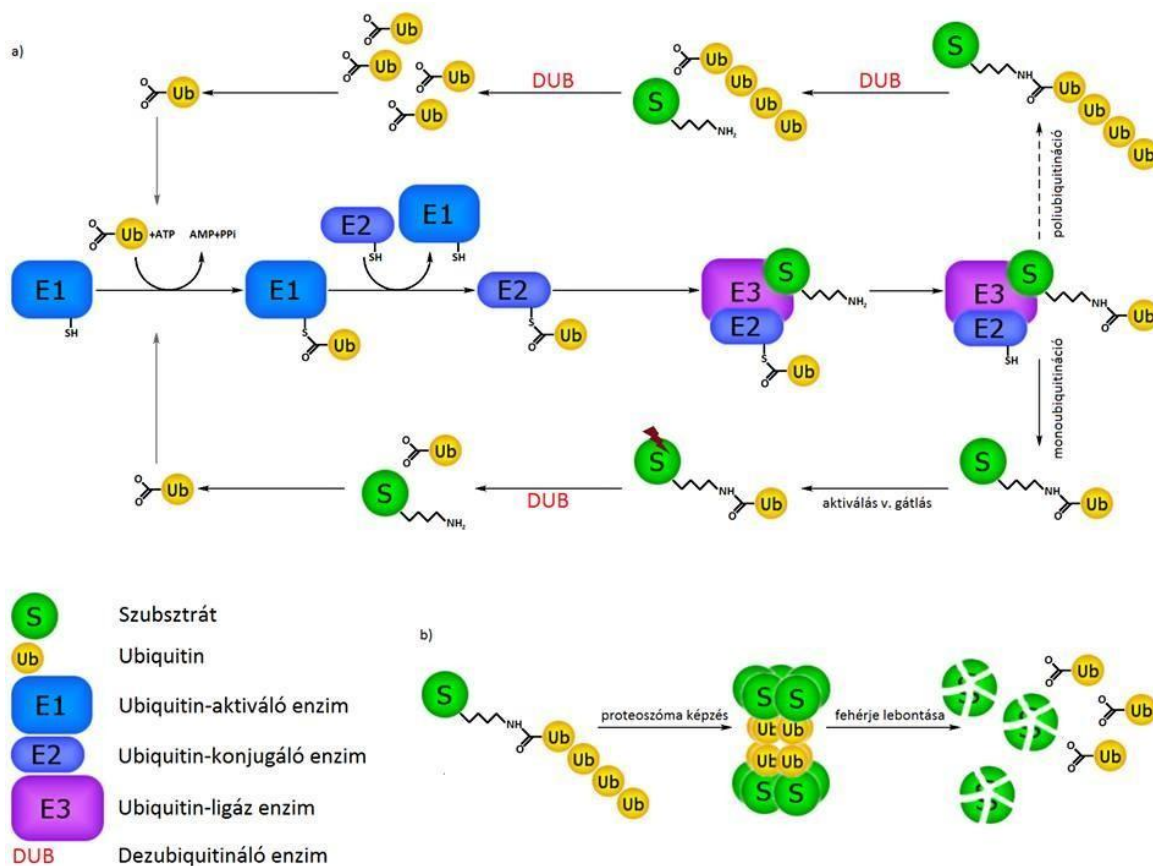
Az E3 ubikvitin-ligáz kölcsönhatásba lép az E2-ubikvitinnel és a cél fehérjével, katalizálja az izopeptid kötés kialakulását a célfehérje valamely kitüntetett lizinének, epsilon-aminocsoportja és az ubikvitin C-terminális Gly76 karboxil-csoportja között. Mivel az ubikvitin ligáz enzim határozza meg a folyamat szubsztrátspecifitását, nem meglepő, hogy több száz féle ismert.



1. ábra Ubikvitin szerkezeti modellje, néhány kitüntetett lizin oldallánc feltüntetésével (Roger Dodd, 2008)

Az ubikvitin-ligázok állhatnak egyetlen fehérjéből vagy lehetnek komplexek. Két fő csoportjuk van. A HECT (Homologs to the E6AP C-Terminus) domént tartalmazó E3-ak aktív ciszteine átveszi az ubikvitint az E2-ről és közvetlenül építi rá a szubsztrátra. A RING (Really Interesting New Gene) fingert tartalmazó E3 ligázok, nem alakítanak ki kovalens kötést az ubikvitin molekulával, közvetetten juttatják azt át a szubsztrátra. Az ubikvitináció folyamatában résztvevő enzimek legújabban felfedezett csoportja az E4 ubikvitinlánc elongációs faktorok, melyek U-doménnel rendelkeznek. Szerepük a megfelelő hosszúságú poliubikvitin lánc összeszerelésében lehet, de pontos szerepük egyelőre még nem tisztázott (Glickman és mtsai., 2002).

Az enzimkaskád tagjai különböző számban fordulnak elő az élőlényekben. Az E1 enzimek fordulnak elő legkisebb számban. Fajonként egy, illetve emlősökben kettő E1 enzim ismert (Sjoerd J. L. van Wijk mtsai. , 2009). E2 enzimből eddig 30 különbözőt azonosítottak. Számuk fajonként változó. Élesztőben például tizenegy E2 enzim ismert.



2.ábra Az ubikvitin-függő fehérjelebontó rendszer vázlata

A célfehérjéhez kapcsolódott ubikvitin szignál állhat egyetlen ubikvitin molekulából vagy több különálló ubikvitin molekulából vagy egy, legalább két tagból álló poliubikvitin láncból. A négy vagy több tagból álló poliubikvitin lánc lehet folytonos vagy elágazó. (Baboshina és mtsai., 1996; Hofmann és mtsai., 1999; Koegl és mtsai., 1999)

A struktúrájukban különböző poliubikvitin láncok más-más sorsot jelölnek ki a megjelölt fehérje számára. Például a K48, K29 és K11 kapcsolt poliubikvitin lánc a fehérjéket proteasomális degradációra ítélné. (Chau és mtsai., 1989; Jin és mtsai., 2008; Koegl és mtsai., 1999) A K63 kapcsolt poliubikvitin lánc a DNS-hibajavító mechanizmusban és jelátviteli útvonalakban játszik szerepet (Deng és mtsai., 2000; Spence és mtsai., 1995). A K63 kapcsolt monoubikvitinnek azonban más a szerepe. A sejtfelszíni fehérjék jelölésében vesz részt, melynek végeredménye internalizáció és

endoszómában történő szortírozás (Hicke és mtsai., 1996; Springael és mtsai., 1999). A hisztonok monoubikvitinációja nagyban befolyásolja a kromatin struktúráját és transzkripcióját (Levinger és Varshavsky, 1980).

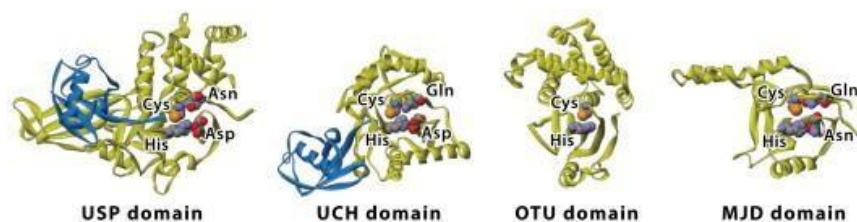
Mint több más poszt szintetikus módosítás, úgy az ubikvitináció folyamata is reverzibilis. Az ubikvitin hozzákapcsolódik egy fehérjéhez és le is vágódhat onnan. Ezt a folyamatot a sejt szabad vagy fehérjekomplexhez kapcsolt cisztein és metalloproteázai, az úgynevezett dezubikvitilázok, vagy DUB-ok katalizálják.

1.1.2. Dezubikvitiláló enzimek

A dezubikvitiláló enzimek, képesek eltávolítani az ubikvitint a fehérjeszubsztrátról. A DUB-ok egyik csoportja az újonnan szintetizálódó lineáris poliubikvitin fúziók feldarabolásában játszik szerepet, ezáltal hozzájárul a monoubikvitin szintéziséhez. Egy másik csoportjuk a poliubikvitin láncokból forgatja vissza a monoubikvitint a szabad ubikvitin készletbe, ezáltal kulcsszerepet játszva a sejt ubikvitin homeosztázisának fenntartásában (Amerik és mtsai, 1997; Nijman és mtsai, 2005; Larsen és mtsai, 1998).

A dezubikvitilázok a proteázok szupercsaládjába tartoznak. Az ubikvitin-ubikvitin vagy ubikvitin-szubsztrátfehérje közti tiolészter kötés hasításának mechanizmusa alapján cisztein illetve metalloproteáz csoportba sorolhatjuk őket. A cisztein proteázok aktív centrumában egy cisztein foglal helyet, amelynek deprotonálódnia kell, ehhez a hozzá térben közel elhelyezkedő hisztidin és aszparaginsav nyújt segítséget. E három aminosav közösen alkotja a katalitikus triádot, amely nukleofil reakcióval hasítja a célfehérje és az ubikvitin közötti tiolészter kötést. A metalloproteázok közé tartozó DUB-ok Zn^{2+} iont használnak az izopeptid kötés hasításához. A fémiont egy aszparaginsav és két hisztidin stabilizálja (Ambroggio és mtsai, 2004).

A cisztein proteázok közé sorolható DUB-ok további négy alosztályba csoportosíthatóak (3. ábra). Megkülönböztetünk ubikvitin specifikus proteázokat (USP), ubikvitin C-terminális hidrolázokat (UCH), ovárium tumor proteázokat (OTU) és Machado-Joseph domén tartalmú proteázokat (MJD) (Amerik és mtsai., 2004).



3.ábra A cisztein proteázok közé tartozó DUB-ok alosztályainak doménszerkezete

Az ubikvitin C-terminális hidrolázok (UCH) alosztályba négy humán DUB tartozik katalitikus doménjeik homológiája alapján. Strukturális és biokémiai vizsgálatok arra utalnak, hogy az UCH-k elsősorban kis mérettartományban mozgó, 20-30 aminosav hosszúságú fehérjeszubsztrátokról távolítják el az ubikvitineket. A méretbeli gátat egy, az aktív centrumot részlegesen eltakaró hurok biztosítja, amely csak a kisebb szubsztrátokhoz biztosít hozzáférést (Amerik és mtsai., 2004). Újabb szerkezeti tanulmányok valószínűsítik bizonyos nagyobb méretű szubsztrátok megkötését is (Misaghi és mtsai., 2005).

Bár elsőként írták le az UCH alosztályba tartozó DUB-okat, sejten belüli funkciójuk kevésbé tisztázott. Feltehetően elsősorban olyan ubikvitinek eltávolításáért felelősek, amelyek hibásan konjugálódtak bizonyos sejten belüli nukleofilekhez (például glutationhoz, poliaminokhoz). Másrészt az ubikvitinek bioszintézisének is fontos szerepet játszhatnak. Az UCH alosztály DUB-jai monoubikvitinekre darabolják az újonnan szintetizálódott lineáris poliubikvitin láncokat, illetve bizonyos riboszómális fehérjékkel fuzionált ubikvitineket is lehasítanak. Az UCH-k ezen funkciója nem tekinthető kizárólagosnak, mivel más alosztályba sorolható DUB-okról is ismert, hogy katalizálják a lineáris poliubikvitinek feldarabolását. Néhány tanulmány kimutatta az UCH-k szerepét bizonyos ubikvitiláció által szabályozott folyamatokban is. Az idegsejtekben expresszáldó UCH-L1 szerepet játszhat a Parkinson-kór kialakulásában. E DUB génjének polimorfizmusai csökkenthetik a Parkinson-kór kialakulásának valószínűségét (Leroy és mtsai., 1998, Liu és mtsai., 2002).

Az ubikvitin specifikus proteázok (USP) alosztályába tartozik a legtöbb DUB (Nijman és mtsai., 2005). Ahogyan az E3 ubikvitin ligázok száma emelkedik az evolúció során, hasonlóképpen növekszik az USP alosztály képviselőié is. Ez a tendencia arra utal, hogy az ubikvitiláció specificitását meghatározó enzimek együtt evolválódtak az velük ellentétesen ható DUB-okkal (Semple, 2003).

Az USP alosztály tagjai egy evolúciósan konzervált USP domént tartalmaznak. Ezen a doménon belül helyezkednek el a nagymértékben konzerválódott, katalitikus

ciszteint és hisztidint tartalmazó motívumok. Az cisztein és hisztidin boxok közti szakasz 300 és 800 bázispár között változhat. Ennek a szekvencia résznek szabályozó szerepet tulajdonítanak (Nijman és mtsai, 2005). Arra is van azonban példa, hogy egy adott DUB a katalitikus motívumok hiányában is fontos szerepet játszik a sejten belüli folyamatok szabályozásában. Például az USP39 szerkezetében ugyan több USP doménre jellemző aminosav is fellelhető, de nem azonosítható a katalitikus cisztein és hisztidin. Ez a fehérje ugyan nem rendelkezhet izopeptidáz aktivitással, a szplájszoszómák érésében azonban létfontosságú szerepet játszik. Feltételezhetően a katalitikus oldalláncok hiányában is képes kötődni az ubikvitinekhez, amelynek lehet funkcionális jelentősége (Makarova és mtsai.,2001).

Az USP alosztály tagjainak nagy száma arra is utal, hogy változatos funkciókat töltenek be a különböző ubikvitilációval kapcsolatos folyamatok szabályozásában. Ismert, hogy az USP-k affinitása eltérő az különböző típusú elágazódást mutató poliubikvitin láncok iránt, amely nyilvánvaló funkcionális különbségekhez vezet (McGouran és mtsai,2013). Például a CYLD izopeptidáz a K63 típusú poliubikvitin láncokra specifikus. Ilyen típusú poliubikvitin láncsal elsősorban az NF- κ B jelátviteli útvonal szereplői jelölődnek. A CYLD dezubikvitiláz aktivitása eltávolítja ezt a nem degradatív szignált, amely a NF- κ B negatív szabályozásához vezet. Hiányában a cylindromatózis nevű tumoros megbetegedés alakul ki (Courtois, 2008, Brummelcamp és mtsai., 2003, Gutiérrez és mtsai., 2002). A CYLD kristályszerkezetéből úgy tűnik, hogy ez az enzim az ubikvitin felületének olyan részéhez kötődik, amely csak a K63 típusú poliubikvitin láncokban hozzáférhető. Hasonló elven ismerhetik fel szubsztrátjaikat azok a DUB-ok is, amelyek más típusú poliubikvitin láncokat hasítanak (Sato és mtsai., 2008).

Számos USP-nek ismert az ubikvitin-ligáz partnere. Sok esetben közvetlen interakció mutatható ki közöttük. Erre az esetekre példa az USP4-Ro52, az USP7-MDM2, az USP8-GRAIL, az USP20-pVHL, az USP33-pVHL és az USP44-APC kölcsönhatások (Marfany és mtsai., 2008, Ventii és mtsai., 2008). Ezeknek a direkt interakcióknak egyik magyarázata az, hogy a kölcsönható partnerek ilyen módon kölcsönösen szabályozhatják egymást. Például az MDM2 és Ro52 ligázok szubsztrátjaik hiányában auto-ubikvitilálódnak. A velük asszociált USP7 és USP4 megfordíthatják ezt a folyamatot (Clegg és mtsai., 2008, Meulmeester és mtsai., 2005, Wada és mtsai., 2006).

A cisztein típusú DUB-ok kevésbé ismert alosztálya a Machado-Joseph domént tartalmazó proteázok (MJD). Ez az alosztály tekinthető a legfiatalabbnak evolúciós

szempontból, mivel képviselőit élesztőben nem sikerült azonosítani (Nijman és mtsai.,2005). Emberben négy darab MJD alosztályba sorolható DUB ismert. Katalitikus doménjeik nem mutatnak homológiát más ismert DUB alosztályok képviselőiével, viszont az NMR vizsgálatok arra utalnak, hogy a katalitikus triádok térszerkezetének elrendeződése hasonlóságot mutat a többi cisztein proteázéval (Mao és mtsai., 2005, Nicastro és mtsai., 2005).

Az MJD alosztály a legjobban jellemzett képviselője az Ataxin-3. Az *Ataxin-3* génben előforduló CAG ismétlődések számának megváltozása az 3. típusú ataxiához, más néven Machado-Joseph kórnak nevezett súlyos neurodegeneratív betegséghez vezet (OMIM 607047). Mint más poliglutaminnal kapcsolatos neurodegeneratív betegségek esetében, itt is a CAG ismétlődések számának növekedése eredményezi a hibás térszerkezetű fehérjét. A rosszul tekeredett fehérjék aggregátumokat képeznek, amelyek citotoxikus hatása tehető felelőssé az idegsejtek pusztulásáért (Li és mtsai., 2002). Az alosztály többi tagjának proteáz aktivitása nem bizonyított és biológiai szerepük sem tisztázott még.

A cisztein proteázok negyedik alosztályát az ovárium tumor proteázok (OTU) képezik. Ennek az alosztálynak az első képviselőjét *Drosophila melanogaster*ben azonosították. A *Drosophila otu* gén terméke az ováriumok fejlődését szabályozza. Bizonyos RNS transzkriptumok lokalizációjának és transzlációjának szabályozásában játszik szerepet (Goodrich és mtsai., 2004, Steinhauer és mtsai., 1989). A *Drosophila* Otu alapján olyan további homológokat azonosítottak, amelyek a virális eredetű cisztein proteázokhoz hasonlítanak (Makarova és mtsai., 2000). Az alosztály tagjaira jellemző a konzervált OTU domén jelenléte. Az OTU domén érszerkezetének megfejtésével kiderült, hogy a katalitikus triád nem teljes, így ebben eltér a többi cisztein proteáztól. Az aktív centrumot a hidrogénhid kötések másfajta hálózata stabilizálja (Nanao és mtsai., 2004).

Bár *in vitro* kísérletekkel igazolták, hogy a humán OTU alosztályba tartozó Otubain-1, Otubain-2 és Cezanne fehérjék dezubikvitiláz aktivitást mutatnak és élesztő két hibrid kísérletek alapján ezek a DUB-ok poliubikvitin láncokkal hatnak kölcsön, a legtöbb OTU *in vivo* funkciója ismeretlen (Balakirev és mtsai., 2003, Evans és mtsai., 2003).

1.2. *Drosophila* modell organizmus

Számos előnyös tulajdonságának köszönhetően a kétszárnyúak rendjébe tartozó *Drosophila melanogaster*, vagy köznapin ecetmuslica, a genetikai kutatások egyik legelterjedtebb modellorganizmusa. Nevét, melanogaster, a hímek hasi oldalán lévő fekete foltról kapta. Tenyészetei kis helyen elférnek, egyszerűen és olcsón fenntarthatók, könnyen kezelhetők. A hím és nőstény egyedek könnyen elkülöníthetők egymástól, mivel a hímek genitális lemezei sötétebbek, bonyolultabbak, mint a nőstényeké, és a hímek elülső lábain egy úgynevezett sex-fésű található, amely 6-7 darab, fésű elrendezésű sörte sor (4. ábra).

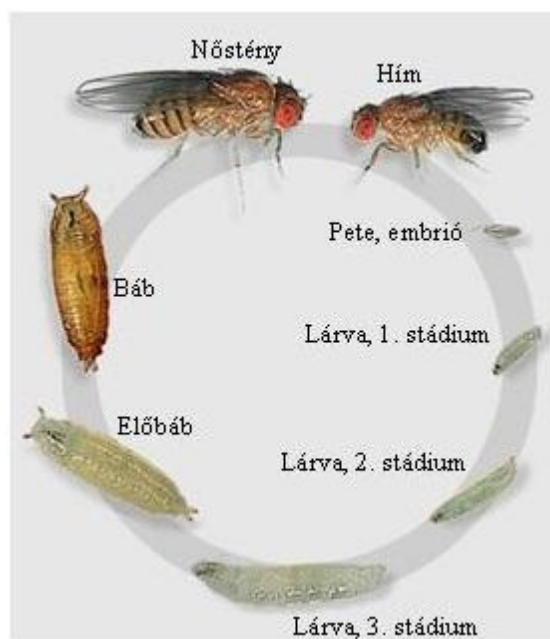


4. ábra Ivari dimorfizmus. Baloldalon látható egy hím egyed, jobboldalon egy nőstény. Nyíllal jelölve a sex-fésű a hím lábán. Jól látható elkülönítő jegy a hímek fekete potroh vége..

Egyszerűen végezhetők velük irányított keresztezések. A nőstény egyedek rendkívül fertilisek. A hímek által bejuttatott hímivarsejtek a nőstény spermatékájában tárolódnak, aminek felhasználásával egy megtermékenyített nőstény több napon keresztül, naponta akár 100 petét is lerakhat.

Generációs ideje rövid, 25°C-on mindössze 10 nap. Egyedfejlődése teljes átalakulással történik (5. ábra). A 0,5mm hosszú petéből 22 óra alatt fejlődik ki az első stádiumos lárva (L1) 25°C-on, amely fejlődési állapotot még további két lárvaállapot (L2 és L3) követ. Az L3-as lárvastádium végső 8 órájában az állat vándorolni kezd, és megfelelő helyet keres a bábozódáshoz. Az 5 napig tartó báb fejlődési állapot idején az állatok számos, morfológiailag jól elkülöníthető fejlődési állapoton mennek keresztül, majd a bábburokból kibújik a felnőtt egyed. A kifejlett ecetmuslica körül-belül 1 hónapig él.

A bábból történő kikelést követően az állatok nem válnak azonnal ivaréretté.



5. ábra Az ecetmuslica egyedfejlődési ciklusa

Az ecetmuslica nagyon jól használható citológiai vizsgálatokra is, mert kromoszómakészlete mindössze 3 pár testi és 1 pár nemi kromoszómából áll. Ezen túlmenően, a lárvák nyálmirigye különleges politén kromoszómákat tartalmaznak, amelyek 1024 DNS szálból állnak és jellegzetes sávmintázatot mutatnak.

2000 óta az ecetmuslica teljes genomszekvenciája is ismert és rendelkezésre áll. A *Drosophila* genom $1,65 \times 10^8$ bázispárból áll és közel 13.600 gént tartalmaz.

Az évek során megannyi különböző markermutációt hoztak létre a genomjában, amelyeknek jól megfigyelhető fenotípusa van, így pántlikaként jelölik meg a kromoszómák meghatározott pontjait. Nagyrészüik recesszív, de számos domináns is van közöttük. A legismertebbek a szemek vagy a test színét, a szőrök, a szem vagy a szárnyak alakját befolyásolják.

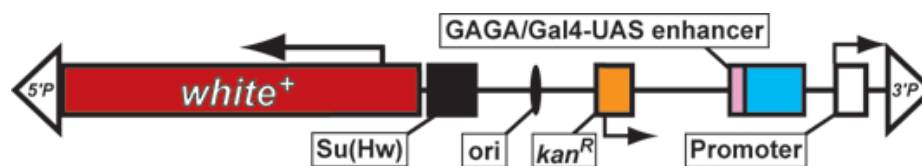
A génexpresszió szabályozásának mechanizmusa nagy hasonlóságot mutat az emberéhez. A muslica gének több mint felének van humán ortológja, és az emberi öröklődő betegségekben azonosított gének 75%-ának van *Drosophila* homológja.

Igen értékes tulajdonsága a muslicának, hogy az úgynevezett balanszer kromoszómákkal a letális mutációkat hordozó kromoszómák megőrizhetők az egymást

követő generációkban. A balanszer kromoszómák több inverziót tartalmaznak, így alkalmasak a crossing-overek kiküszöbölésére, ugyanakkor domináns és recesszív marker mutációiknak köszönhetően nyomon követhetők az egymást követő generációk során.

Molekuláris funkcióikat és alapvető folyamatokat mutációk létrehozásával ismerhetünk meg. Mutagenézisre a transzpozonok (a mobilis genetikai elemek) egyike, a P-elem is használható. A P-elemek a molekuláris biológia eszköztárával módosíthatóak, majd egy exogén transpozáz segítségével magas beépülési rátával bejuttathatók a *Drosophila* genom akár eu- akár heterokromatikus régiójába. 1982-től kezdődően megszámlálhatatlan transzgenikus P elem inverziós vonal áll rendelkezésünkre.

A P{EP} elemet egy kondicionális túltermelő szövetspecifikus szűrésre hozták létre Casper4 P-elemből (Pernille Roth, 1996). A mini- white markergént és P elem végeket tartalmazó Casper4 elembe további specifikus fragmenteket ligáltak be (6. ábra).



6. ábra Az P{EP} transzpozon sematikus ábrázolása. Klónozáshoz használható szelekciós marker géneket hordoz, illetve egy white szemszínt okozó marker mutáció is látható. (Bellen és mtsai)

A P{EP} elemet többen továbbfejlesztették különböző célokra. (Mata, J., S. Curado, A. Ephrussi and P. Rørth, 2000) Az EY elemnek nevezett P{EPgy2} transzpozont (7. ábra) azért hozták létre, hogy növeljék a P{EPg} elem specifitását.



7. ábra Az EY vonalak P{EPgy2} transzpozonjának sematikus térképe. Piros szín jelöli a mini-white gént, sárga a sárga testszínt létrehozó yellow markergént (Bellen és mtsai., 2004).

A mini-*white* gén szomszédságába beépítettek egy sárga szemszínt okozó *yellow* gént és eltávolították a plasmid rescue modult belőle (Bellen és mtsai., 2004).

2. Célkitűzések

A *Drosophila melanogaster* CG4603 és CG6091 gének által kódolt fehérje ismert humán és élesztő dezubikvitinázok ortológja. A génekre nincsen elérhető mutáns, rendelkezésre állnak viszont RNS interferencia vonalak. Ezekről munkatársaim megállapították, hogy Actin 5c-GAL4 driverekkel történő indukció után csökken a génekről képződő transzkript mennyisége, de az egyedek életképesek és fertilisek maradnak. Az RNS-interferencia vonalakról tudott, hogy nem teljes mértékben gátolják a génexpressziót, így életképes fenotípus esetén, nem lehetünk benne biztosak, hogy a géntermék hiánya nem létfontosságú vagy csak nem volt megfelelő mértékű a csendesítés. Ezért az én feladatom az volt, hogy létrehozzam a CG4603 és CG6091 gének null-mutáns alléljait és felhasználásukkal megvizsgáljam, hogy létfontosságúak-e ezek a gének.

Feladatomat a következő lépéseken keresztül valósítottam meg:

1. A CG4603 és a CG6091 gének 5' végében található P elemek remobilizációja.
2. Törzsalapítás azokból az egyedekből ahol a P elem kiugrott.
3. A CG4603 és a CG6091 géneket érintő deléciók azonosítása PCR-rel.
4. A deléciók pontos méretének meghatározása szekvenálással.
5. Az új deléciós allélek fenotípusának meghatározása.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Felhasznált *Drosophila melanogaster* törzsek

A felhasznált törzseket standard *Drosophila* kukoricadara-élesztő táptalajon tartottuk és a keresztezések során is ezt használtuk. A törzseket és a keresztezéseket 25°C-on tartottuk. Az összes használt genetikai markerek leírása megtalálható a FlyBaseben. A kísérlethez szükséges vonalakat a Bloomingtoni Törzsgyűjteményből (Indiána Egyetem, USA) szereztük be. Ezek a következők:

P elem inszerciós törzsek:

P{EPgy2}CG4603(EY07831) és P{EP}CG6091(G18421)

Transzpozáz forrás törzs:

Df(3L)C4/TM3, Sb P(Δ2-3)

Balanszer törzsek:

w/w; TM3, Sb/ TM6B, Tb Hu

w/w; TM3, Sb/ TM6B, Tb Hu GFP

3.2. Deléciós mutáns előállítása P-elem remobilizációval

A P{EPgy2}CG4603(EY07831) elemet a következő keresztezési tervezet szerint mobilizáltuk:

1. w/w; P{EPgy2}CG4603(EY07831) ♀♀ X +/Y; Df(3L)C4/TM3, Sb P(Δ2-3) ♂♂

Ezt a keresztezést üvegben végeztük 30-50 szüzet és 30 hímét használva. A keresztezéseket 25 C-on tartottuk, majd 3-4 nap után, amikor megfelelő mennyiségű petét raktak a felnőtt állatokat új üvegbe ráztuk át. Újabb 3-4 nap megint továbbráztuk a legyeket.

A w/Y; P{EPgy2}CG4603(EY07831)/ TM3, Sb P(Δ2-3) genotípusú utódok mindkét P elemet hordozzák. Ezen utódokban történik meg a P(EP) elem mobilizálódása. A továbbiak szempontjából az ivarsejtvonalban bekövetkezett esemény a fontos, de szomatikusan is megfigyelhető a P elem kivágódása, ugyanis az állatok szeme foltos. Ezeket az állatokat „jumpstarternek” hívjuk.

A „jumpstarter” állatokat balanszer kromoszómákat hordozó állatokhoz kereszteztük, hogy követni tudjuk az ivarsejtekben bekövetkezett eseményeket.

2. w/w; TM3, Sb/ TM6B, Tb Hu ♀♀ X w/Y; P{EPgy2}CG4603(EY07831)/ TM3, Sb P(Δ2-3) ♂♂

A keresztezésből származó fehér szemű utódok reprezentálják a P elem kivágódását. Mivel a P elem kivágódása már ősisvarsejt állapotban bekövetkezhet ez pedig klón képződéséhez vezet egy keresztezésből csak két fehér szemű utódot tartottunk meg. Ezek genotípusa a következő lehet: **w/Y; Df(3L)?/ TM3, Sb** és **w/Y; Df(3L)?/ TM6B, Tb Hu**. Ezeket az állatokat ismét balanszer kromoszómát hordozó állatokhoz kereszteztük.

3. w/w; TM3, Sb/TM6B, Tb Hu GFP ♀♀ X w/Y; Df(3L)?/ TM3, Sb ♂ vagy

w/w; TM3, Sb/TM6B, Tb Hu GFP ♀♀ X w/Y; Df(3L)?/ TM6B, Tb Hu ♂

Ezen keresztezések utódaiból a remobilizált kromoszómát hordozó törzseket alapítottunk.

4. w/w; Df(3L)? / TM6B, Tb Hu GFP ♀♀ X w/Y; Df(3L)? / TM6B, Tb Hu GFP ♂♂

3.3. Genomikus DNS izolálása

10-30 db adult egyedet 400μl A-pufferben (0,5M Tris-HCl,pH=7,5 250mM EDTA, pH=7,5, 5M NaCl, 10% SDS) szétdörzsöléssel homogenizálunk, majd 30 percig 65°C-on inkubáljuk. 800μl LiCl/K-acetát (1 rész 5M, K-acetát: 2.5 6M, LiCl rész) keverék hozzáadásával jégen 10 percig inkubáljuk. A LiCl/K-acetát oldat kicsapja a fehérjéket és az SDS-t az oldatból. 15 perc 13.000 rpm sebességgel történő centrifugálással elválasztjuk DNS-t oldott állapotban tartalmazó felülúszót az állatok kutikuláját, kicsapódott fehérjéket, SDS-t és egyéb oldhatatlan anyagokat tartalmazó csapadéktól. A felülúszót tiszta Eppendorf csőbe pipetázzuk és azonos térfogat izopropanol hozzáadásával kicsapjuk a DNS-t az oldatból. A kicsapódott DNS-t 15perces, 13.000 rpm sebességgel történő centrifugálással gyűjtjük össze. A csapadékot mossuk 70%-os etanollal, majd újra centrifugáljuk 5 percig 13.000 rpm sebességgel. A megszárított DNS-t RNázos TE-ben, pH8 (100 μg/ml RNase, 100 mM TRIS, 10 mM EDTA) oldjuk fel. Az oldódás segíthető a minta 65°C-on történő inkubációjával (maximum 15 perc).

3.4. Polimeráz láncreakció (PCR)

A PCR-hez laborunk a DreamTaq polimeráz enzimet (Thermo Scienfitic) használja a gyártó utasításainak megfelelően. A reakciókörülmények 100µl végtérfogatra számítva a következők: 10µl 10x DeamTaq polimeráz puffer (ami tartalmaz 20mM MgCl₂-ot is), 8µl dNTP mix (2.5mM dezoxi-ATP, dezoxi-TTP, dezoxi-GTP és dezoxi-CTP), 4µl felső primer (5µM) és 4µl alsó primer (5µM), templát, 2.5U DreamTaq polimeráz enzim és víz.

A kísérletekhez használt primerek szekvenciája a következő:

CG4603 deléciós felső: 5' TAGCTGCGAGCGGAATCTCTG3'

CG4603 deléciós alsó: 5' GCATTTCGGACACAAGGTGGC3'

CG6091 deléciós felső: 5' CCAACTGAGGTCGCAATTTC 3'

CG6091 deléciós alsó: 5' TCCCATATCGTGCGTACTTC 3'

A PCR reakciókat LongGene A300 PCR készülékben végezzük a következő program szerint:

1. 95°C , 1-3 perc: kezdeti denaturáció
2. 95°C, 30 másodperc: denaturáció
3. 60°C , 30 másodperc: annealing
4. 72°C,: extension
a 2., 3., 4. lépés ismétlése 35 cikluson keresztül
5. 72°C, 10 perc: végső extension

3.5. Gélelektroforézis

A PCR reakciók eredményét gélelektroforézissel analizáltuk. Az 1%-os agaróz gélhez 0,5g agarózt oldottunk fel 50 ml TBE pufferben (5X TBE: 1.1M Tris; 900mM Bórsav; 25mM EDTA; pH 8.3). A gél 0.5µg/ml etídium-bromidot tartalmazott. Az etídium-bromid a DNS két szála közé beépülő festék, amely UV fénnel megvilágítva láthatóvá teszi azt. A folyékony gél futtatókádba öntöttük és fésűt helyeztünk bele, amely a gél megszilárdulása után a zsebket alakította ki. A fésű kivétele után a megszilárdult gél alkalmas a minták és molekulasúly marker felvitelére.

3.6. A PCR fragmentek klónozása pTZ57R/T vektorba szekvenáláshoz

3.6.1. Ligálás

A P elem remobilizációval előállított deléciók pontos méretét szekvenálással határoztuk meg. Ehhez a mutánsokból PCR-rel amplifikáltuk a vizsgált gén genomikus környezetét. A kapott PCR fragmenteket pTZ57R/T (Fermentas) vektorba ligáltuk a következő körülmények között: 11µl víz, 1,5µl 10-szeres ligáz puffer, 1,5µl 50%-os PEG 4000, 0,5µl pTZ57R/T vektor, 0,5µl T4 DNS ligáz enzim (5U/µl). A mintákat 1 órán keresztül 22 C-on inkubáltuk.

3.6.2. Transzformálás

A ligálási reakcióval DH5α E.coli kompetens sejteket transzformáltunk a következő módon. 100µl DH5α E.coli kompetens sejthez 5µl ligátumot adtunk. 30 perc jégen történő inkubáció után másfél percig 42°C-on hősokkoltuk a sejteket, majd 5 percig jégen inkubáltuk őket. 400µl folyékony YTB táptalaj hozzáadása után a mintákat 1 óráig szoba hőmérsékleten forgatva inkubáltuk. A sejteket 100µg/ml ampicillint, 40µg/ml X-gal-t (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) és 40µg/ml IPTG-t (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) tartalmazó lemezre szélesztettük. A sejteket 37 °C-on növesztettük egy éjszakán át. A táptalajhoz adott IPTG és X-gal lehetővé tette, hogy szín alapján azonosítsuk a PCR fragmentet tartalmazó vektorokat hordozó sejteket. Ugyanis az inszert beépülése inaktiválta a vektoron található lacZ gént, így azok a telepek, amelyekben a vektor nem tartalmazott inszertet kékszínűek lettek, míg amelyekben tartalmazott, azok fehérek.

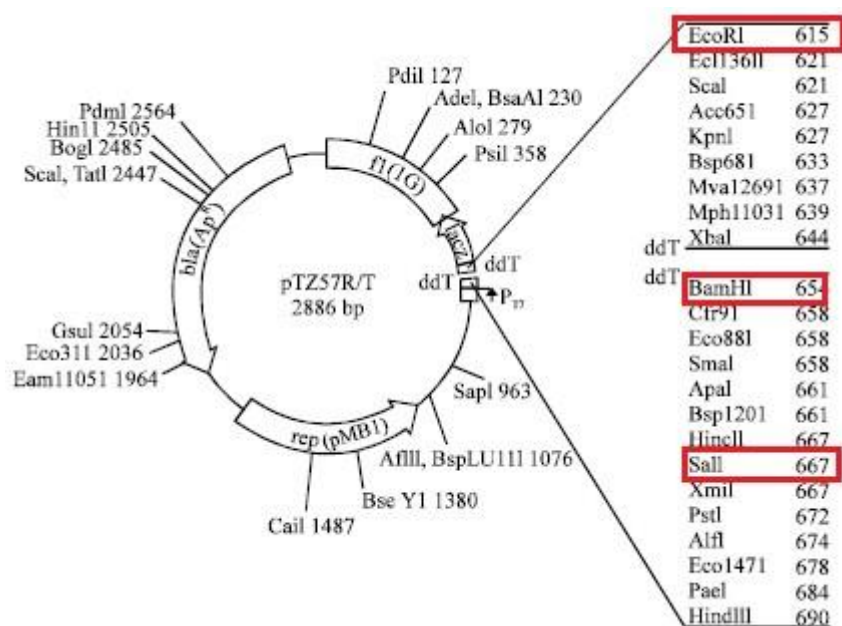
3.7. Plazmid izolálás

10 db fehér színű telepet folyadékkultúrában növesztettünk 37°C-on, egy éjszakán át 100 µg/ml ampicillint tartalmazó YTB táptalajban. 1.5 ml kultúrát Eppendorf csőben 1 percig centrifugáltunk 13.500 rpm sebességgel. Az Eppendorf csőből a felülúszót leöntöttük és újabb 1.5 ml kultúrát mértünk bele. A kiüledett sejteket 100µl TEG oldatban (50mM glükóz, 25mM Tris, 10mM EDTA; pH:8,0) szuszpendáltuk, majd 5 percig jégen inkubáltuk. A sejtek feltárását 200µl frissen készített Lízis oldatot (0,2N NaOH, 1% SDS) hozzáadásával végeztük óvatos keveréssel. 150µl hideg 3M-os K-acetátot adunk a mintákhoz és 5 perces, jégen történő inkubálás után 10 percig centrifugáltuk őket 13.500

rpm sebességgel. A K-acetát hatására kicsapódott az SDS, a fehérjék és a genomikus DNS, így a tiszta felülúszó már csak plazmid DNS-t és RNS-t tartalmaz. A felülúszóhoz kétszeres térfogat 96%-os etanolt adtunk és 5 percig -20°C-on inkubáltuk. Az alkohol hatására kicsapódott plazmid DNS-t 10 perc 13.500 rpm sebességgel történő centrifugálással gyűjtöttük össze. A csapadékot 70%-os etanollal mostuk és újra centrifugáltuk. Az etanol eltávolítása után a csapadékot szobahőmérsékleten szárítottuk. A plazmidot 50 µl RNázt tartalmazó (100 µg/ml) TE-ben (100 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA; pH8.0) oldottuk fel. Az RNase eltávolítja a plazmiddal együtt kicsapódott RNS-t.

3.8. Restriktions emésztés

Restriktions emésztéssel ellenőriztük, hogy az izolált plazmidok a megfelelő inszertet tartalmazzák-e. Olyan restriktions enzimeket választottunk, amelyek a klónozóhely ellentétes oldalán vágnak bele a vektorba és nincs hasítóhelyük az inszertben. Megfelelő enzimek az EcoRI, a BamHI és a SalI, amelyeket EcoRI-BamHI és EcoRI-SalI kombinációban használtunk.



8.ábra pTZ57R/T plazmid vektorképe a klónozó hely szomszédságában található restriktions enzim felismerőhelyekkel. Piros keretezés jelöli a kísérletben használt 3 enzimet.

A restrikciós emésztéseket 20 mikroliter végtérfogatban végeztük, melyek összetétele a következő volt: 3µl plazmid, 2µl 10X puffer, 14 µl H₂O víz és 0,5-0,5µl 10U restrikciós endonukleáz (EcoR1, BamH1, Sal1). Az emésztési reakció elegyeket 37°-on inkubáltuk 1 órán keresztül.

3.9. Letálfázis vizsgálat

Annak megállapítására, hogy az állatok melyik fejlődési állapotban pusztulnak el az állatokat szinkronizálni kell. Ehhez a megfelelő genotípusú állatokat, nemenként elkülönítve egy napig élesztővel gazdagon kiegészített standard táptalajon tartottuk. Majd 15 hímet és nőtényt összekereszteltünk és az állatot petéztetőcsőbe tartottuk, amelyen 12 óránként cseréltük a petéztető lemezt. A petéztető lemez 1,6% lakto-agart, 0,8% glükózt, 0,15% nipagint és aktív szenet tartalmaz. Az első vedlés után elkülönítettük egymástól a homozigóta mutánsokat és a balanszer kromoszómákat hordozó testvéreiket a balanszer kromoszómák által hordozott *GFP* markerek alapján, majd ötvenesével standard *Drosophila* táptalajon külön fiolákban neveltük őket, 25 C-on.

4. Eredmények és megvitatásuk

4.1 DUB homológok azonosítása *Drosophila melanogaster*ben

HsYOD1	47	WRLRCNADTHVLQGLSSRIIRVREIQGQAAIINGAPGGQRIIVGYPFECIDLSNGDT-
DmCG4603	5	FSVKLNSKKQFIVNDNEHTLGEIKTKIVQANDNEATQLHVLVGYPFKPLDLSQQQE
HsYOD1	106	-IIEDLFQSDMDLIEEDQ-----TRPRSSPFTK-----GASSYVREI----
DmCG4603	65	RAIKAVGINSGETLIVEEKAAPAPAPVPVGGITVEDDENLARILQAEEEAQLLQETAGGP
HsYOD1	146	-----LPV-----ITRTVVPADNSCLFTSVYYVEGGILNPACAPEMR
DmCG4603	125	VAQAADYQLPVPAPTESGPNDFNGILKKVVPADNSCLFTSIREILNGKVDNEG-SEMR
HsYOD1	184	HITAGEVAADQSYNDVVLGKSNABYQANIQKASWGGAIIVSILSNYYGIEIDVVEIIN
DmCG4603	184	RLIACIVASDIDFYSEILIGTINQEYQDIKRDITWGGAIIEISILSKFYQCETCVVITIT
HsYOD1	244	AIINFFGEEKNEGLRVFLFDGIHYDEITME-TSSAATATIPVEELGYQAEQLANE
DmCG4603	244	VRIDRFGEAGYTKRVLIIYDGIHYDEIKRNFPDIDTFELTISSNDDILVQALELADS
HsYOD1	304	EQSSNYINIDKFTLRCLQDVRIVSGVQAQEHANQTGHKNFSGHI
DmCG4603	304	ARRRQFTIDNRFILRCMVQKGLTGAELREHANETGHTNFGEV
HsOTUD5	94	EQQASFPFCGFEFGK---SGPGDALGAAAGVGAAGVVVGVGGAVGVN--SCSGGHGSK
DmCG6091	100	SEKLVHTAAASNANGVSSKCNSPFSTSTSGSSSPSANGNSPEHLDELCTIVE---T
HsOTUD5	151	RRRQAPGVGVGGGSPERTEVGATYNSDEYEAAAAAIEAMDPAIVEQOEHWEEALRDK
DmCG6091	157	AOVMSTSTTAANLLKTVETFTSGYNSGDEHHQPKELIPVEE--WQRDLERACM-EQ
HsOTUD5	211	KFIIRQMKEDGACLFRAVADVVGIDQDMHEVVKKICNDILMKIADVPSNYITEDFTTIT
DmCG6091	214	RVEELPVEEDGACLFPSISLIYGGDEEMHDIHQITMDIHEIREMNGQFYTEDINSYR
HsOTUD5	271	NARFKNNCGNHIFMAMAMNNPVEYVQSTGTSAVEPINTHGIHQNEDE-RIIVVY
DmCG6091	274	QKRDARDHSHHIIIDISEIISNTVEVNCQSN-----FININSEQSQAGYPLILSY
HsOTUD5	330	HNINIVSVVMNKAITIGVGLGIPSEFNGFAEQSLMNAIKTSEESWIEQQLLEDKRRAT
DmCG6091	329	QNGSNYAILIYNATVSGGLGAGYKREIQ---TDEAVRLSEQLEKEITFEDRLKTS
HsOTUD5	390	DWEATNEAIEEQVARESYLQWLDQEKQAPQVRGFPQPRKASATCSAATAA
DmCG6091	385	DWEATNEAIEEQIARESYLQWQENTQRSN-----NTAAGSATSTVNSA

9. ábra A CG4603 illetve CG6091 *Drosophila* gének és humán homológjuk által meghatározott fehérjék aminosav szekvenciájának összehasonlítása. Zöld keretben láthatóak a konzervált OTU domének, piros szín jelzi az azonos, sárga szín a hasonló aminosavakat.

A dezubikvitinázok a sejt ubikvitin homeosztázisának fenntartásában szerepet játszó enzimek ismertek az élesztők és az ember esetén. Az *ecetmuslica* esetén azonban még nem azonosították őket. Ezért ismert humán és élesztő DUB-ok aminosav

szekvenciájával megszűrtük a *Drosophila* genomot. Vizsgálatainkhoz a National Center for Biotechnology Information (NCBI) által rendelkezésre bocsátott internetes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) WU-BLAST, PSI-BLAST és PHI-BLAST adatbázis kereső algoritmusait használtuk (Altschul et al., 1997, McGinnis et al., 2004). Ezek a programok aminosav szekvenciát hasonlítanak össze minden olvasási keretben folyamatosan átfordított nukleotid szekvenciákkal, majd pedig statisztikailag szignifikáns hasonlóságot keresnek a szekvenciák között. A 9. ábra, két feltételezett *Drosophila* DUB (*CG4603* és *CG6091*) aminosav szekvenciáját mutatja az azonosítására használt humán fehérje aminosav szekvenciájával összehasonlítva. A humán YOD1 deubikvitináz gén által meghatározott polipeptid 42%-ban azonos, 57%-ban hasonló aminosavakat tartalmaz, mint a *Drosophila CG4603* gén által meghatározott polipeptid. A humán fehérje tartalmaz egy jellegzetes OTU domént. Ezen doménen belül a homológia még nagyobb mértékű, 59% azonos és 74% hasonló. A humán OTUD5 48% azonosságot és 70% hasonlóságot mutat a *Drosophila melanogaster CG6091* gén által meghatározott fehérje aminosav szekvenciájával. Az OTU domének ebben az esetben 51% azonosságot és 76% hasonlóságot mutatnak. Az aminosav és doménszerkezet hasonlóság alapján a *CG4603* és *CG6091* gének feltételezett terméke dezubikvitináznak tűnik.

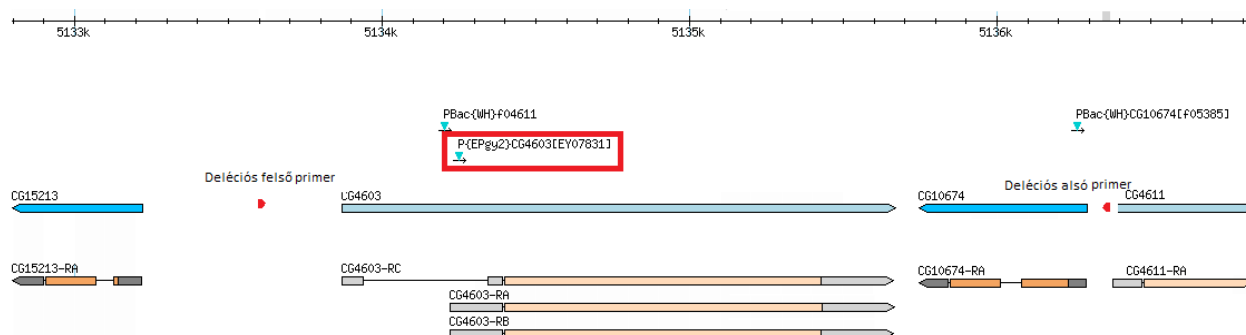
4.2. A *CG4603* deléció allél izolálása

A genetikai analízis lényege, hogy egy gén szerepét mutáns alléljai fenotípusának tanulmányozásával derítjük ki. Mutánsok előállítására leggyakrabban alkalmazott módszer a P elem inszerciós és kiugratásos mutagenézis. Ennek az az alapja, hogy egy gén közelében elhelyezkedő P elem mobilizációja után gyakran inszertálódik az eredeti inszerciós hely közelébe, szerencsés esetben a célgénünkbe, vagy kivágódása következtében egy deléciót hagy hátra, ami szerencsés esetben eltávolítja a génünk kódoló régiójának egy szakaszát és csak azt.

Sajnos a törzsközpontokban nincs a *CG4603* és *CG6091* géneket érintő mutáns, csupán az 5' nem transzlálódó régióban találhatóak P-elem inszerciók, illetve a VDRC (Vienna *Drosophila* RNAi Center) rendelkezik RNS interferencia vonalakkal ezekre a génekre. A transzgénikus RNS interferencia szintén egy P elemre épülő, hatékony, reverz

genetikai módszer. Ez ugyan nem a klasszikus értelemben vett mutáns előállítás, azonban végeredményét tekintve az általa létrehozott fenokópia megegyezik a funkcióvesztéses mutánsok által okozott fenotípussal. Mivel azonban az RNS-interferencia által okozott géncsendesítés nem száz százalékos mértékű, homozigóta életképes fenotípus esetén nem lehetünk biztosak benne, hogy a génünk nem létfontosságú vagy csak a csendesítés mértéke nem volt megfelelő. A *CG4603* és *CG6091* gének az RNS interferencia vonalakkal végzett vizsgálatok alapján nem létfontosságúak. Annak érdekében, hogy biztosak lehessünk abban, hogy a géneink nem létfontosságúak, elő kell állítsuk a gének null mutáns allélját.

A *CG4603* jelű gén a *Drosophila melanogaster* 3. kromoszómájának bal karján található a64C7 citológia pozícióban. A 10. ábrán látható a gén genomi környezete. A gén szekvencia helyzete: 3L:5126971..5128770. A *CG4603* gén 5' végétől 651 bp.-ra található a szomszédos *CG15213* gén 5' vége, míg 3' végétől mindössze 78 bázispárra végződik szomszédos *CG10674* jelű gén. A gén 1799 bp. hosszúságú, egyetlen exonból áll és feltételezhetően három transzkript képződik róla.



10. ábra A *CG4603* gén és környezete. (Pirossal bekeretezve a felhasznált P elem. Piros nyilak jelölik a felhasznált primer párt.)

A 10. ábrán látható, hogy eddig két olyan P elem inszerciós törzset azonosítottak, amelyek a *CG4603* gén területére esnek. Az inszertálódott P elem mindkét esetben a gén 5' végén található. Null mutáns előállítására csak a P(EP) elemet tudjuk felhasználni, mivel a PBac elem precízen vágódik ki remobilizációja esetén, így nem alkalmas deléció előállítására.

A *CG4603* gént érintő deléció előállításához a w; P{EPgy2}CG4603(EY07831) P elem inszerciót hordozó vonalat a +; Df(3L)C4/TM3, Sb P(Δ2-3) transzpozáz forrást hordozó törzshöz kereszteztük. Ugyanis a P elem mobilitásához két dologra van szükség. A P elemek végén található fordítottan ismétlődő repetitív végekre, ez megvan a P(EP) elemnek, illetve transzpozáz enzimre, ez utóbbit termeli a P(Δ2-3).

Ez utóbbi egy olyan módosított P elem, amelynek nincsenek meg a fordítottan ismétlődő végei, így ön maga nem mobilizálható, viszont rendelkezik a transzpozáz génnel, még hozzá annak egy olyan változatával, amelyben hiányzik a 2. és 3. exon közötti intron, így folyamatosan termeli az enzimet.

A keresztezés utódai közül 200 db „jumpstarter” állatot gyűjtöttünk. Ezek a w/Y; P{EPgy2}CG4603(EY07831)/ TM3, Sb P(Δ 2-3) genotípusú utódok mindkét P elemet hordozzák, így bennük történik meg a P(EP) elem mobilizálódása. A továbbiak szempontjából az ivarsejtvonalban bekövetkezett esemény a fontos, de szomatikusan is megfigyelhető a P elem kivágódása. Ez megfigyelhető az állatok szemén, ami foltos.

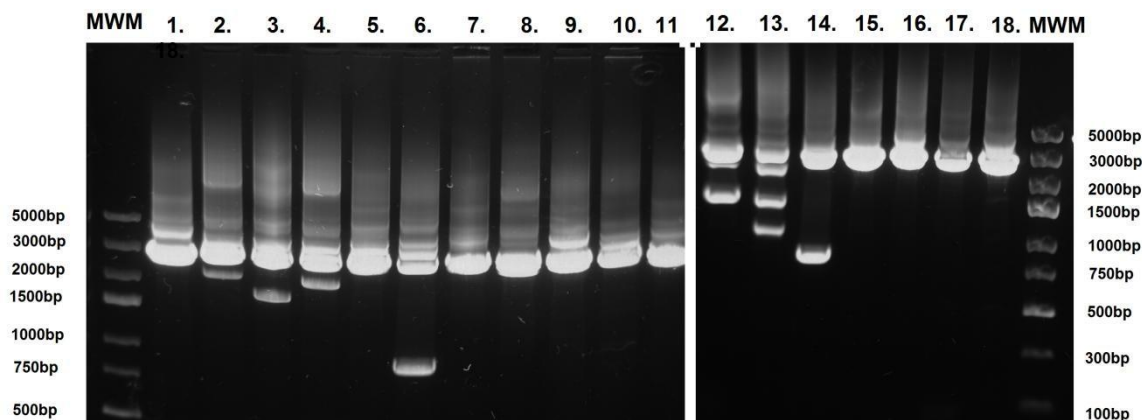
Az ivarsejtekben bekövetkezett események követésére a „jumpstarter” állatokat balanszer kromoszómákat hordozó állatokhoz kereszteztük. A keresztezésekből származó fehér szemű utódok reprezentálják a P elem kivágódását. Mivel a P elem kivágódása már ősvarsejt állapotban bekövetkezhet ez pedig klón képződéséhez vezet egy „jumpstarter” keresztezésből csak egy fehér szemű utódot tartottunk meg. További keresztezési lépéseken keresztül 176 db remobilizált kromoszómát hordozó törzset alapítottunk. Ezeket PCR reakciókkal vizsgáltunk esetleges deléciók azonosítására.

4.3. A CG4603 deléciók azonosítása

Amikor a remobilizált P elem kivágódása nem precízen történik meg, hanem vagy hátrahagy egy darabot magából, vagy elvisz magával egy darabot az inszerció helyével szomszédos szekvenciákból, akkor megváltozik az adott genomi régió mérete. Ha olyan primerpárok felhasználásával csinálunk PCR reakciót, amelyek ezen a területen kívül találhatók akkor a vad típustól eltérő méretű fragmentet kapunk. Mivel olyan deléciók előállítása a cél, amelyek a CG4603 gén minél nagyobb részét eltávolítják viszont érintetlenül hagyják a szomszédos géneket, olyan primerpárt terveztünk, amelynek egyik tagja (CG4603 deléciós felső) 251 bázispárra van a CG4603 gén 5' végétől, a másik pedig (CG4603 deléciós alsó) 674 bázispárra a gén 3' végétől. A primerpár által amplifikált vad típusú fragmentméret 2767 bp. (10. ábra).

Mivel 176 vonalon PCR reakciót végezni meglehetősen idő és pénzigényes lenne, a jelölteket tízes csoportokba osztottuk (17db 10 törzset és egy darab 6 törzset tartalmazó csoport). A csoport minden tagjából kiválasztottunk 3 db legyet és a 30 légyből genomikus

DNS-t izoláltunk. Az izolált genomikus DNS-en PCR reakciót végeztünk a CG4603 deléciós felső-alsó primerpárral. Deléción jelenlétére az utal, ha a 2767 bp.-os vad típusú fragmentnél kisebb fragmentet kapunk a PCR termékek gélelektroforézise után.

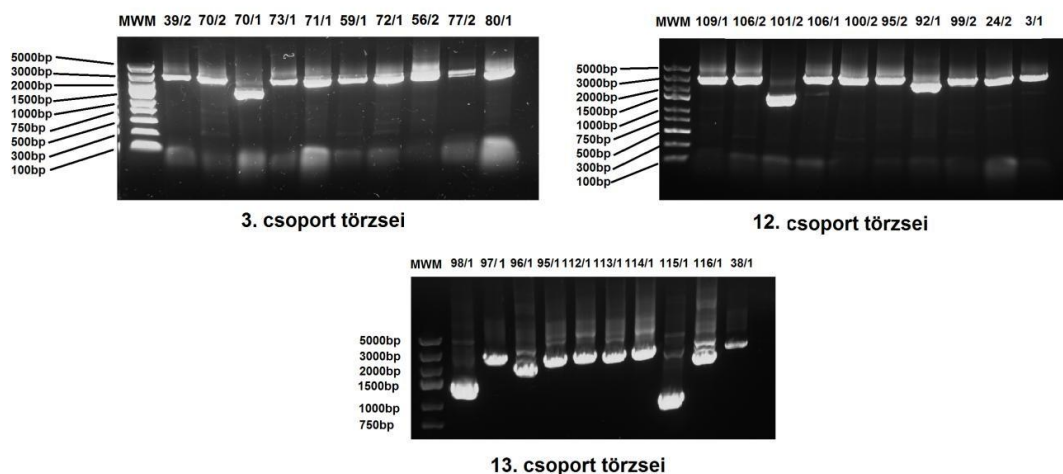


11. ábra A CG4603 deléciós primerpárral végzett PCR eredménye

Vadtípustól eltérő méretű fragmentek láthatók a 2., 3., 4., 6., 12., 13. és 14. csoportban,

Mint az a 11. ábrán látható, 7 csoportban van vad típustól eltérő méretű fragment.

A 3., 12., 13. csoportba tartozó minden törzsön megismételtük a PCR reakciót, hogy azonosítani tudjuk a tízes csoportok azon tagját, amely a deléciót hordozza. Ebből az derült ki, hogy hét törzs hordoz deléciót (12. ábra). Ezek azonosítószáma a következő: 70/1, 101/2, 92/1, 98/1, 96/1, 115/1, és 116/1.



12. ábra A CG4603 deléciós primerpárral végzett PCR eredménye

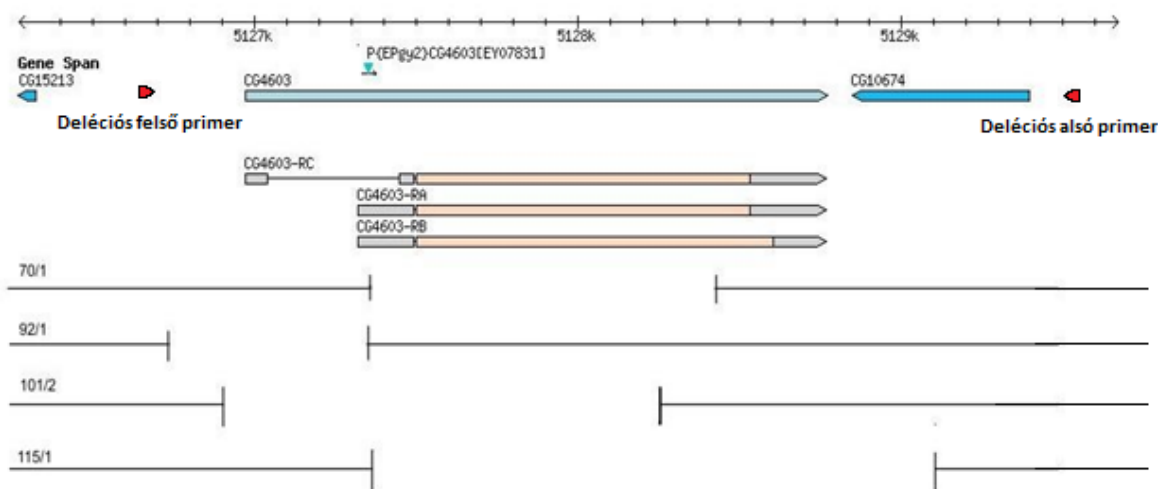
A 3., 12. és 13. tízes csoport tagjain elvégzett PCR reakció alapján a 70/1, 101/2, 92/1, 98/1, 96/1, 115/1 és 116/1 törzsekben találhatók vadtípustól eltérő méretű fragmentek.

A hét törzsből négyet (70/1, 115/1, 101/2 és 92/1) kiválasztottunk és a róluk amplifikált PCR fragmentet, pTZ57R vektorba klónozás után, szekvenáltattuk. A kapott szekvenciák alapján megállapíthatjuk, hogy a 70/1-es törzs megfelelő deléciót tartalmaz, mivel teljes egészében a *CG4603* gén területére esik, eltávolítva a kódoló régió nagy részét (13. ábra). A deléció mérete 1069bp, a gén 664. bázispárjától kezdődik és az 1732. bázispárig tart.

A 92/1 azonosítójú törzs esetén a deléció mérete 287 bp, eltávolítja a *CG4603* gén 5' végét, viszont nem érinti a kódoló régiót (13. ábra).

A 101/2 törzs is megfelelő deléciót tartalmaz. A deléció mérete 1348 bp, csak a *CG4603* gént érinti, eltávolítva annak 5' nem transzlálódó régióját és a kódoló régió nagy részét.

A 115/1-es törzs által hordozott deléció a legnagyobb. (13. ábra) Ennek mérete 1746 bp, azonban 3' vége átnyúlik a szomszédos *CG10674* gén területére, így számunkra ez a deléció nem bizonyult megfelelőnek.



13. ábra A *CG4603* gént érintő deléciók kiterjedése.
A deléciók kiterjedését az alsó négy vonal hiányzó szakasza mutatja.
Piros nyilak jelölik a felhasznált primer-pár helyét.

A 13. ábrán az is látható, hogy három deléció esetén az egyik töréspont az eredeti P elem inszerciós helyre esik. A 101/2 allél ebben a tekintetben különbözik a többitől.

Az előállított deléciók eltávolítják a *CG4603* gén kódoló régiójának jelentős részét, tehát null mutánsnak tekinthetők. Meghatározva, hogy ezek az állatok az egyedfejlődés

melyik szakaszában pusztulnak el, eldönthetjük, hogy a *CG4603* gén létfontosságú-e a *Drosophila melanogaster* egyedfejlődése szempontjából.

4.4. A *CG4603* deléciós mutánsok letálfázisának meghatározása

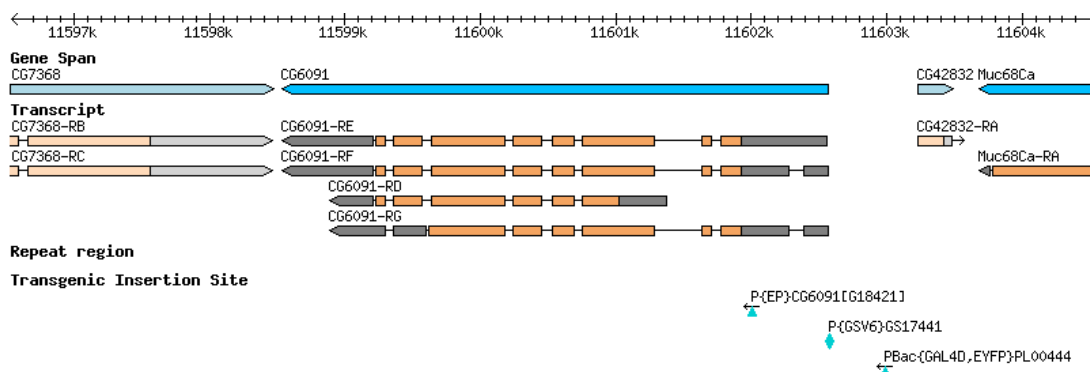
A letálfázis meghatározásához törzsenként 200 db első stádiumos lárvát gyűjtöttünk és folyamatosan követtük a fejlődésüket. Kontrollként w1118 állatokat használtunk.

	Kontrol	CG4603 deléciós törzsek		
	w1118	70/1	92/1	101/2
L1 lárva (db)	200	200	200	200
Kikelt adult (db)	77	91	123	95
Százalékérték (%)	38,5	45,5	61,5	47,5

Az eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a *CG4603* gén terméke nem létfontosságú az *ecetmuslica* egyedfejlődése szempontjából.

4.5. A *CG6091* deléciós allél izolálása

A *CG6091* jelű gén ugyancsak a *Drosophila melanogaster* 3. kromoszómájának bal karján található a 68C15 citológiai pozícióban. A 14. ábrán látható a gén genomi környezete. 3' végétől mindössze 61 bp-ra végződik a *CG7368* gén és 5' végétől 669 bp-ra kezdődik a *CG42832* jelű gén. A gén 4030 bp hosszú, 8 exonból áll és 4 feltételezett transzkriptum képződik róla.



14. ábra *CG6091* gén és környezete
A P elem inszerciók helyét zöld háromszög jelzi.

A CG6091 gén területén két P elem inszerciót azonosítottak (14. ábra). Ezek közül a w;P{EP}CG6091(G18421) közelebb van a kódoló régió kezdetéhez, ezért ezt használtuk a deléció előállítására.

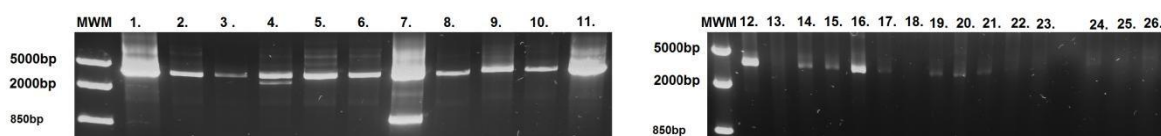
A P elem mobilizálásához a P{EP}CG6091(G18421) vonalat ebben az esetben is a Df(3L)C4/TM3, Sb P(Δ 2-3) transzpozáz forrást tartalmazó törzshöz kereszteztük az előzővel megegyező módon.

Ebben az esetben is 200 db „jumpstarter” keresztezést alapítottunk. A „jumpstarter” állatok genotípusa ebben az esetben w/Y; P{EP}CG6091(G18421)/ TM3, Sb P(Δ 2-3). A továbbiakban úgy jártunk el, mint az előzőleg ismertetett génnél.

A CG6091 gén esetén 256 db olyan törzset alapítottunk amely remobilizált kromoszómát hordozott. Itt is PCR reakcióval azonosítottuk a gént érintő deléciókat.

4.6. A CG6091 deléciók azonosítása

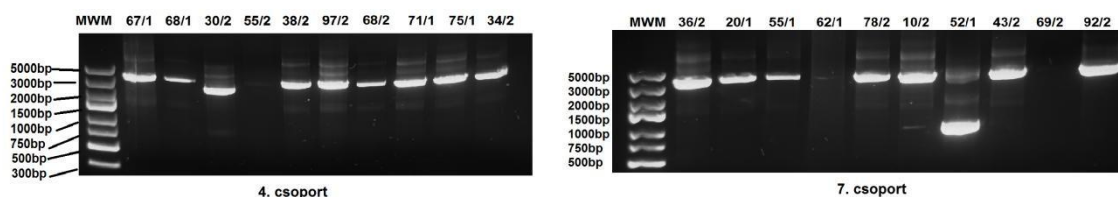
Mivel a gén 4030 bp hosszúságú, annak érdekében, hogy a vad típusú PCR fragmentet is sikerüljön amplifikálnunk, illetve, hogy csak azokat a deléciókat azonosítsuk, amelyek csak a CG6091 gén területére esnek, olyan primerpárt terveztünk, amelyek mindkét tagja a gén területére esik. Az felső primer a gén 2408. bázisánál, az alsó primer pedig a gén 5836. bázisánál kezdődik. A primer pár által sokszorozott vad típusú fragment mérete 3448 bázispár.(17. ábra) Itt is 10-es csoportokba osztottuk a 256 remobilizált kromoszómát hordozó törzset. 25 db 10 törzset és egy darab 6 törzset tartalmazó csoportot készítettünk. Minden törzset három állat képvisel a csoportokban amikből genomikus DNS-t izoláltunk. A PCR reakciók eredménye a 15. ábrán látható. Két csoportban, a 4. és 7.-ben található a vad típusnál kisebb méretű fragment.



15. ábra A CG6091 deléciós primerpárral végzett PCR eredménye
Vadtípustól eltérő méretű fragmentek láthatók a 4. és 7.
csoportban.

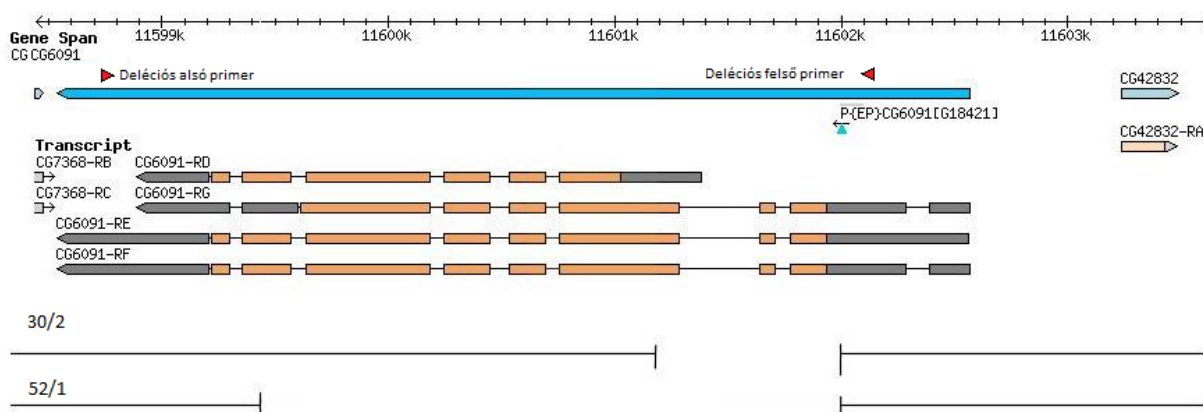
A deléciós vonalak azonosításához a 4. és 7. csoport minden törzsén elvégeztük a PCR reakciót, amiből kiderült, hogy a 30/2 és 52/1 azonosítójú törzsek a jók (16. ábra).

A deléciós fragmenteket ismételt PCR reakció után, ebben az esetben is pTZ57R/T plazmid vektorba klónoztuk.



16. ábra A CG6091 deléciós primerpárral végzett PCR eredménye
A vad típusnál kisebb fragment képződött a 4. csoport 30/2-es törzséből és a 7. csoport 52/1-es törzséből izolált genomikus DNS-en.

A kapott szekvenciák alapján megállapítottuk, hogy mindkét törzsben megfelelő a képződött deléció (17. ábra). A 30/2 törzs esetén a 4030 bázispár hosszú gén 572. bázispárjától, a 1386. bázispárjáig tart, vagyis mérete 815 bázispár. Az 52/1 törzs esetében is az 572. bázispártól kezdődik a deléció, és egészen a 3128. bázispárig tart. A deléció 2557bp méretű, majdnem a teljes kódoló régiót eltávolítja.



17. ábra A CG6091 gént érintő deléciók kiterjedése.
A deléciók kiterjedését az alsó két vonal hiányzó szakasza mutatja. Piros nyilak jelölik a felhasznált primer-pár helyét.

Bár ebben az esetben több remobilizált kromoszómát tartalmazó jelöltből indultunk ki, csak két deléciós mutánst sikerült azonosítanunk. Ennek az lehet az oka, hogy a PCR-hez tervezett primerek túl közel voltak egymáshoz, így azokat a deléciókat amelyek töréspontja közel esett a PCR primerhez nem vettük észre, esetleg a deléció el is távolította azt a régiót

ahová a primerek estek, így nem kaptunk PCR terméket. Az azonosított két mutáns megfelelő kísérleteinkhez, null allélok.

4.7. A CG6091 deléciós allél letálfázisának meghatározása

A letálfázis meghatározása ugyanúgy történt, mint a CG4603 gén esetén. Törzsenként 200 db első stádiumos lárvát gyűjtöttünk és folyamatosan követtük a fejlődésüket. Kontrolként itt is w1118 állatokat használtunk.

	Kontrol	CG6091 deléciós törzsek	
	w1118	30/2	52/1
L1 lárv (db)	200	200	200
Kikelt adult (db)	147	136	143
Százalékérték (%)	73,5	68	71,5

Az eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a CG6091 gén terméke nem létfontosságú az ecetmuslica egyedfejlődése szempontjából.

Az általunk létrehozott null-mutánsok segítségével a gének további genetikai analízise és jellemzése a cél a jövőben.

5. Összefoglalás

Az élőlények folyamatos, ismétlődő sejtosztódási- és sejtnövekedési ciklusokon keresztül jön létre. A sejtciklus megfelelő működésének egyik elengedhetetlen feltétele az egyes fázisok után fölöslegessé váló fehérjék eltávolítása. A már nem szükséges fehérjéket egy ubikvitin-függő fehérjelebontó rendszer távolítja a sejtől. Egy enzimaszkád több ubikvitin monomerből álló poliubikvitin láncot helyez a lebontásra ítélt fehérjékre, amelyeket ezután a proteasóma bont le. Fehérjedegradáció után a visszamaradó poliubikvitin láncok monoubikvitinekre bomlanak, amelyek így újra felhasználhatóvá válnak. Ezt a folyamatot katalizálják a dezubikvitiláló enzimek vagy DUB-ok.

Számos DUB biokémiai funkciója ismert, elsősorban élesztő és emlős sejtvonalakon végzett vizsgálatokból, azonban élettani folyamatokban betöltött szerepük kevésbé tisztázott. Csoportunkban a dezubikvitilázok azonosítását és genetikai jellemzését végzik egy soksejtű modellorganizmusban, az ecetmuslicában. Munkánk során 46 *Drosophila* DUB-ot azonosítottunk bioinformatikai módszerekkel.

Munkám célja két, OTU alosztályba tartozó DUB-ot kódoló gén genetikai jellemzése. Ehhez különböző mutáns allélokra van szükség. Feladatom a két DUB gén null-mutánsainak előállítása volt P elem remobilizációs technikával. A P-elem egy mozgékony genetikai elem mely segítségével deléciót hozhatunk létre, az elem nem precíz kivágódásával. A lehetséges deléciós mutációt tartalmazó törzsekből genomikus DNS-t izolálva, PCR segítségével mutattam ki a deléciók létét. A PCR eredményét gélekeltroforézis segítségével analizáltam. Mindkét gén esetében több deléció létét sikerült kimutatni. A deléciók kiterjedését szekvenálással határoztam meg. Ezután a null-mutánsokat letálfázis vizsgálat segítségével jellemeztem, melynek során egyedfejlődésüket követtem. A deléciós homozigóták százalékos kikelési aránya közelítőleg megegyezett az elméletileg várható aránnyal, így a vizsgált gének deléciója nem létfontosságú. A kísérlet eredményeként létrehozott null-mutánsokat a gének további jellemzésére használjuk.

6. Irodalomjegyzék

1. Wilkinson K. D. and Audhya T. K. (1981). Stimulation of ATP-dependent proteolysis requires ubiquitin with the COOH-terminal sequence Arg-Gly-Gly. *J Biol Chem.* 256(17):9235-41.)
2. Hershko A. , Ciechanover A. and Rose I. A. (1981). Identification of the active amino acid residue of the polypeptide of ATP-dependent protein breakdown. *J Biol Chem.* 256(4):1525-8.
3. Glickman, M. H. and Ciechanover, (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* 82, 373-428.
4. Sjoerd J. L. van Wijk, Sjoerd J. de Vries, Patrick Kemmeren, Anding Huang , Rolf Boelens, Alexandre M. J. J. Bonvin, H. Th. Marc Timmers (2009) A comprehensive framework of E2-RING E3 interactions of the human ubiquitin-proteasome system. *Mol Syst Biol* 2009 18;5:295. Epub 2009 Aug 18.
5. Baboshina O.V., Haas A. L., (1996) Novel multiubiquitin chain linkages catalyzed by the conjugating enzymes E2EPF and RAD6 are recognized by 26 S proteasome subunit 5.
6. Chau, V., Tobias, J.W., Bachmair A, Marriott, D., Ecker D.J., Gonda D.K., Varshavsky, A. (1989), A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein
7. Roseanne M. Hofmann and Cecile M. Pickart (1999), Noncanonical MMS2-Encoded Ubiquitin-Conjugating Enzyme Functions in Assembly of Novel Polyubiquitin Chains for DNA Repair. *Cell*, 96 (1999), pp. 645–653
8. Koegl M , Hoppe T. , Schlenker S., Ulrich H. D., Mayer T. U., Jentsch S. (1999), A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly.
9. Wu-Baer F., Lagazon K., Yuan W., Baer R. (2003), The BRCA1/BARD1 heterodimer assembles polyubiquitin chains through an unconventional linkage involving lysine residue K6 of ubiquitin.
10. Deng L., Wang C., Spencer E., Yang L., Braun A., You J., Slaughter C., Pickart C. & Chen Z.J. (2000) Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric Ub-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell*, 103, 351–361.
11. Lingyan Jin, Adam Williamson, Sudeep Banerjee, Isabelle Philipp, Michael Rape (2008) Mechanism of Ubiquitin-Chain Formation by the Human Anaphase-Promoting Complex *Cell*, 133 (2008), pp. 653–665
12. Spence, J., Sadis, S., Haas, A. L., Finley, D. (1995) A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol. Cell. Biol.*, 15 (1995), pp. 1265–1273
13. Hicke L. and Riezman H. (1996) Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis.
14. Springael J. Y., De Craene J. O., André B., (1999), The yeast Npi1/Rsp5 ubiquitin ligase lacking its N-terminal C2 domain is competent for ubiquitination but not for subsequent endocytosis of the gap1 permease.
15. Levinger L. , Varshavsky A., (1980) Selective arrangement of ubiquitinated and D1 protein-containing nucleosomes within the Drosophila genome. *Cell.* 1982 Feb;28(2):375–385.
16. Nijman, S. M. et al. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* 123, 773–786 (2005).
17. Larsen, C. N., Krantz, B. A. & Wilkinson, K. D. (1998) Substrate specificity of deubiquitinating enzymes: ubiquitin C-terminal hydrolases. *Biochemistry* 37, 3358–3368 (1998).

18. Amerik, A., Swaminathan, S., Krantz, B. A., Wilkinson, K. D. & Hochstrasser, M. In vivo disassembly of free polyubiquitin chains by yeast Ubp14 modulates rates of protein degradation by the proteasome. *EMBO J.* 16, 4826–4838 (1997).
19. Ambroggio, X. I., Rees, D.C., and Deshaies, R. J. (2004). JAMM: a metalloprotease-like zinc site in the proteasome and signalosome. *PLoS Biol.* 2, e2. 10.1371/journal.pbio.0020002.
20. Misaghi S., Galardy P.J., Meester W.J., Ovaa H., Ploegh H.L., Gaudet R. (2005), Structure of the ubiquitin hydrolase UCH-L3 complexed with a suicide substrate. *J Biol Chem.* 2005 Jan 14;280(2):1512-20. Epub 2004 Nov 5.
21. . Leroy E., Boyer R., Polymeropoulos M.H. (1998) Intron-exon structure of ubiquitin c-terminal hydrolase-L1..*DNA Res.* 1998 Dec 31;5(6):397-400.
22. Liu Y, Fallon L, Lashuel H.A., Liu Z., Lansbury P.T. Jr. (2002); The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility.*Cell.* 2002 Oct 18;111(2):209-18.
23. Makarova O.V., Makarov E. M., Lührmann R. (2001) The 65 and 110 kDa SR-related proteins of the U4/U6.U5 tri-snRNP are essential for the assembly of mature spliceosomes. *EMBO J.* 2001 May 15;20(10):2553-63.
24. McGouran et al., Deubiquitinating Enzyme Specificity for Ubiquitin Chain Topology Profiled by Di-Ubiquitin Activity Probes, *Chemistry & Biology* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.10.012>
25. Courtois, G. (2008). Tumor suppressor CYLD: negative regulation of NF-kappaB signaling and more. *Cell Mol. Life Sci.* 65, 1123-1132.
26. Brummelkamp, T.R., Nijman, S.M., Dirac, A.M., and Bernards, R. (2003). Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB. *Nature* 424, 797–801.
27. Poblete Gutiérrez P., Eggermann T., Höller D., Jugert F.K., Beermann T., Grussendorf-Conen E.I., Zerres K., Merk H.F., Frank J. Phenotype diversity in familial cylindromatosis: a frameshift mutation in the tumor suppressor gene CYLD underlies different tumors of skin appendages.
28. Sato, Y., Yoshikawa, A., Yamagata, A., Mimura, H., Yamashita, M., Ookata, K., Nureki, O., Iwai, K., Komada, M. and Fukai, S. (2008). Structural basis for specific cleavage of Lys 63-linked polyubiquitin chains. *Nature* 455, 358-362.
29. Marfany, G. and Denuc, A. (2008). To ubiquitinate or to deubiquitinate: it all depends on the partners. *Biochem.Soc. Trans.* 36, 833-838.
30. Ventii, K. H. and Wilkinson, K. D. (2008). Protein partners of deubiquitinating enzymes. *Biochem. J.* 414, 161-175.
31. Clegg, H. V., Itahana, K. and Zhang, Y. (2008). Unlocking the Mdm2-p53 loop: ubiquitin is the key. *Cell Cycle* 7, 287-292.
32. Meulmeester, E., Pereg, Y., Shiloh, Y. and Jochemsen, A. G. (2005). ATM-mediated phosphorylations inhibit Mdmx/Mdm2 stabilization by HAUSP in favor of p53 activation. *Cell Cycle* 4, 1166-1170.
33. Wada, K. and Kamitani, T. (2006). UnpEL/Usp4 is ubiquitinated by Ro52 and deubiquitinated by itself. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342, 253-258.

34. Mao, Y., Senic-Matuglia, F., Di Fiore, P.P., Polo, S., Hodsdon, M.E., and De Camilli, P. (2005). Deubiquitinating function of ataxin-3: insights from the solution structure of the Josephin domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 12700–12705.
35. Nicastro, G., Menon, R.P., Masino, L., Knowles, P.P., McDonald, N.Q., and Pastore, A. (2005). The solution structure of the Josephin domain of ataxin-3: structural determinants for molecular recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 10493–10498.
36. Li, F., Macfarlan, T., Pittman, R.N., and Chakravarti, D. (2002). Ataxin-3 is a histone-binding protein with two independent transcriptional corepressor activities. *J. Biol. Chem.* 277, 45004–45012.
37. Goodrich, J. S., Clouse, K.N., and Schupbach, T. (2004). Hrb27C, Sqd and Otu cooperatively regulate gurken RNA localization and mediate nurse cell chromosome dispersion in *Drosophila* oogenesis. *Development* 131, 1949–1958.
38. Steinhauer, W. R., Walsh, R.C., and Kalfayan, L.J. (1989). Sequence and structure of the *Drosophila melanogaster* ovarian tumor gene and generation of an antibody specific for the ovarian tumor protein. *Mol. Cell. Biol.* 9, 5726–5732.
39. Makarova, K.S., Aravind, L., and Koonin, E.V. (2000). A novel superfamily of predicted cysteine proteases from eukaryotes, viruses and *Chlamydia pneumoniae*. *Trends Biochem. Sci.* 25, 50–52.
40. Nanao, M.H., Tcherniuk, S.O., Chroboczek, J., Dideberg, O., Dessen, A., and Balakirev, M.Y. (2004). Crystal structure of human otubain 2. *EMBO Rep.* 5, 783–788.
41. Balakirev, M.Y., Tcherniuk, S.O., Jaquinod, M., and Chroboczek, J. (2003). Otubains: a new family of cysteine proteases in the ubiquitin pathway. *EMBO Rep.* 4, 517–522.
42. Evans, P.C., Smith, T.S., Lai, M.J., Williams, M.G., Burke, D.F., Heyninck, K., Kreike, M.M., Beyaert, R., Blundell, T.L., and Kilshaw, P.J. (2003). A novel type of deubiquitinating enzyme. *J. Biol. Chem.* 278, 23180–23186.
43. James H. Sang (2001). "Drosophila melanogaster: The Fruit Fly". In Eric C. R. Reeve. *Encyclopedia of genetics*. USA: Fitzroy Dearborn Publishers, I. p. 157. ISBN 978-1-884964-34-3. Retrieved 2009-07-01.
44. Pernille Røth (1996), A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes.
45. Bellen H.J. , Levis R. W. , Liao G. , He, Y., Carlson J.W. , Tsang G , Evans-Holm M., Hiesinger P. R., Schulze K. L., Rubin G. M., Hoskins RA, Spradling A. C. (2004). The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes.
46. 1. ábra http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f0/Ubiquitin_cartoon-2-.png
47. 5. ábra <http://drosi.files.wordpress.com/2010/12/life-cycle.jpg>
48. 6. és 7. ábra <http://flypush.imgen.bcm.tmc.edu/pscreen/transposons.html>
49. 8. ábra <http://scialert.net/fulltext/?doi=pjbs.2006.2652.2656&org=11#f6>

7. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek - Dr. Deák Péternek a támogatásáért és a sok segítségért, amit munkám során kaptam, Dr. Pál Margitnak és Kovács Leventének a rengeteg időért, melyet tanításomra fordított, Tomisa Bernadettnek hasznos tanácsaikért, melyek a fejlődésemet szolgálták, és mindenkinek, aki hozzájárult ahhoz, hogy a munkám sikeres legyen.

8. Tételes hozzájárulás

Alulírott Borkúti Péter a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- P elem remobilizációs keresztezést
- genomikus DNS izolálását,
- DNS restrikciós emésztést,
- PCR reakciót,
- E. coli transzformációt,
- letálfázis vizsgálatot

végeztem el.

.....

aláírás

Szeged, 2014. november 12.