

XXXII. OTDK Biológia Szekció

Egy feltételezett ubikvitin receptor jellemzése

Varga Júlia

Biológus MSc

II. év

Szegedi Tudományegyetem

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Biokémia Intézet

Eukarióta Sejtciklus Szabályozási Csoport

Témavezetők: Dr. Deák Péter és Dr. Pál Margit

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETŐ	2.
1.1. Irodalmi áttekintés	2.
1.1.1. Az ubikvitin jel és az ubikvitin ligáz enzimkaszád	2.
1.1.2. 26S proteaszóma	3.
1.1.3. Poliubikvitin receptorok	5.
1.1.4. <i>Drosophila</i> poliubikvitin receptorok	7.
1.1.5. Az ubikvitin-proteaszóma rendszer jelentőségének összefoglalása	9.
1.2. Az <i>ecetmuslica</i> modell	10.
2. CÉLKITŰZÉSEK	13.
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	14.
3.1. Alkalmazott <i>Drosophila melanogaster</i> törzsek	14.
3.2. Letálfázis meghatározás	15.
3.3. RNS izolálás	15.
3.4. Reverz transzkripció	16.
3.5. Szemikvantitatív reverz transzkripció-kapcsolt PCR (RT-PCR)	16.
3.6. Agaróz gélelektroforézis	17.
3.7. Baktérium transzformálás és plazmid izolálás	17.
3.8. Fehérjetermeltetés és –izolálás	17.
3.9. SDS-PAGE és Western-blot	18.
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELELSÜK	20.
4.1. A CG31528 gén azonosítása bioinformatikai módszerekkel	20.
4.2. A CG31528-specifikus RNS-interferencia vonalak letálfázisának vizsgálata	21.
4.3. GST-hez fuzionált rekombináns CG31528 fehérje termeltetése	25.
4.4. Glutathione-Sepharose géliszűrési kísérletek és Western-blot	26.
5. ÖSSZEFOGLALÁS	29.
6. IRODALOMJEGYZÉK	31.
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	35.
8. FÜGGELÉK	36.
9. TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS	38.

1. BEVEZETŐ

1.1. Irodalmi áttekintés

Az 1960-as és 1980-as évek között a tudományos vizsgálatok célpontjában a nukleinsavak álltak, és az érdekelte a kutatókat, hogy az általuk kódolt információ hogyan fordítódik át a fehérjék szintjére. Arra, hogy nem csupán a táplálkozás során szervezetünkbe juttatott, hanem a szervezetünket felépítő fehérjéket is képesek vagyunk lebontani, csak később derült fény, és a '80-as évek végén váltak ismertté a fehérjelebontás szereplői. Azóta tudjuk, hogy a sejtfehérjék lebontása szigorúan szabályozott, komplex folyamat. Szelektív felismerést követően az ubikvitinációs enzimkaszád egy poliubikvitin láncsal jelöli meg a fehérjét. Az ubikvitinációs enzimkaszád részét képezik az ubikvitin-aktiváló enzimek, az ubikvitin-konjugáló enzimek és az ubikvitin-ligázok. Ezt a jelként szolgáló poliubikvitin láncot poliubikvitin receptorok ismerik fel, majd a megjelölt fehérjét a proteolitikusan aktív 26S proteaszómához szállítják lebontásra. Az ubikvitin-proteaszóma rendszerben bomlik le a rövid féléletű vagy meghibásodott nukleáris és citoplazmatikus fehérjék 90%-a [1, 2]. Az ubikvitin-közvetítette fehérjelebontás felfedezéséért 2004-ben Nobel-díjjal jutalmazták Aaron Ciechanovert, Avram Hershtot és Irwin Roset.

1.1.1. Az ubikvitin jel és az ubikvitináló enzimkaszád

A lebontandó fehérjék poszttranszlációs módosításon mennek keresztül a lebontást megelőzően, melynek során ubikvitin (Ub) molekula kapcsolódik kovalensen hozzájuk. Az ubikvitin kovalens kötődése révén megváltoztatja a célfehérjék stabilitását, lokalizációját vagy aktivitását. Az ubikvitin egy konzervált, hőstabil, 76 aminosavból álló globuláris polipeptid, melynek molekulatömege 8 kDa. Hét lizin aminosav található benne (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63), melyek fontos részét képezik, ugyanis ezeken keresztül izopeptid kötással további ubikvitinek és ubikvitin szerű (ubiquitin like – Ubl) fehérjék kapcsolódhatnak hozzá. A szubsztráthoz az -Arg-Gly-**Gly76**-COO⁻ motívummal kapcsolódik az ubikvitin molekula [3, 4, 10].

Az ubikvitináció során az ubikvitin molekula először aktiválódik. Az aktiválást az E1, Ub-aktiváló enzim végzi egy kétlépéses, intramolekuláris, ATP-függő folyamat során. Egy nagy energiájú intermedier, E1-ubikvitin-thiol-észter keletkezik. Ezt követően az aktív ubikvitin az E2, Ub-konjugáló enzimre kerül, amely kölcsönhat az E3, Ub-ligázok egyikével. [1, 5, 9]. A folyamat szubsztrát-specifitását az E3, Ub-ligáz enzimek biztosítják, ugyanis minden E3 specifikus szubsztrátokkal lép kölcsönhatásba. Az E3 enzimeknek több száz típusa

ismert az eukarióta sejtekben és nagyon nagy változatosság jellemzi őket. Állhatnak egyetlen fehérjéből vagy akár fehérje komplexeket is formálhatnak. Míg a RING (Really Interesting New Gene) fingert tartalmazó E3-ak közvetetten juttatják át az ubikvitint a szubsztrátra, miközben nem alakítanak ki vele kovalens kötést, addig a HECT (Homologs to the E6AP C-Terminus) domént tartalmazó E3-ak aktív ciszteinje átveszi az ubikvitint az E2-ről és közvetlenül építi rá a szubsztrátra [1, 6, 7].

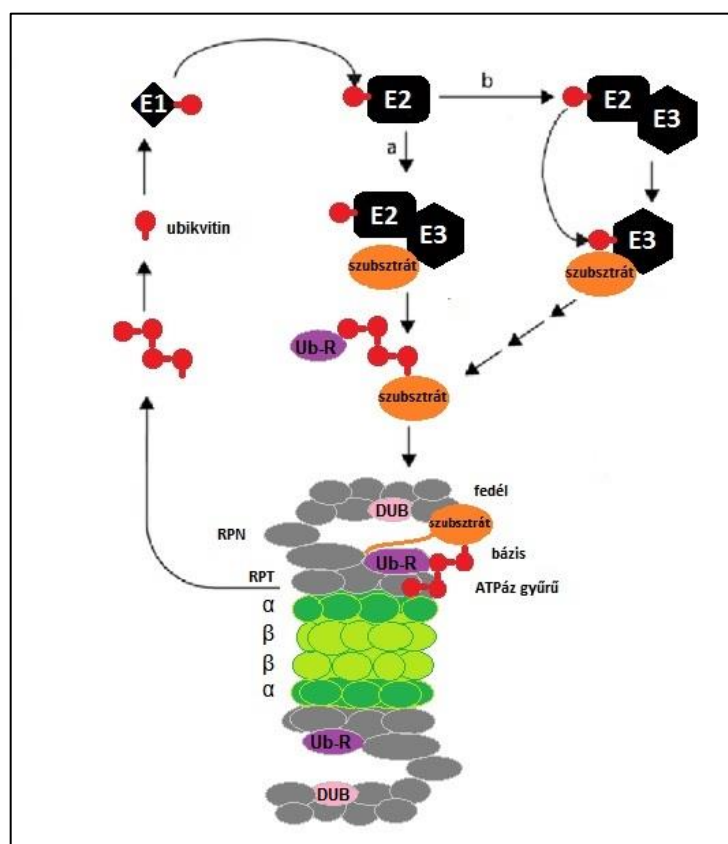
Az E4 U-box doménnel rendelkező ubikvitin lánc elongációs faktorok az E3 enzimek egy újonnan felfedezett részhalmazát képező enzimes családja, melyek a megfelelő poliubikvitin lánc összeszerelésében játszhatnak szerepet [7, 11].

A szubsztrátokon kialakuló ubikvitin jel sokféle lehet. Egyetlen ubikvitin molekula is szolgálhat jelként. A monoubikvitináció szerepet játszik többek között a celluláris lokalizációban, az endocitózisban, a lizoszómális degradációban, a hiszton regulációban, a DNS hibajavításban és a nukleáris exportban is [8, 12]. Többszörös monoubikvitináció is megfigyelhető, ennek során több lizin is monoubikvitinálódik, melynek a receptor internalizációban és az endocitózisban van szerepe [8]. A poliubikvitin láncok is eltérőek, attól függően, hogy folytonos vagy elágazó láncok, illetve hogy melyik lizinen keresztül kapcsolódnak egymáshoz [7, 8]. A láncok a hét belső lizin aminosav egyike és a következő ubikvitin C-terminális glicin aminosava között kialakuló kölcsönhatás eredményeként jönnek létre [11]. A K48-kapcsolt poliubikvitin láncok például a proteaszómális degradáció szignáljai [7, 13], a K63-kapcsolt lineáris poliubikvitin láncok pedig nem-proteolitikus funkciókban játszanak szerepet, mint például a szignál transzdukció és a DNS hibajavítás [7, 14]. A poliubikvitin láncot poliubikvitin receptorok ismerik fel. Ezt követően megkötik a jelölt fehérjét, majd eljuttatják azt a 26S proteaszómához, a lebontás helyszínére.

1.1.2. 26S proteaszóma

A 26S proteaszóma egy bonyolult molekuláris gépezet, amely az ubikvitinnel konjugált fehérjék lebontásáért felelős. Nevét a centrifugális rétegződésére jellemző értékről kapta (az „S” a Svedberg rövidítése). A citoplazmában és a sejtmagban is megtalálható. Szokatlanul nagy sejtalkotó 2,5 MDa-os tömegével. Kétféle alkompexumból szerelődik össze, a központi és a regulátor partikulumokból. A központi partikulum (core/catalytic particle – CP) 700 kDa tömegű és 20S proteaszómának is szokták nevezni. A regulátor partikulum vagy komplex (regulatory complex – RC) 900 kDa tömegű és 19S regulátor komplexnek is nevezik [15]. Attól függően, hogy a 20S proteaszómához egy vagy két 19S regulátor komplex kapcsolódik,

lehet egyszeresen (RC-CP) vagy kétszeresen (RP-CP-RP) „sapkázott”. A két konformációs forma csupán elektroforetikus mobilitásában tér el, biológiai aktivitásuk azonos [10, 16].



- 1. ábra** Az ubiquitin-proteaszóma rendszer komponensei. (E1 - ubiquitin-aktiváló, E2 - ubiquitin-konjugáló enzim, E3 - ubiquitin-ligáz, Ub-R - ubiquitin-receptor, DUB - dezubikvitináz, RPN - Regulatory Particle non-ATPase subunits, RPT - Regulatory Particle of triple-ATPase subunits)

A 20S proteaszóma (CP) egy hengerszerű struktúra, melyet négy gyűrű épít fel. A gyűrűket 7 α -, illetve 7 β -alegység alkotja, összesen 14 α - és 14 β -alegységből szerelődik össze. A két α -gyűrű a komplex végeit határolja, a két β -gyűrű pedig internálisan helyezkedik el (1. ábra). A struktúra belsejében három nanokompartment található, melyet keskeny csatorna köt össze. A β -gyűrűk alkotta központi kamra felelős a lebontásért, ugyanis a β 1, β 2 és β 5 alegységek peptidáz aktivitással rendelkeznek. Az α -alegységek alkotta előkamrák szerepe még nem ismert [10, 12, 17].

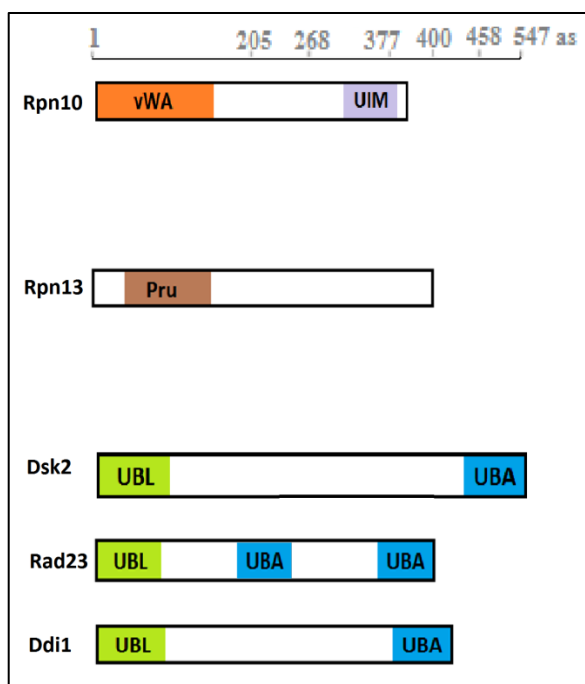
A 19S regulátor komplex a legáltalánosabb 20S proteaszómához kapcsolódó regulátor komplexum. A 19S regulátor partikulumok (RC) egy ATP-függő folyamat során kapcsolódnak a 20S partikulum alapjához. 17-18 különböző összetételű és aktivitású alegysége két alkompexet alkot, a bázist és a fedelet (1. ábra). Ezek ismerik fel és kötik meg a poliubikvitinált szubsztrátokat közvetlen vagy közvetett módon, így adják a proteaszóma

specifitását. Anti-chaperon aktivitásuk révén képesek letekerni a fehérjéket, majd továbbítják őket a 20S katalitikus centrumba [12, 17]. Működése energiaigényes, Rpt alegységei (Regulatory Particle of triple-ATPase subunits) ATPáz doménnel rendelkeznek. További alegységei az Rpn alegységek (Regulatory Particle non-ATPase subunits), melyek ATPáz doménnel nem rendelkeznek. Ezek vázfehérjék illetve a proteaszóma saját poliubikvitin receptor alegységei [9] (1. ábra). A fedél legalább kilenc Rpn alegységből áll és legfontosabb feladata a lebontandó szubsztrátok dezubikvitinálása [18]. A bázis négy Rpn alegységből és hat Rpt alkotta heterohexamer gyűrűből áll. Az ATPázok alkotta gyűrű létesít kapcsolatot a 20S proteaszóma α -gyűrűinek kötőzsebeivel, szerepe van a dezubikvitinált szubsztrátok letekerésében, az α -gyűrű kapuzásában, reverz chaperon aktivitással rendelkezik és segíti a 26S proteaszóma ATP-függő összeszerelődését is. Bármelyik Rpt alegység deléciója ezen folyamatok végbemenetelét akadályozza és a 26S proteaszóma inaktiválódásához vezet [2]. Az Rpn alegységek közül nagy molekulásúlyú vázfehérje az Rpn1/p97 (élesztő/Drosophila) és a Rpn2/p110, melyek kapcsolatot létesítenek a bázis ATPáz gyűrűje és a fedél között, stabilizálják a 19S regulátor komplexumot és dokkolási felszínt biztosítanak további alegységek és proteaszómával kölcsönható fehérjék számára. Ezek közül legfontosabbak a szubsztrátokat szállító poliubikvitin receptorok és a dezubikvitináz enzimek. A kisebb molekulásúlyú Rpn10/p54 és az Rpn13/p42E alegységek a proteaszóma saját poliubikvitin receptorai [9].

1.1.3. Poliubikvitin receptorok

A poliubikvitin receptorok olyan fehérjék, amelyek ubikvitin-kötő doménjük (Ubiquitin-Binding Domains – UBD) révén képesek felismerni, megkötni és a 26S proteaszómához szállítani az ubikvitinációs enzimkaskád által poliubikvitinált fehérjéket. Az ubikvitin-kötő doméneknek hét osztályát ismerjük: UIM, UBA, CUE, MIU, GAT, UBM és UBZ [19].

A proteaszómával létesített kapcsolatuk alapján két csoportra oszthatjuk a poliubikvitin receptorokat. Képezhetik alegységét a proteaszómának, mint az Rpn10/p54 és Rpn13/p42E [2], vagy lehetnek a proteaszómától független ingázó faktorok, mint a Rad23, Dsk2 és Ddi1 [20]. Az első felfedezett poliubikvitin receptor a humán 26S proteaszóma alegységét képező S5a volt, azonban strukturális felépítésükkel és működésükkel kapcsolatos ismereteink főként élesztőkön végzett kísérletekből származnak [9].



2. **ábra** A poliubikvitin receptorok sematikus ábrázolása. (vWA - von Willebrand-A, UIM – Ubiquitin interacting motif, Pru - Pleckstrin-like receptor for ubiquitin, UBL - Ubiquitin-like, UBA - Ubiquitin-associated domének)

Az Rpn10/S5a/p54 (élesztő/humán/Drosophila) két funkcionálisan és szerkezetileg is különböző evolúciósan konzervált domént tartalmaz. N-terminális végén a von Willebrand-A (vWA) domén [21], a C-terminális felén az ubikvitin-interakciós motívum (UIM) található (2. ábra). Az Rpn10 egy, az S5a kettő, a p54 három ubikvitin-interakciós motívumot tartalmaz. A vWA doménnel kapcsolódik a proteaszóma regulátor komplexének bázisához és részt vesz a bázis és fedél közti stabil kapcsolat elősegítésében [22]. Az UIM motívum az ubikvitin kötésért felelős [22]. Az Rpn10/S5a/p54 fehérjék C-terminálisainak hossza nagyon változó, ahol mono- és poliubikvitinációra is alkalmas konzervált lizin aminosavak vannak. Szerepük feltételezhetően az S5a/p54 alegység extra-proteaszómális feladatainak ellátása [23,24]. Az UIM-ok és a konzervált lizinek száma fajoként változó [9].

Az Rpn13/ADRM1/p42E egy nemrégiben felfedezett poliubikvitin receptor, mely szintén a 26S proteaszóma alegysége [25]. Pleckstrin-szerű ubikvitin receptornak (pleckstrin-like receptor for ubiquitin – Pru) nevezik az N-terminális végükön elhelyezkedő ubikvitin kötésért felelős pleckstrin homológ domén miatt [2] (2. ábra). C-terminálisa egy dezubikvitinázal, az Uch37-tel létesít kapcsolatot [9].

A Rad23, a Dsk2 és Ddi1 poliubikvitin receptorok az UBA/UBL fehérjék családjába tartoznak. Nagyfokú szerkezeti és funkcionális hasonlóság jellemző rájuk. Két domént tartalmaznak: az N-terminálisukon elhelyezkedő ubikvitin-szerű (Ubiquitin-Like - UBL) és a

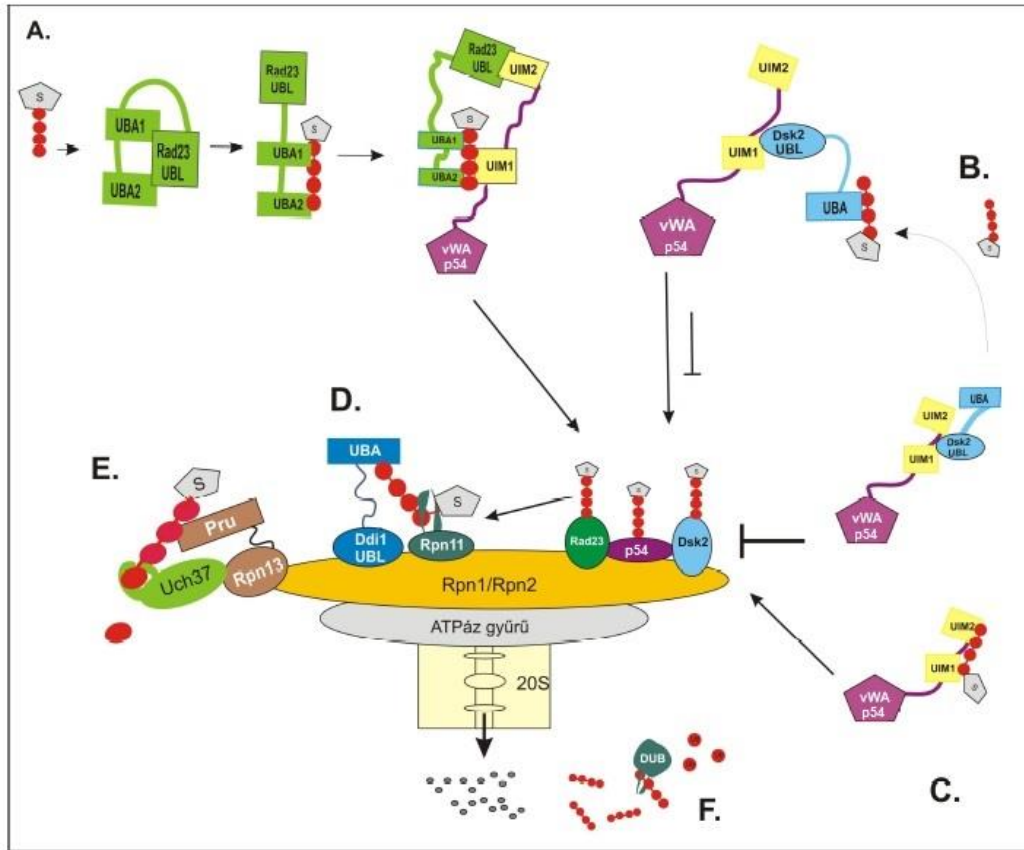
C-terminálisukon található ubikvitinnel asszociálódó (Ubiquitin-Associated - UBA) domént (2. ábra). Az UBA domén nagy affinitással képes kötödni az ubikvitinhez vagy ubikvitin-szerű domént tartalmazó fehérjékhez, az UBL domén pedig a fehérjét a 26S proteasóma regulátor komplexéhez köti [26, 27]. A Rad23, Dsk2 és Ddi1 az élesztősejtek proteasómától független, ingázó poliubikvitin receptorai. Eredetileg más biokémiai folyamatokban betöltött szerepük révén azonosították őket [28, 29, 30].

1.1.4. *Drosophila* poliubikvitin receptorok

A poliubikvitin receptorok nagyfokú evolúciós konzerváltságot mutatnak, ortológjaik *Drosophila melanogaster*-ben is megtalálhatóak. A p54 proteasóma alegység mennyisége az embriókort követően hirtelen és drasztikusan lecsökken. Koncentrációja egészen a kései, vándorló lárva stádiumig alacsony marad, aztán kezd lassan emelkedni és a báb stádiumra visszaáll az embriókorban megfigyelt szintre, amit aztán adult állapotban is megtart. A p54 koncentrációjának változása ellenére a 19S regulátor komplex és a 20S proteasóma vizsgált alegységeinek relatív mennyisége állandó marad. A lárvákban aktiválódik egy a proteasómához kötött és szabad p54-et egyaránt elimináló mechanizmus, melynek erőssége a lárva stádiumokban eltérő [9, 31].

A késői embriókban és a korai lárvákban a p54-en kívül a Rad23 és Dsk2 ingázó poliubikvitin receptorok mennyisége is hirtelen lecsökken és alacsony marad egészen a korai harmadik stádiumos lárvakorig. A poliubikvitinált fehérjeszubsztrátok mégsem halmozódnak fel, ugyanis a lárva stádiumokban számos rendkívül ellenálló, kompakt szerkezetű, lárva specifikus proteáz aktiválódik, amelyek eltávolítják az irreverzibilisen denaturált fehérjét és a poliubikvitin receptorokat. A p54, Rad23 és Dsk2 mRNS szintje nem változik az egymást követő lárva stádiumokban, vagyis koncentrációjuk csökkenése nem transzkripcionálisan, hanem proteolitikusan szabályozott [9, 31].

A Rad23 és a Dsk2 kölcsönhatásba lép a p54-el. A p54 és Dsk2 közötti kölcsönhatás erősebb a p54 és Rad23 közöttinél. Az egyedfejlődés során a p54 és Dsk2 szintjének megváltozása felborítja az ubikvitin-proteasóma rendszer homeosztázisát. A p54 leválva a proteasómáról képes befolyásolni a különböző poliubikvitin receptorok szállította szubsztrátok proteasómához történő transzportját. Ubikvitin interakciós motívuma (UIM) segítségével felismeri, megköti a szubsztrátot szállító Dsk2 ubikvitin-szerű doménjét (UBL), és a 26S proteasóma 19S regulátor komplexumához szállítja, amint az rendelkezik szabad kapacitással [9, 31].



3. ábra A poliubikvitin receptorok működési modellje a humán-, élesztő- és muslica irodalom alapján [9].

A Rad23 receptor UBL-UBA doménjei inaktív állapotban kölcsönhatnak egymással, de ha szubsztráttal találkoznak UBA doménjei megkötik a poliubikvitin láncot, így aktiválódik a Rad23 és az UBL domén kapcsolódik az extraproteasómális p54 UIM2-höz, amely aztán a proteasóma Rpn1/Rpn2 komplexéhez szállítja (3. ábra A). Az extraproteasómális p54 UIM1 motívumával az üres Dsk2 UBL doménjét köti meg, akadályozva a felesleges proteasómához dokkolást. Ha a Dsk2 szubsztrátot köt a p54 tovább gátolja vagy a proteasómához szállítja a Dsk2-szubsztrát komplexet a prioritási sorrendnek megfelelően (3. ábra B). Az p54 UIM motívumával képes szubsztrátot is kötni (3. ábra C). A Ddi1 UBL doménje dokkol az Rpn1/2 komplexhez, UBA doménjével pedig hozza a lebontásra ítélt fehérjét, melyről az Rpn11/p37B metalloproteáz levágja a poliubikvitin láncot. Az Rpn13/p42E Pru-doménje megkötí a poliubikvitinált fehérjét és közben az Rpn1/2 komplexhez, valamint az Uch37 dezubikvitinázhoz is kapcsolódik. Az Uch37/p37A lehasítja a poliubikvitin láncot, majd a szubsztrát lebomlik (4. ábra D). Ezt követően a szabad poliubikvitin láncokat monomerekké darabolják a dezubikvitináz (DUB) enzimek (3. ábra F) [9].

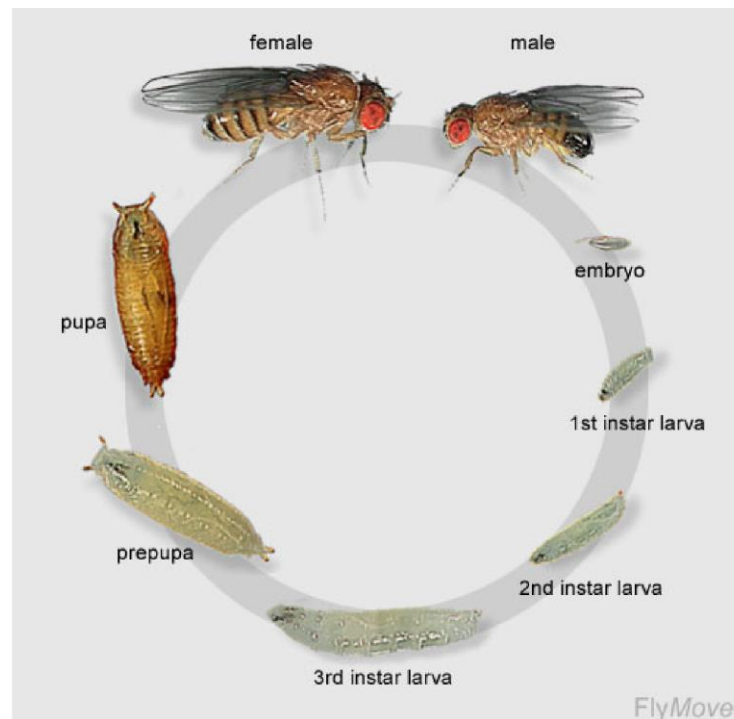
Drosophilában a p42E proteaszóma alegység nem köti a poliubikvitinált fehérjéket. A Ddi1 nagyon kis affinitással köt poliubikvitinált fehérjéket és nem dokkol a 26S proteaszómához [9, 31]. Az eddigi kutatások szerint a p54, a Dsk2 és a Ddi1 receptor funkciójának kiesése letális. Mindhárom receptor hiánya báb stádiumban okozza az állatok pusztulását, a Dsk2 farát adult stádiumban. A Rad 23 és a p42E receptornál nem figyeltek meg letalitást [9, 31, 32]. Ezért több eddig még ismeretlen poliubikvitin receptor létezését feltételezzük, melyek képesek átvenni az előzőek funkcióját.

1.1.5. Az ubikvitin-proteaszóma rendszer jelentőségének összefoglalása

Eukarióta élőlényekben az ubikvitin-proteaszóma rendszer (Ubiquitin-Proteasome System – UPS) a legnagyobb citoszolikus proteolitikus rendszer. A rendszerben résztvevő gének száma igen eltérő. Elengedhetetlen szerepet tölt be többek között a sejtciklus szabályozásában, a transzkripcióban, a jelátvitelben, az apoptózisban, a gyulladásos folyamatokban, a fehérjeminőség szabályozásban [1, 11]. A sejteknek nincs olyan része, mely elérhetetlen lenne az ubikvitin-proteaszóma szabályozó rendszer számára. A fehérjeszintek a sejtmagban, a citoplazmában, az ER lumenben, valamint a membránfehérjék mind az ubikvitinációs enzimek és a proteaszóma ellenőrzése alatt állnak. A meghibásodott és rövid féléletidejű nukleáris és citoplazmatikus fehérjék 80-90%-a az UPS-ben kerül lebontásra [1].

1.2. Az ecetmuslica modell

Az ecetmuslica, a kétszárnyúak (Diptera) rendjébe tartozó teljes átalakulással fejlődő rovar. Egyszerű tenyésztetőségük és fenntarthatóságuk miatt ideális modell állat a genetikai kísérletekhez. Generációs idejük rövid, 25°C-on csupán 10 nap. Irányított keresztezések könnyen végezhetőek velük és több száz utódjuk van szülőpáronként. A *Drosophila* nőstények a párzást követően a hímivarsejteket elraktározzák, és több napig használják petéik megtermékenyítésére. A megtermékenyített petében az ecetmuslica embrionális fejlődése 24 óra alatt játszódik le. A petéből kikelő lárvák három fejlődési stádiumon (L1-L2-L3) mennek keresztül, mielőtt bebábozódnak. A bábból öt nap múlva kelnek ki a kifejlett adultok. Közben keresztülmennek számos morfológiailag jól elkülöníthető stádiumon [33] (4. ábra).



4. ábra *Drosophila melanogaster* fejlődési ciklusa. (fejlődési ciklus kép: <http://drosi.wordpress.com/drosophila-melanogaster/>)

Az irányított keresztezések kivitelezéséhez elengedhetetlen a nőstények és hímek időben történő elkülönítése. A nőstény és hím *Drosophila* egymástól könnyen megkülönböztethető. A genitáliáik közti különbség a legszembetűnőbb, de ezen kívül a hímek potrohának utolsó két lemeze (tergit) teljesen fekete, míg a nőstényeké az azt megelőzőekhez hasonló mintázatú, és a hímek első pár lábain kitin fogacskákból álló úgynevezett szexfésű is található [32] (5. ábra).



5. **ábra** *Drosophila melanogaster* nőstény és hím közötti jellegbeli eltérések. A hím szexfésűjét és pigmentált ivarszervét nyilak jelölik. (<http://www.stonybrook.edu/commcms/biology/current/advising.html>)

Az ecetmuslica citológiai vizsgálatokra is nagyon jól használható. Négy kromoszómája van: egy nemi és három testi. Lárvális szövetei - például a nyálmirigy – politén óriás kromoszómákat tartalmaznak [34].

A *Drosophila* teljes genomszekvenciája ismert és rendelkezésre áll. A teljes genom mérete 180×10^6 bp, amely 13600 gént tartalmaz, melyek közül mintegy 5000 létfontosságú [35]. A muslica gének 50%-ának van humán ortológja és az emberi betegségekben azonosított gének 75%-ának van *Drosophila* homológja.

A mutáns muslicák klasszikus genetikai analízise viszonylag könnyen elvégezhető, fenotípusuk vizsgálható, genetikai térképük részletes. Rengeteg marker-mutáció és speciális – balanszer és deléciós – kromoszóma létezik a hatékony vizsgálatokhoz. Több tízezer mutáns muslica törzs ismert [34, 36].

A poliubikvitin receptorok nagyfokú evolúciós konzerváltságot mutatnak, ortológjaik *Drosophila melanogaster*ben is megtalálhatóak. *Saccharomices cerevisiae*ben három olyan fehérje ismert, amely poliubikvitin kötésre képes és kapcsolódik a proteaszómához is. Ecetmuslicában mindhárom génnek van ortológja: a *Rad23* génnek a *CG1836*, a *Ddi1*-nek a *CG4420* és a *Dsk2*-nek a *CG14224*. Az ecetmuslica teljes genomszekvenciájának ismertségét és elérhetőségét felhasználva bioinformatikai módszerekkel további lehetséges poliubikvitin receptorok után kutattunk. A *Dsk2* gén aminosav szekvenciájával nagyfokú hasonlóságot mutat a *CG31528* gén feltételezett termékének aminosav szekvenciája. Domén-szerkezete alapján poliubikvitin receptornak tűnik. A gén alaposabb funkcionális vizsgálatát tűztük ki célul ennek bizonyítására. A vizsgálatokhoz transzgenikus RNS-interferencia vonalakat állított elő csoportunk, ezek genetikai és funkcionális jellemzésébe kapcsolódtam be. A

CG31528 fehérje poliubikvitinált fehérjéket kötő és proteaszómához való kötődésének képességét kívánjuk meghatározni Glutathione-Sepharose gélszűrési kísérletekben. Ehhez GST fúziós konstrukciót állított elő laborunk a CG31528 cDNS-sel.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Célul tűztük ki a CG31528 feltételezett poliubikvitin receptort kódoló génnek a jellemzését, funkciójának vizsgálatát különböző klasszikus genetikai, molekuláris biológiai és biokémiai módszerek felhasználásával. A géntermék funkcióját a génre előállított RNS-interferencia vonalak felhasználásával és a GST fúziós konstrukció alkalmazásával tervezzük megvizsgálni. A következő kísérletek elvégzésével kívánjuk alátámasztani, hogy valóban egy új poliubikvitin receptort sikerült felfedeznünk:

1. Az RNSi törzsekben a RNS-interferencia indukciója.
2. Az RNS-interferencia hatékonyságának kimutatása RT-PCR kísérletekkel.
3. A kiváltott fenotípus vizsgálata, letálfázis meghatározás.
4. A GST fúziós CG31528 cDNS-t tartalmazó expressziós konstrukció transzformálása *E. coli* baktériumba, a fúziós fehérje termeltetése.
5. Az expresszió ellenőrzése poliakrilamid gélelektroforézissel, a termeltetés és sejtfeltárás optimalizálása.
6. Immunoblot GST-elleni ellenanyaggal, annak ellenőrzésére, hogy valóban a kívánt fehérjét sikerült-e expresszáltatnunk.
7. A termelt fúziós CG31528-GST fehérje tisztítása Glutathione-gyönggyel, tisztítási körülmények optimalizálása.
8. A tisztított fehérje és *Drosophila* embrió és adult fehérje homogenizátumban lévő poliubikvitinált fehérjék közötti kölcsönhatás vizsgálata Western-blot kísérlettel ubikvitin-elleni ellenanyagot használva.
9. A tisztított fehérje és *Drosophila* adult fehérje homogenizátumban lévő proteaszóma alegységek közötti kölcsönhatás vizsgálata immunoblottal proteaszóma-elleni ellenanyag keveréket használva.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Alkalmazott *Drosophila melanogaster* törzsek

Felhasznált törzseinket és keresztezéseinket standard *Drosophila* kukoricadara-élesztő táptalajon, 25°C-on tartjuk. A használt genetikai markerek leírása a Flybase-en (<http://flybase.bio.indiana.edu/>) és a D.L. Lindsley, G.G. Zimm - The genome of *Drosophila melanogaster* 1992 könyvben megtalálható.

A Bloomingtoni törzsközpontból szereztük be a balanszer és driver törzseket, kivéve az If/CyO;tub-GAL4/TM6B és Tft/CyO;Bam-GAL4 törzseket, melyek Helen White-Coopertól származnak (http://www.cardiff.ac.uk/biosi/contactsandpeople/stafflist/u-z/white-cooper-helen-dr-overview_new.html). Az $Ub-R^{R11/1}$, $Ub-R^{R17/2}/CyO$, $Ub-R^{R12/2}$ és $Ub-R^{KK}$ transzgenikus RNS-interferencia vonalak teszik lehetővé a CG31528 gén csendesítését. Az $Ub-R^{KK}$ a bécsi RNSi törzsközpontból származik (VDRC), a többi csoportunk állította elő.

Az $Ub-R^{R17/2}/CyO$ törzs CyO balanszerét CyO,GFP -re cseréltem, az $Ub-R^{R11/1}$, $Ub-R^{R12/2}$ és $Ub-R^{KK}$ törzsek homozigóta életképesek.

A transzgenikus RNS-interferencia vonalak a CG31528 gén 530 bp-os exonját pWIZ *Drosophila* transzformációs vektorban két példányban, egymáshoz képest fordított irányban ismétlődve hordozzák [37]. A pWIZ vektor pUAST módosított változata, így a célgén GAL4-érzékeny expresszióját teszi lehetővé. A szekvencia öt tandem elhelyezkedő optimalizált UAS GAL4 kötőhely és egy SV40 transzkripcionális terminátor között található a vektorban. A GAL4 *Drosophilában* is működő élesztő transzkripció faktor, melyhez számos, különböző szövet- vagy sejt-specifikus transzkripció aktivátor áll rendelkezésre. A GAL4-UAS rendszer lehetővé teszi duplaszálú RNS szövet-specifikus expresszióját, amely RNS-interferenciát indukál a sejtekben.

A transzgenikus RNS-interferencia vonalakat $Actin5C-GAL4/CyO,GFP$ törzshöz kereszteztem, amely az $Actin5C-GAL4$ mesterséges P elem konstrukciót hordozza. Az $Actin5C$ promoterről minden szövetben folyamatosan kifejeződik a GAL4 fehérje, így minden sejtben indukálódik a gén-specifikus RNS-interferencia.

Erősebb csendesítést próbáltam elérni azzal, hogy az RNS-interferencia vonalakat $Actin5C-GAL4$; $UAS-Dicer2$ törzshöz is bekeresztettem. A Dicer enzim a kettős szálú dsRNS-eket 21-25 nukleotid hosszúságú darabokra hasítja az eukarióta szervezetek mintegy védelmi mechanizmusaként. A Dicer2 egy 200kD méretű fehérje, amelynek amino-terminális végén DExH helikáz domén, karboxi-terminális végén két tandem RNáz III katalitikus domén és egy dsRNS kötő domén található. A dsRNS-ekből RNáz III aktivitásának köszönhetően

készít siRNS-eket (a Dicer2 enzimátikus preferenciát mutat az siRNS-ek készítésére a miRNS-ek készítésével szemben). A helikáz aktivitás valószínűleg az enzim mozgásához szükséges a szubsztát hasítás közben. A rövid RNS darabok fehérjékhez kötődnek és silencing komplexet alkotnak - RISC (RNA-induced silencing complex), ami minden olyan RNS-t feldarabol, amely komplementer a komplex kis RNS alkotójával. Az siRNS-ek és miRNS-ek mRNS hasítást, transzláció gátlást, kromatin szerkezet változást vagy RNS lebomlás fokozódást okoznak, így csökkentik a gén kifejeződését [39, 40].

Mivel a *CG31528* gén expressziója a tesztiszben a legerőteljesebb az RNSi vonalakat tesztisz-specifikus driver törzsekhez – If/CyO; tub-GAL4/TM6B, nanos-GAL4, Tft/CyO;Bam-GAL4 – is bekeresztettem a hím utódok fertilitásának vizsgálata céljából.

3.2. Letálfázis meghatározás

A megfelelő genotípusú állatokat nemenként elkülönítve egy napig élesztővel gazdagon kiegészített standard táptalajon tartottam, majd 40 szűz nőtényt és 30 hímeket kereszteztem. Az állatokat a keresztezés után egy nappal petéztetőcsőbe raktam szinkronpetéztetéshez és a petéztető lemezeket 12 óránként cseréltem. A petéztető lemez 1,6% lakto-agart, 0,8% glükózt, 0,15% nipagint és aktív szenet tartalmaz. A különböző genotípusú lárvákat a balanszer kromoszómájukon hordozott Tubby és GFP markerek alapján különítettem el az első vedlés után és külön fiolákba helyeztem őket. A kikelő adultokat megszámláltam, a korábban elpusztult állatok elért fejlődési stádiumát pedig Bainbridge és Bownes [41] leírása alapján határoztam meg.

3.3. RNS izolálás

Tri Reagent extrakciós kittel (Sigma) izoláltam RNS-t 10 db farát adult bábból a gyártó utasítása szerint. 500 µl Tri reagensben elhomogenizáltam az állatokat, majd centrifugáltam 13000 rpm-mel, 4°C-on 10 percig. Ez a lépés a széthomogenizálhatatlan kitin kutikula eltávolítását szolgálja. A felülúszót tiszta Eppendorf csőbe pipetázás után állni hagytam 5 percig szobahőn. 100 µl kloroformot adtam hozzá és erősen rázogattam 15 másodpercig, majd inkubáltam szobahőn 15 percig. Ismét centrifugáltam 13000 rpm-mel 4°C-on 15 percig, majd a leszívott felülúszóhoz hozzáadtam 250 µl izopropanolt. Az RNS kicsapásához összeráztam és állni hagytam 10 percig szobahőn. Majd az RNS-t centrifugálással ülepítettem ki, 13000 rpm-en 4°C-on 10 percig. A kicsapódott RNS-t mostam 500 µl 75%-os RNáz mentes alkohollal. Újabb centrifugálás után szobahőn szárítottam az RNS-t, majd 15 µl RNáz mentes

vízben szuszpendáltam fel és 0,8 µl RNasecure (25x) reagent-et (Ambion) adtam hozzá. 65°C-os 15 percig tartó inkubációval segítettam végül az oldódást.

Ezt követően a mintákat DNáz kezeltem, a 16 µl-es mintákhoz 2 µl 10x DNase I puffert és 2 µl 10x DNase I (1U/µl) (Fermentas) enzimet adtam, majd 30 percre 37°C-os vízfürdőbe tettem. A DNáz inaktiválásához 4 µl 25 mM EDTA-t mértem a mintákba és 65°C-ra tettem őket 10 percre.

Koncentrációméréssel meghatároztam a minták RNS mennyiségét, majd agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem. 0,8-os agaróz gél és az egyes mintákból 500 ng-nyi RNS-t használtam. Ha *Drosophila* esetében 2 kb környékén egy éles sávot látunk, intakt RNS-re utal. Ez a 16S rRNS és a 2 kb-os fragmentekre szétesett két 4 kb-os 23S rRNS.

3.4. Reverz transzkripció

cDNS-t szintetizáltam M-MuLV reverz transzkriptázt (Fermentas, Vilnius, Litvánia), random hexanukleotid primereket (Fermentas, Vilnius, Litvánia), templátként pedig 5 µg totál RNS-t használva. 11 µl össztérfogatú RNáz mentes vizet, random hexamer primert és RNS-t 70°C-on 5 percig inkubáltam. 4 µl 5x reakció puffert, 1 µl RNáz inhibitort és 2 µl (10 mM) dNTP-t, majd 1 µl (200 U/ µl) reverz transzkriptázt adtam hozzá. Ezt követően 5 percig 25°C-on, majd 1 órát 42°C-on inkubáltam. A reakció leállítása 10 percig tartó 70°C-os inkubálással, a kiindulási RNS eltávolítása 0,5 µl 1 µg/µl RNáz hozzáadásával és 30 percig tartó 37°C-os inkubációval történt. A kész cDNS-eket -20°C-on tároljuk.

3.5. Szemikvantitatív reverz transzkripció-kapcsolt PCR (RT-PCR)

A rendelkezésemre álló transzgénikus RNSi vonalak géncsendesítésének működéséről nem telítési körülmények között végzett RT-PCR reakció segítségével győződtem meg. Az ilyen körülmények között képződő termék mennyisége a templát reakcióba vitt mennyiségétől függ, vagyis a PCR reakció termékből következtethetünk a bevitt templát mennyiségre.

20 ciklusos PCR reakciót hajtottam végre a farát adult bábokból izolált RNS-ről szintetizált cDNS-eket használva templátként. A PCR reakciókat Taq polimerázzal (Fermentas, Vilnius, Litvánia) végeztem standard körülmények között (2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP és 0,2 mM primer). Az egy-egy PCR reakcióba bemért templát mennyiségeket a *Drosophila melanogaster* L17 riboszómális fehérjét kódoló génre (CG3203, FBgn0029897) tervezett *rpL17A* primerek (*rpL17A* upper, 5'-GTG ATG AAC TGT GCC GAC AA-3'; *rpL17A* lower, 5'-CCT TCA TTT CGC CCT TGT TG-3') felhasználásával végzett PCR reakcióval kalibráltam. A laborunk már korábban előállított a CG31528 génre tervezett

specifikus primereket, így ezek a rendelkezéseimre álltak. Ub-R upper primer (101-121): ATT CTA GAG GAT GAG CAC CAA AGA. Ub-R lower primer (631-612): ATT CTA GAT GCG TGA TAT GTG GAG GTC. Az RT-PCR termékek vizsgálatát agaróz gélelektroforézissel történő szétválasztás után végeztem.

3.6. Agaróz gélelektroforézis

Az RNS minták ellenőrzéséhez 0,8%-os, a cDNS mintákéhoz 1,2%-os agaróz gél-t használtam. Az agarózt TBE pufferben oldottam fel és etídium-bromid hozzáadása után töltöttem futtatókádba. A fésűt korábban belehelyeztem a zsebek kialakításához. 20-25 percig hagytam szilárdulni, majd felvittem a mintákat és a molekulasúly markert.

3.7. Baktérium transzformálás és plazmid izolálás

Kompetens DH5 α és BL21 *E. coli* sejtekbe transzformáltam a CG31528 gént hordozó pGEX-4T-1 plazmidot (eleinte a DH5 α törzset használtam, majd megállapítottam, hogy a BL21 a fehérjetermelésben hatékonyabbnak bizonyul). A transzformált baktériumokat ampicillin tartalmú lemezre szélesztettem és O/N növesztettem 37°-on.

A plazmid izoláláshoz a baktériumokat ampicillin tartalmú tápfolyadékba oltottam le és O/N növesztettem 37°C-on. 1,5 ml kultúrát Eppendorf csőbe töltöttem, lefugáltam, a felülúszót leöntöttem, majd ezt megismételtem. A kiülepedett *E. coli* sejteket 100 μ l Lízis puffer I. oldatban (50 mM Glükóz, 25mM TRIS.CL pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) szuszpendáltam fel. Hozzáadtam 200 μ l Lízis puffer II. oldatot (0.2N NaOH, 1% SDS) és felfordítgatással jól összekevertem. Ezt követően rámértem 150 μ l jéghideg Lízis puffer III. oldatot (60 ml 5M KAc, 11.5 ml jégcet, 28.5 ml víz) és vortexeltem, majd 5 percig inkubáltam jégen. A mintákat 15 percig centrifugáltam 15000 rpm-en, a felülúszót új csövekbe pipettáztam és két térfogat etanolt adtam hozzá. A mintákat ismét 15 percig centrifugáltam, majd eltávolítottam a felülúszót és a csapadékot 500 ml 70%-os alkohollal mostam. Az alkohol eltávolítása után a csapadékot megszárítottam, majd a DNS-t 50 ml RNázos TE-ben (20 mg/ml RNase, pH 8.0) oldottam fel 65°C-on 15 percnyi inkubálással.

3.8. Fehérjetermeltetés és –izolálás

A rekombináns fehérje termeltetéshez starter kultúrát készítettem, melyet O/N növesztettem 37°C-on rázatva, majd a következő reggel 0,2 OD-re hígítottam és 0,4-0,7 OD-ig növesztettem, szintén 37°C-on rázatva. YTB-t használtam a növesztéshez, amely 100 μ g/ml ampicillint tartalmazott. A megfelelő OD érték elérése után a kultúrákat 0,2-0,5 mM

IPTG-vel indukáltam, majd növesztettem 2-10 órán keresztül 22°-on rázatva. (Az IPTG mennyiségének valamit az indukciós időnek nem volt hatása a fehérjetermelés intenzitására.)

A feltáráshoz az indukált kultúrákat jégre raktam 10 percre, miközben időnként kevergettem, majd előhűtött falcon centrifuga csövekbe töltve 6000 rpm-en centrifugáltam 8 percet 4°C-on. A tápoldat eltávolítása érdekében a csapadékot 10 ml hideg PBS-ben felfuszpendáltam és újra centrifugáltam. Ezt a lépést újra megismételtem, majd a kiindulási kultúra mennyiségétől függően 6-8 ml PBS-ben vettem fel a kiülepedett *E. coli* sejteket. Üvegcsőben 5-8 percig (20s-20s) szonikáltam (Branson Sonifier 250 típusú szonikáló berendezéssel) 20%-on. Ezt követően jégre tettem a mintákat, majd centrifugáltam 10 percet 15000 rpm-en. A felülúszót leszívtam, a csapadékot pedig ugyanannyi PBS-ben vettem fel, amennyit a felülúszó tartalmaz.

3.9. SDS-PAGE és Western-blot

A vertikális gélelektroforézishez 5%-os tömörítő és 8%-os szeparáló gélét készítettem. A 8 ml 8%-os szeparáló gélhez 2,72 ml H₂O-t; 3 ml 1M pH 8,8 Tris-HCl-t; 2,128 ml AA-t (30%); 80 µl SDS-t (10%); 68 µl APS-t (10%) és 7,2 µl TEMED-et mértem össze, amit gyorsan a két üveglap közé pipettáztam. Rámértem annyi i-propanolt, hogy éppen ellepje a gél tetejét. Megvártam, míg megszilárdul (kb. 35 perc), majd mosó pufferrel mostam, a maradék puffert pedig szűrőpapírral leitattam. 3 ml 5%-os tömörítő gélhez 2,06 ml H₂O-t; 0,375 ml 1M pH 6,8 Tris-HCl-t; 0,5 ml AA-t (30%); 30 µl SDS-t (10%); 30 µl APS-t (10%) és 5 µl TEMED-et mértem össze, gyorsan rápipettáztam a szeparáló gélre és belehelyeztem a zsebeket kialakító fésűt. Kb. 20 perces polimerizáció után a fésűt óvatosan kivettem.

A mintákat 4x Sample Buffer (40% glycerol, 4% lithium dodecyl sulfate (LDS), 4% Ficoll-400, 0,8 M triethanolamine-Cl pH 7,6, 0,025% phenol red, 0,025% Coomassie G250, 2mM EDTA disodium) hozzáadása után 4 percig forraltam, majd jégre tettem a gélre történő felvitel előtt.

A futtató puffer 25 mM Tris-t, 192 mM glycine-t és 1% SDS-t tartalmaz. A mintákat Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder mellett futtattam 80 V-on, ameddig átfut a szeparáló gélbe, majd 120-130 V-on. A gélét ezt követően Coomassie festékkel (0.1% Coomassie Blue R250, 45% Metanol, 45% H₂O, 10% ecetsav) festettem, majd Destaining (45% Metanol, 45% H₂O, 10% ecetsav) oldattal mostam, vagy membránra blottoltam.

A fehérjéket a poliakrilamid gélből PVDF membránra blottoltam, ahol megmaradt a fehérjék gélbeli elrendeződése. 200 mA-en, 4°C-on, Gel Cooler-el is hűtve, 3-3,5 órán át végzem a blottolást.

A GST-vel fúzionált fehérjét ellenanyag segítségével mutattam ki. Ehhez először a membrán fehérjéit borjú szérum albuminnal (BSA) blokkoltam éjszakán át, majd TBST-ben (Tris-buffered saline + Tween20) feloldott tejporral egy órán keresztül, az ellenanyag aspecifikus kötődésének elkerülésére. A megfelelő epitópot tartalmazó fehérjék kimutatásához először az elsődleges, nyúlban termeltetett anti-GST és anti-ubikvitin ellenanyagot, valamint egérben termeltetett anti-proteaszóma ellenanyag keveréket használtam (3 ml-hez 100 µl anti-p54, 38 µl anti-12A1, 38 µl anti-50, 30 µl anti-123, 150 µl anti-CP). Az adott elsődleges ellenanyaggal (1/1000) szintén egy órát inkubáltam. Ezt követően 3x10 percig mostam a membránt 1xTBST-vel, majd rámértem a nyúl vagy egér ellen termeltetett másodlagos ellenanyagot (1/30.000), amely hozzákötődött az elsődleges ellenanyaghoz. A másodlagos ellenanyagban való egy óra inkubáció után ismét 1xTBST-vel mostam a membránt 3x10 percig. A másodlagos ellenanyaghoz egy torma peroxidáz van kapcsolva, mely hasítja a hozzáadott kemilumineszcens ágenst, ezáltal lumineszcenciát produkálva. A kibocsátott fényt fényérzékeny filmmel detektáltam.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1. A CG31528 gén azonosítása bioinformatikai módszerekkel

Három olyan poliubikvitin receptor ismert *Drosophila melanogaster*-ben, amely képes poliubikvitint kötni és a proteaszómához is kapcsolódik. Ezek a gének a következő élesztő gének ortológjai: a CG1836 a Rad23-nak, a CG4420 a Ddi1-nek és a CG14224 a Dsk2-nek. Mindhárom gén közös jellemzője az N-terminálisukon található ubikvitin-szerű (UBL) valamint a C-terminálisukon elhelyezkedő ubikvitinnel kölcsönható (UBA) domén, vagyis mindhárom gén terméke az UBA/UBL fehérjék családjába tartozik.

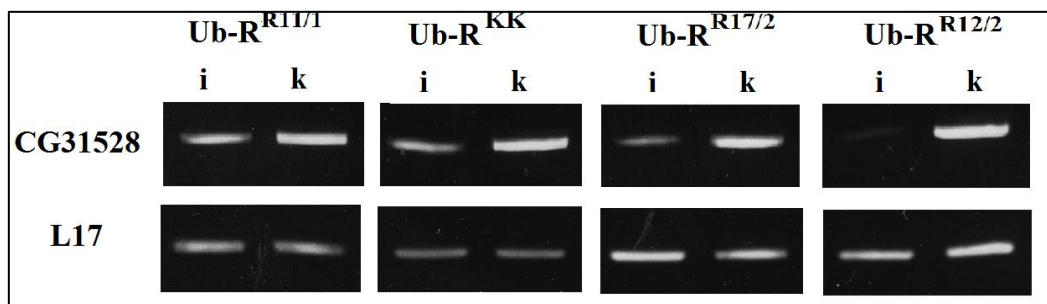
Feltételezhető további poliubikvitin receptorok létezése is, így az ismert receptorok aminosav szekvenciájával megszűrtük a *Drosophila* genomot. Vizsgálatainkhoz olyan programokat használtunk, amelyek aminosav szekvenciát hasonlítanak össze folyamatosan átfordított nukleotid szekvenciákkal minden olvasási keretben, majd a szekvenciák között statisztikailag szignifikáns hasonlóságot keresnek. Ezek a National Center for Biotechnology Information (NCBI) által rendelkezésre bocsátott internetes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) PHI-BLAST, PSI-BLAST és WU-BLAST adatbázis kereső algoritmusok voltak (Altschul et al., 1997, McGinnis et al., 2004).

A Dsk2 homológ CG14224 (Ubiquilin, dUbqln) gén által kódolt fehérje aminosav szekvenciájával végzett BLAST szűrés nagyfokú hasonlóságot mutatott a CG31528 gén által meghatározott fehérjével (6. ábra). Az aminosav egyezés 28% (75/271), a hasonló aminosavak százalékos aránya pedig 46% (126/271). A hasonlóság a funkcionális doméneken belül nagyobb mértékű. A *Drosophila* CG31528 gén feltételezett terméke aminosav szekvenciájának és domén-szerkezetének hasonlósága alapján poliubikvitin receptornak tűnik.

A CG31528 gén domén-szerkezete megfelel az UBA/UBL fehérjék családjába tartozó poliubikvitin receptorok domén-szerkezetének. A CG31528 gén által kódolt aminosav szekvenciában az UBL domén a 9-79 pozícióban, az UBA domén a 298-335 pozícióban található. A Dsk2/CG14224 gén által kódolt aminosav szekvenciában az UBL domén a 6-75 pozícióban, az UBA domén a 409-445 pozícióban található. A két UBA domén nagymértékben hasonló. Aminosav szekvenciájuk és domén-szerkezetük hasonlósága alapján valószínűsíthető, hogy a CG31528 gén a Dsk2/CG14224 duplikálódásával jött létre.

Az RNS-interferencia sikerességét és hatását az *Ub-R^{R11/1}/Actin5C-GAL4*, *Ub-R^{KK}/Actin5C-GAL4*, *Ub-R^{R17/2}/Actin5C-GAL4*, *Ub-R^{R12/2}/Actin5C-GAL4* genotípusú állatokon vizsgáltam. Ezek fenotípusát az *Ub-R^{R11/1}/CyO,GFP*, *Ub-R^{KK}/CyO,GFP*, *Ub-R^{R17/2}/CyO,GFP*, *Ub-R^{R12/2}/CyO,GFP* genotípusú testvéreikhez hasonlítottam, melyekben a GAL4 transzkripciós faktor hiánya miatt nem indukálódott az RNS interferencia.

A „géncsendesítés” hatékonyságát RT-PCR kísérletekkel ellenőriztem. Az indukált törzsek farát adult bábjaiból izolált RNS-ről cDNS-t készítettem és ezeket használtam templátként. Az RT-PCR reakcióba bevitt cDNS-ek mennyiségét az *RpL17* riboszómális proteint kódoló gén mennyiségére normalizáltam. Eredményeim alapján valamennyi vizsgált esetben hatásos volt az RNS-interferencia, minden esetben csökkent a géntermék mennyisége azokban az állatokban, amelyek hordozták a GAL4 drivert az RNSi konstrukció mellett (8. ábra).



8. ábra A „géncsendesítés” mértékének vizsgálata RT-PCR reakcióval. Az RNSi indukált bábok (i) transzkript szintjét GAL4 forrást nem hordozó testvéreikhez, mint kontrollhoz (k) hasonlítottuk (felső sor). Bemérési kontroll az *RpL17A* transzkriptum (alsó sor). CG31528/L17 transzkriptum arány: 1:1.

A „géncsendesítés” fenotípusbeli hatásának vizsgálatához szinkronizált első stádiumos lárvákat gyűjtöttem és folyamatosan követtem a fejlődésüket. Ha a géntermék létfontosságú, akkor attól függően, hogy mely fejlődési stádiumokban van rá legfőképpen szükség, abban a stádiumokban lenne leginkább megfigyelhető az állatok pusztulása. A bebábozódott állatok túlnyomó többsége azonban mindegyik törzs esetén kikelt, az elpusztult egyedek száma az indukált és nem indukált utódok esetén közel azonos volt (1. táblázat). A kikelt példányok fertilisnek bizonyultak.

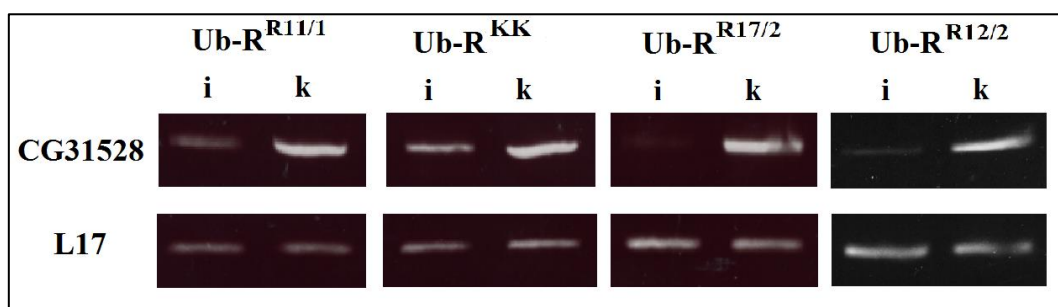
Genotípus	Legyűjtött lárvák	Elpusztult lárvák	Elpusztult bábok (ebből farát adultak)	Kikelt adultak
Ub-R ^{R11/1} /Act5C-Gal4	217	65	0 (0)	152
Ub-R ^{R11/1} /CyO, GFP (kontroll)	247	58	3 (1)	186
Ub-R ^{KK} /Act5C-GAL4	265	96	5 (1)	164
Ub-R ^{KK} /CyO, GFP (kontroll)	269	103	2 (1)	164
Ub-R ^{R17/2} /Act5C-GAL4	776	46	25 (18)	705
Ub-R ^{R17/2} /CyO, GFP és Act5c-GAL4/CyO, GFP (kontroll)	1333	168	52 (37)	1113
Ub-R ^{R12/2} /Act5C-GAL4	229	73	12 (6)	144
Ub-R ^{R12/2} /CyO, GFP (kontroll)	253	87	13 (10)	153

1. táblázat A **CG31528**-specifikus RNS-interferencia vonalak letálfázisai *Actin5C-GAL4* állatokhoz történt keresztezést követően. Az *Act5C-Gal4* sorok az indukált, a *CyO,GFP* sorok pedig a kontroll állatokat mutatják.

Az RNS-interferencia hatékonyságának növelése érdekében az RNSi vonalainkat *Actin5C-GAL4; UAS-Dicer2/TSTL* törzzsel is kereszteztem. A Dicer enzim minden eukarióta szervezet védelmi mechanizmusaként a kettős szálú RNS-eket (dsRNS) 21-25 nukleotid hosszúságú darabokra hasítja, majd a rövid RNS darabok fehérjékhez kötődnek és RNS csendesítő komplexet alkotnak. Ennek eredményeként erősödik az RNS-interferencia hatása.

Az RNS-interferencia hatását az *Ub-R^{R11/1}/Actin5C-GAL4; UAS-Dicer2/+*, *Ub-R^{KK}/Actin5C-GAL4; UAS-Dicer2/+*, *Ub-R^{R17/2}/Actin5C-GAL4; UAS-Dicer2/+*, *Ub-R^{R12/2}/Actin5C-GAL4; UAS-Dicer2/MKRS* vagy *TM6B* genotípusú állatokban vizsgáltam és *Ub-R^{R11/1};+/TSTL*, *Ub-R^{KK};+/TSTL*, *Ub-R^{R17/2};+/TSTL*, *Ub-R^{R12/2};MKRS/TSTL* genotípusú testvéreikhez hasonlítottam.

Az RNS-interferencia hatását ebben az esetben is teszteltem RT-PCR reakcióval az előzőhöz hasonló módon. A keletkezett géntermék itt is jelentősen lecsökkent az indukált állatokban nem indukált testvéreikhez képest (9. ábra).



9. ábra A „géncsendesítés” mértékének vizsgálata RT-PCR reakcióval a DICERT is tartalmazó indukció esetén. CG31528/L17 transzkriptum arány: 1:1.

Az RNSi törzsek letálfázisának vizsgálata során a bebábozódott állatok túlnyomó többsége ez esetben is kikelt, egy törzs kivételével ($Ub-R^{R11/1}$). A másik három vonal esetén közel azonos volt az elpusztult egyedek száma az indukált és nem indukált utódok esetén, az előző indukcióhoz képest nem történt jelentős változás. A bebábozódott, de ki nem kelt állatok nagy része farát adult stádiumban pusztult el. A kikelt példányok ebben az esetben is fertilisnek bizonyultak.

Genotípus	Legyűjtött lárvák	Elpusztult lárvák	Elpusztult bábok (ebből farát adultak)	Kikelt adultak
$Ub-R^{R11/1}/Act5c-GAL4; UAS-Dicer2/+$	520	98	355 (336)	67
$Ub-R^{R11/1}; + / TSTL$ (kontroll)	483	44	79 (67)	360
$Ub-R^{KK}/Act5c-GAL4; UAS-Dicer2/+$	530	5	124 (75)	401
$Ub-R^{KK}; + / TSTL$ (kontroll)	431	17	58 (45)	356
$Ub-R^{R17/2}/Act5c-GAL4; UAS-Dicer2/+$	721	97	43 (31)	581
$Ub-R^{R17/2}; + / TSTL$ (kontroll)	706	22	48 (27)	636
$CyO, GFP/Act5c-GAL4; UAS-Dicer2/+$ (kontroll)	786	163	26 (14)	597
$Ub-R^{R12/2}/Act5c-GAL4; UAS-Dicer2/MKRS$ vagy $TM6B$	491	61	24 (18)	406
$Ub-R^{R12/2}; MKRS / TSTL$ (kontroll)	763	20	77 (67)	666

2. táblázat A **CG31528**-specifikus RNS-interferencia vonalak letálfázisai *Actin5C-GAL4; UAS-Dicer2* állatokhoz történt keresztezést követően. Az *Act5C-Gal4; UAS-Dicer2* sorok az indukált, a *TSTL* sorok pedig a kontroll állatokat mutatják. Az $Ub-R^{R17/2}$ törzs esetén két kontroll is van, mivel a kiindulási törzs homozigóta letális, az $Ub-R^{R17/2}; + / TSTL$ és a *CyO,GFP/Act5c-GAL4; UAS-Dicer2/+*.

Kísérleteim azt mutatják, hogy a CG31528 fehérje (a Ddi1/CG4420 és Rad23/CG1836 géntermékhez hasonlóan) nem létfontosságú az ecetmuslica egyedfejlődése folyamán. Az $Ub-R^{R11/1}$ törzs esetén megfigyelhető farát adult bábpsztulás valószínűleg valamilyen nem ismert hatás eredménye, ugyanis az RT-PCR vizsgálat során nem ebben a törzsben jelentkezett a legerőteljesebb „géncsendesítés”.

A CG31528 gén expressziója a testiszben a legerőteljesebb (1-es melléklet), ezért az RNSi vonalakat olyan driver törzsekhez kereszteztem, amely a drivert hordozó hím utódok testiszében indukálja a gén-specifikus RNS-interferenciát.

A következő testisz-specifikus driver törzseket használtam: *If/CyO; tub-GAL4/TM6B*, *nanos-GAL4* és *Tft/CyO; Bam-GAL4*. A keresztezésekből származó indukált hím utódok fertilitását vizsgáltam. Ehhez *white*⁻ szűz nőtényekhez kereszteztem őket (1 hímet 5 nőtényhez). Minden RNSi vonal fertilisnek bizonyult. Ez az eredmény ismét azt látszik

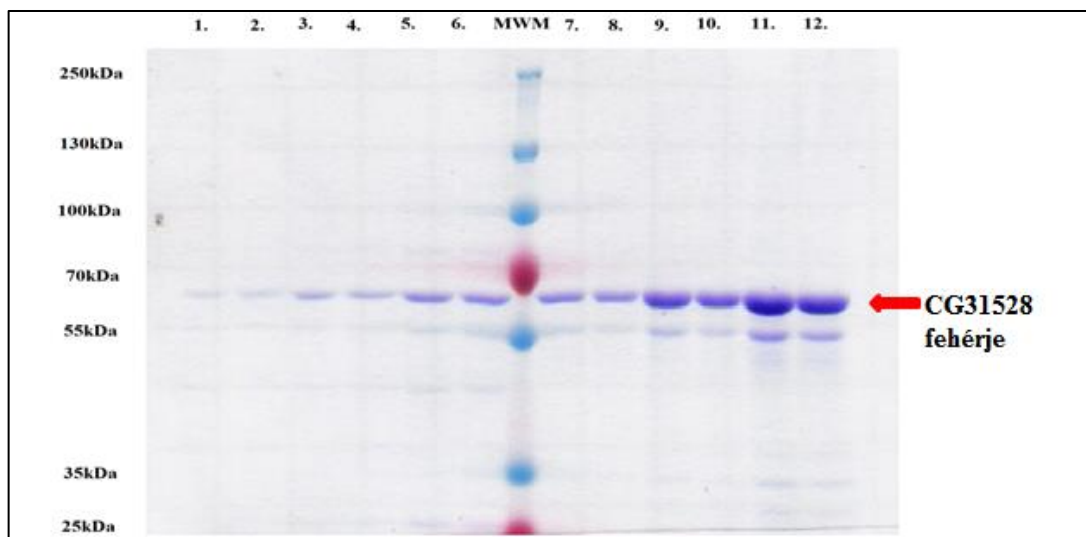
igazolni, hogy a vizsgált géntermék jelenléte nem játszik szerepet a fertilitásban ecetmuslicában.

Az RNS-interferencia csak lecsökkenti a géntermék mennyiségét, teljes mértékben nem távolítja el azt a gazdaszervezetből, ezért CRISPR/Cas rendszert használva tervezzük nullmutáns vonalak előállítását és azok fenotípusbeli eltérésének vizsgálatát. A CRISPR/Cas technika a baktériumok és archeák adaptív immunrendszerén alapuló eljárás. A baktériumok fágból származó DNS darabokat építenek be a saját kromoszómájuk CRISPR repetitív régiójába és a minta alapján képződő vezető RNS irányítja a Cas9 nukleázt a hasítandó DNS-hez.

4.3. GST-hez fúzionált rekombináns CG31528 fehérje termeltetése

A *CG31528* gén terméke aminosav szekvenciájának hasonlósága alapján poliubikvitin receptornak tűnik. Erre valódi bizonyítékot az szolgáltatna, ha ki tudnánk mutatni, hogy poliubikvitinált fehérjéket köt és, hogy kötődik a proteasómához. Munkatársaim a *CG31528* génről képződő cDNS szekvenciájának pGEX-4T-1 vektorba (2-es melléklet) történő klónozásával előállítottak egy olyan konstrukciót, amelyet *E. coli* sejtekbe transzformálva lehetővé válik a *CG31528* gén által kódolt fehérje glutation S-transzferázhoz (GST) fúzionált változatának termeltetése. A GST fúziós fehérje glutationt hordozó affinitás oszlopon (Glutation-Sepharose) kiköthető és így vizsgálható a poliubikvitinált fehérjéket és proteasómát kötő képessége.

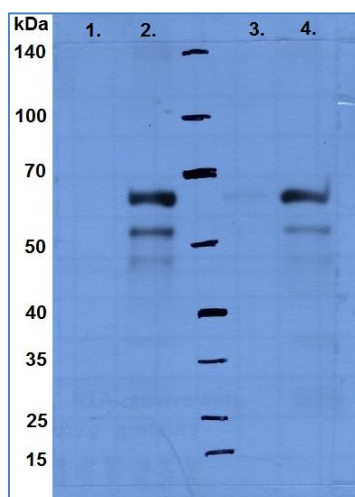
Az előállított pGEX-4T-1-*CG31528* konstrukciót *E. coli*ba transzformáltam és a fehérje expresszió optimális körülményeit vizsgáltam. Teszteltem az indukció során használt eltérő IPTG koncentráció (0,2 és 0,5 mM) hatását, az indukció utáni növesztési hőmérsékletet (20, 22, 25°C), az indukciós idő hosszának (2-10 h) jelentőségét, kétféle tápoldatot illetve kétféle *E. coli* törzset (DH5α és BL21). Az eltérő IPTG koncentráció (10. ábra) és az indukciós idő a baktérium növekedés és a fehérjetermelés szempontjából nem eredményez számottevő különbséget. A növesztési hőmérsékletek közül a 22°C tűnt a legmegfelelőbbnek. Ebben az esetben is számottevő fehérje mennyiség került zárványtest formájában a csapadékba, de szolubilis formába is elegendő került. A kétféle baktérium törzs közül a fehérje expresszió és tisztítás a BL21 törzsben tűnt hatékonyabbnak. A fehérje alacsony expressziója miatt felvetődött esetleges toxikussága is. Ezt az indukció utáni OD méréssel kizártuk.



10. ábra A termeltetett CG31528-GST fehérje kimutatása SDS-PAGE-el. A nyíl jelöli a termeltetett 64,7 kD-os fehérjét (38,7 kDa + 26 kDa méretű GST jel). Az első hat minta páronként különböző mennyiségű (5 µl, 10 µl, 20 µl) felülúszót, míg a második hat minta páronként különböző mennyiségű (5 µl, 10 µl, 20 µl) csapadékot tartalmaz. A párok első tagja esetén a kultúra 0,2 mM IPTG-t, második tagja esetén 0,5 mM IPTG-t tartalmazott.

4.4. Glutathione-Sepharose géliszűrési kísérletek és Western-blot

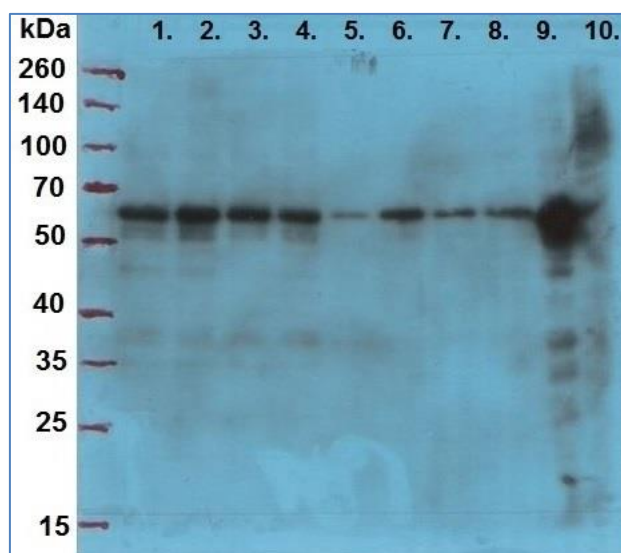
Western-blot technikával Glutathion-S-Transzferáz elleni antitesttel kimutattam a GST-CG31528 fúziós fehérje jelenlétét. Abban a fehérjemintában, ami az indukált baktériumokból származik mind a csapadékban, mind a felülúszóban jól látható jelet kaptam a fúziós fehérjének megfelelő molekulasúlynál (65 kDa) (11. ábra).



11. ábra GST elleni elsődleges antitesttel végzett Western-blot kísérlet. Az első minta a nem indukált csapadékból, a második minta az indukált csapadékból, a harmadik minta a nem indukált felülúszóból, a negyedik pedig az indukált felülúszóból származik.

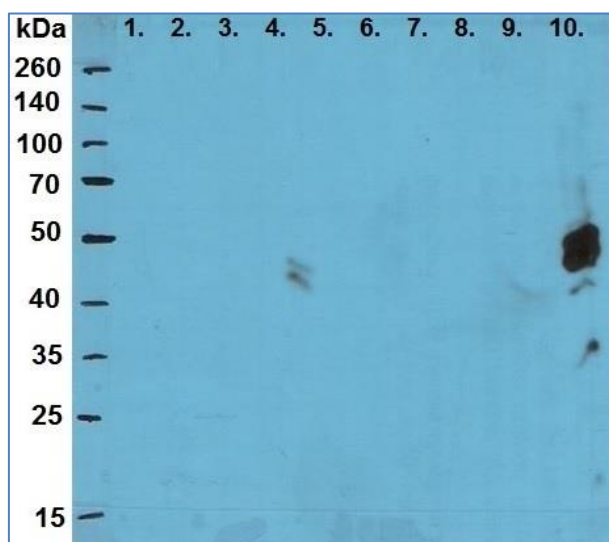
Ezt követően Glutathione-Sepharose gélszűrőssel tisztítottam a fehérjét. Az SDS-PAGE kísérletek azt mutatták, hogy csak kis mennyiségben sikerült gyöngyhöz kötnöm a fúziós fehérjét, ugyanis a vizsgált fehérje nagy része a nem kötődő baktérium fehérje elegyben maradt. A glutathion gyöngyhöz kötött tisztított fehérjét ecetmuslica embrió/adult fehérje homogenizátummal inkubáltam, annak megállapítására, hogy köt-e a vizsgált fehérjénk poliubikvitinált fehérjéket. A gyöngyről való leoldás után immunoblotot végeztem ubikvitin elleni elsődleges antitestet használva.

Jelet csak a GST-CG31528 fúziós fehérje molekulásúlyának megfelelő sávban kaptam. Ez jelenheti azt, hogy maga a vizsgált fehérje ubikvitinálódik vagy, hogy a fehérje reagál valami oknál fogva az antitesttel. Ennek eldöntésére Western-blotot csináltam olyan tisztított fúziós fehérjével, amely érintkezésbe került fehérje kivonattal és párhuzamosan olyan fehérjével, amelyet a homogenizátummal való inkubálás előtt oldottam le a gyöngyről. Így nem léphetett kölcsönhatásba ubikvitinnel, ugyanis a baktériumokban nem található ubikvitin, tehát az expresszáltatás során nem kerülhetett vele kapcsolatba. A kivonattal nem érintkező fehérje is adott jelet az ubikvitin elleni ellenanyagra (12. ábra), vagyis a jel nem specifikusnak tűnik. Mivel csak a fúziós fehérje molekulásúlyának megfelelő helyen volt detektálható jel, poliubikvitinált fehérjéket a vizsgált fehérje nem kötött meg a fehérje homogenizátumból.



12. ábra Ubikvitin elleni elsődleges antitesttel végzett Western-blot kísérlet. Az első minta a kikötött fehérje mosásából származó PBS, a második, harmadik és negyedik minta a megkötött fehérje leoldásának 2-4. frakciója, az ötödik minta a kikötött fehérje légy fehérje homogenizátummal való inkubálása utáni mosó PBS, a hatodik, hetedik és nyolcadik minta a fehérje kivonattal való inkubálását követő redukálás után leoldott 2-4. frakció, a kilencedik minta a légy fehérje homogenizátum, a tizedik pedig a nem kötődő baktérium fehérje.

A poliubikvitin receptorok további jellemzője az ubikvitinált fehérjék megkötésén kívül, hogy kötődhetnek a proteaszómához. Ezért a 26S proteaszóma alegységei ellen termeltetett antitestekből összeállított elsődleges ellenanyag keverékkel szintén Western-blot kísérletet végeztem (13. ábra). Jelet nem kaptam a gyöngyről leoldott fehérje frakciókban, vagyis a tisztított fehérje az adult muslica fehérje homogenizátumból nem kötött meg proteaszóma alegységeket.



13. ábra Proteaszóma elleni elsődleges antitesttel végzett Western-blot kísérlet. Az első minta a kikötött fehérje mosásából származó PBS, a második, harmadik és negyedik minta a megkötött fehérje leoldásának 2-4. frakciója, az ötödik minta a kikötött fehérje légy fehérje homogenizátummal való inkubálása utáni mosó PBS, a hatodik, hetedik és nyolcadik minta a fehérje kivonattal való inkubálását követő redukálás után leoldott 2-4. frakció, a kilencedik minta a légy fehérje homogenizátum, a tizedik pedig a nem kötődő baktérium fehérje.

Az immunoblot kísérletek eredménye alapján arra következtetünk, hogy a GST fúziós fehérjét nem sikerült megfelelő mértékben, elegendő mennyiségben tisztítani és aktív formában termeltetni. Ezért a későbbiekben átklónozzom egy másik vektorba, másik fúziós jelet használva.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

*Drosophila melanogaster*ben három az UBA/UBL fehérjék családjába tartozó poliubikvitin receptor ismert, azonban feltételezzük további poliubikvitin receptorok létezését is a poliubikvitin láncok sokfélesége és eltérő szerepe miatt. Aminosav szekvencia homológia alapján azonosítottunk egy feltételezhetően új poliubikvitin receptort kódoló gént, a CG31528-at. Célul tűztük ki ennek a génnek a jellemzését, funkciójának vizsgálatát különböző klasszikus genetikai, molekuláris biológiai és biokémiai módszerek felhasználásával. Ez az én feladatom.

A CG31528 génre specifikus transzgenikus RNS-interferencia törzseket állított elő csoportunk. Az RNS-interferencia indukciója jelentős mértékben csökkentette a génexpressziót, azonban nem okozott zavart az állatok egyedfejlődésében. Tesztisz-specifikus driver törzsekhez is elvégeztem az RNSi törzsek keresztezését, azonban az indukált hím utódok nem mutattak sterilitást. Ezen vizsgálatok alapján a gén nem tűnik létfontosságúnak, más poliubikvitin receptorok átvehetik a funkcióját.

Munkatársaim pGEX-4T-1 expressziós vektorba klónozták a CG31528 cDNS-t, amely lehetővé teszi a gén által kódolt fehérje glutation S-transzferázzal (GST) fuzionált változatának baktériumokban való termeltetését. A fúziós fehérjét tisztítottam és Glutathione-Sepharose gélszűrési kísérlettel valamint Western-blottal vizsgáltam köt-e poliubikvitinált fehérjéket, illetve kötődik-e a proteaszómához. Az anti-ubikvitin ellenanyagra nem specifikus jelet kaptam, az anti-proteaszóma ellenanyagra, pedig nem kaptam jelet. Következtetéseink szerint a fehérjét nem sikerült aktív konformációban termeltetni, megfelelő mennyiségben tisztítani.

További terveink:

1. Szeretnénk megvizsgálni, hogy a túltermelés okoz-e látható fenotípust.
2. CRISPR/Cas rendszert használva tervezzük nullmutánsok előállítását és jellemzését.
3. Tervezzük a CG31528 cDNS élesztő kettős-hibrid vektorba klónozását is. Ez lehetővé tenné, hogy interakciós partnereket azonosítsunk. Azt reméljük, hogy így a CG31528 poliubikvitin receptor szubsztrátjait és a szabályozásában résztvevő fehérjéket azonosíthatunk.

4. A CG31528 cDNS új vektorba való klónozását, új jelhez történő fúzionálását tűztük ki célul megfelelő konformációjú, aktív fehérje termeltetése és hatékonyabb tisztítás reményében.
5. Meg szeretnénk határozni azt is, hogy milyen típusú poliubikvitint köt a CG31528 fehérje. A CG31528 fehérje eltérő kapcsoltságú poliubikvitinekkel szembeni specifitása K11-, K29-, K48- és K63-kapcsolt tetra-Ub láncok beszerzésével tesztelhető lenne pull-down és Western-blot kísérletekkel.