

Tervezett vizsgálataink első csoportjában célul tűztük ki a 26S proteaszóma p54-es multiubiquitin receptor alegysége által felismert szubsztrát fehérjék azonosítását. Miután ezt a projektet az OTKA pályázatomban 4 éves terminusának végéig nem sikerült befejeznünk, eredményeinkről részletesebben számolnék be. A vad típusú és $\Delta p54$ deléciós mutáns *Drosophila* kócsokból készített fehérje extraktumok 2 dimenziós IEF-SDS poliakrilamid gélelektroforetikus mintázatának összehasonlításából terveztük azonosítani azokat a szubsztrát fehérjéket, melyek intracelluláris lebontásában a p54-es multiubiquitin receptor alegység játszik kizárólagos szerepet. Vizsgálatainkban egyértelműen azonosítani tudtunk 22 olyan fehérje foltot, melyek $\Delta p54$ deléciós mutánsban nagymértékben felszaporodtak a vad típushoz viszonyítva. Ezen fehérjék tömegspektrometriás azonosítása egyértelműen bizonyította pályázatomban leírt kiindulási feltételezésünket, hogy a 26S proteaszóma alegységei a mutánsban nagymértékben felszaporodnak. Az azonosított 22 fehérjéből 20 a proteaszóma alegységei voltak. Reprodukálhatóan nagymértékben akkumulálódott a *Drosophila* morfogenezisben fontos szerepet játszó fat body protein 1 precursor és a fat body protein 2, melyek fontos szerepet töltenek be fehérjéknek a zsírtestbe történő transzportjában. A vad típusú és a $\Delta p54$ deléciós mutáns *Drosophila* kócsokból készített fehérje extraktumok 2D-os gél mintázatának ubiquitin elleni ellenanyaggal végzett immunoblottos analízise nagyszámú multiubiquitinált fehérje felszaporodását mutatták ki a deléciós mutánsban, tömegspektrometriás módszerrel ezen fehérjék azonosítása azonban nem sikerült, valószínűleg alacsony koncentrációjuk, és a gélben azonos pozícióban lévő abundáns nem-ubiquitinált fehérjék jelenléte miatt. Nyilvánvalóvá vált, hogy a p54-es ubiquitin receptor szubsztrát körének azonosításához a multiubiquitinált fehérjék tisztítása szükséges. Ennek érdekében egy speciális affinitás-tisztítási módszert dolgoztunk ki, felhasználva a p54-es alegység azon tulajdonságát, hogy *in vitro* is képes nagy affinitással kötni a multiubiquitinált fehérjéket. *E. coli*-ban termeltetett N-terminális végén tag-gelt rekombináns p54-es fehérjét a tag-nek megfelelő affinitás mátrixhoz kötöttük, a bakteriális fehérjéket kimostuk, majd *Drosophila* össz-fehérje extraktumot cirkuláltattunk az affinitás oszlopon, a nem kötődő fehérjéket kimostuk és a tag-nek megfelelő elúciós technikával a p54-hez kötődő fehérjéket visszanyertük. Anti-ubiquitin ellenanyaggal végzett immunoblot bizonyította, hogy a multiubiquitinált fehérjéket a p54-es affinitás oszlop gyakorlatilag kvantitatíve képes volt a *Drosophila* össz-fehérje extraktumból megkötni. Tömegspektrometriás analízis során azonban bizonyítást nyert, hogy az ilyen módon tisztított preparátum még rendkívül szennyezett. Az azonosított nagy számú bakteriális fehérje megfelelő kontrol kísérletekkel együtt egyértelműen bizonyították, hogy az üres, tehát p54-es fehérjét nem hordozó affinitás mátrix rendkívül sok, aspecifikusan kötődő bakteriális fehérjét képes megkötni. Miután három különböző tag-specifikus affinitás mátrix esetében is hasonló problémát találtunk, nyilvánvaló volt, hogy a multiubiquitinált fehérjék egyetlen affinitás kromatográfiával történő tisztítása alkalmatlan a nagyon kis mennyiségben lévő multiubiquitinált fehérjék tisztítására. Végezetül a következő három lépcsős tisztítási eljárást dolgoztunk ki: előállítottuk a p54-es alegység 3-szorosan tag-gelt változatát, a fehérje N-terminális végéhez His₆-Flag-tag-et, C-terminális végéhez CBD-tag-et kapcsoltunk. Az *E. coli*-ban termeltetett rekombináns fehérjét először Zn-metál affinitás kromatográfiával tisztítottuk, így megszabadultunk az *E. coli* fehérje szennyeződések zömétől. A rekombináns fehérjét ezután anti-Flag M2 immunaffinitás oszlophoz kötöttük, és az oszlopon *Drosophila* fehérje extraktumot cirkuláltattunk. A nem kötődő *Drosophila* fehérjéket alapos

mosással távolítottuk el, és a p54-multiubiquitin fehérje komplexeket specifikus elúciós technikával, szintetikus Flag peptiddel eluáltuk. Az eluátumot CBD-oszlopra vittük, az aspecifikus fehérjék eltávolítását ismét alapos mosással biztosítottuk, majd az oszlopról a p54-multiubiquitin fehérje komplexeket eluáltuk. E módszer segítségével az aspecifikusan kötődő bakteriális fehérjéket 3, az aspecifikusan kötődő Drosophila fehérjéket pedig 2 egymás utáni affinitás oszlopon történő kromatográfiával távolítottuk el. Ezen fehérje halmaz tömegspektrometriás analízise folyamatban van.

Vizsgálataink második csoportjában a 26S proteaszóma p54-es multiubiquitin-kötő receptorának hatásmechanizmusát tanulmányoztuk. A multiubiquitinált fehérjék felismerése és megkötése elvileg két úton valósulhat meg. Miután a p54-es alegység korábbi vizsgálataink szerint a 26S proteaszómának egy exponált, felületi régiójában helyezkedik el, topológiailag alkalmas a 26S proteaszómához kötött állapotban is felismerni és megkötni a multiubiquitinált fehérjéket. Korábbi vizsgálataink szerint azonban, melyet számos más faj esetében is megerősítettek, a Drosophila p54-es fehérje a 26S proteaszóma egyetlen olyan alegysége, mely a proteaszómához kötött és szabad állapotban egyaránt előfordul a sejtben, így a multiubiquitinált fehérjék felismerése és megkötése az alegység ingázó mechanizmusával is magyarázható lehet. A feltételezett ingázó mechanizmus során a szabad állapotban lévő p54 ismeri fel és köti meg a multiubiquitinált fehérjéket, majd a 26S proteaszómához visszakötődve prezentálja lebontásra a fehérjét. Az ingázó mechanizmusnak természetesen előfeltétele, hogy bizonyítsuk a p54-es alegységnek a 26S proteaszómáról történő szabályozott és reverzibilis disszociációját és visszakötődését. Vizsgálatainkban abból a publikált eredményből indultunk ki, mely szerint a 26S proteaszóma Rpn11-es alegysége egy Zn-metalloproteáz, és a Zn eltávolítása nemcsak a deubiquitinációs aktivitást, hanem a 26S proteaszóma teljes degradációs ciklusát felfüggeszti. Ez a megfigyelés azt sugalta, hogy a 26S proteaszóma különböző funkciói Zn-függő kooperációban működnek. Miután kimutattuk, hogy a p54-es alegység is Zn-kötő fehérje, megvizsgáltuk a Zn hatását a p54-es fehérje disszociációs állapotára, a 26S proteaszóma szerkezetére és működésére. Bizonyítottuk, hogy a Zn koncentráció függvényében a 26S proteaszóma még ATP jelenlétében is képes regulátor partikulumra és katalitikus partikulumra disszociálni, és ezt a disszociációt a 26S proteaszóma egyetlen alegységének, a p54-es alegységnek a kilépése kíséri. A 26S proteaszóma ezen szétszerelődését peptidáz aktivitásának teljes megszűnése kíséri. Ezek a funkcionális és strukturális változások teljesen reverzibilisek, a fiziológias Zn koncentráció visszaállítását követően a regulátor és katalitikus partikulumok ismét összeszerelődnek, a p54-es alegység ismét beépül az összeszerelődött 26S proteaszómába, és a strukturális visszarendeződést a peptidáz aktivitás teljes normalizálódása kíséri. Vizsgálataink során azt is kimutattuk, hogy a p54-es alegység Zn-függő disszociációját követően az alegység kölcsönhatásba lép számos nem-proteaszómális fehérjével, többek között fehérjék sumoilálását végző enzimekkel. Ez a megfigyelés azt sejteti, hogy szabad állapotában a p54-es alegység más, ma még ismeretlen, a proteaszómától független fiziológias folyamatban is részt vehet. Ezen folyamatok in vivo és/vagy in vitro tanulmányozására olyan rendszer lenne alkalmas, melyben sikerülne a p54-es alegységnek, vagy annak valamely szakaszának az extra-proteaszómális állapotát rögzíteni. A kérdés megoldására olyan transzgenikus Drosophila törzseket állítottunk elő, melyekben a teljes hosszúságú p54-es alegységet, vagy annak N-terminális- ill. C-terminális felét lehetett Strep-tagelt változatban indukálható módon túltermeltetni. Az alegység N-terminális fele hordozza azokat a szekvencia részleteket, melyek az alegységnek a proteaszómába történő beépülését biztosítja, míg a C-terminális fél hordozza az ubiquitin interakciós doméneket, melyek a multiubiquitinált fehérjék felismeréséért és megkötéséért felelősek. Azok a transzgenikus Drosophila törzsek, melyekben a teljes hosszúságú p54 alegység, vagy annak N-terminális fele

expresszálódott tökéletesen életképesek és fertilisek voltak, míg az alegység C-terminális felének expressziója lárvális letalitást okozott. Várakozásunknak megfelelően a teljes hosszúságú transzgén ill. annak N-terminális fele beépült a 26S proteaszómába, szemben az alegység C-terminális felével, mely monomer fehérjeként szabad állapotban maradt. Miután a p54-es alegység transzgenikus C-terminális fele Strep-tag-gelt volt, Strep-tactin affinitás oszlopon egy lépésben tisztítani sikerült. Immunoblottos analízissel kimutattuk, hogy a C-terminális fél fehérje posztszintetikus módosítás következtében egy olyan létrázat formájában jelent meg a poliakrilamid gélen, mely a multiubiquitinációra jellemző. Az affinitás kromatográfiával tisztított és 2 dimenziós gélen tovább tisztított C-terminális fehérje származékok tömegspektrometriás analízise segítségével bizonyítottuk, hogy a posztszintetikus módosítás valóban ubiquitináció. A transzgenikus C-terminális fehérje intracelluláris stabilitásának vizsgálatával azt is sikerült bizonyítani, hogy a C-terminális fehérje in vivo egy stabil, hosszú élettartamú fehérje, tehát ubiquitinációja nem degradációs szignálként működik, hanem valamilyen eddig ismeretlen funkciót biztosít. Ennek a funkciónak a megismerésére in vitro pull-down kísérletekben megvizsgáltuk, hogy az alegység C-terminális fele milyen celluláris fehérjékkel képes in vitro kölcsönhatni. Mint fentebb említettem, az alegység C-terminális fele, az itt található ubiquitin interakciós doménekkel felelős a multiubiquitinált fehérjék megkötéséért. Az ubiquitin interakciós domének után található egy rövid fehérje szakasz, mely Drosophilától emberig az ubiquitin receptor alegységekben 100%-ban homológ, s amelyben található egy 17 aminosav hosszúságú fehérje szakasz, mely 100%-os homológiával megtalálható egy olyan emberi fehérjében is, melynek N-terminális szakasza a foszfatidylinositol phosphate kinase-zal mutat rendkívül magas szekvencia homológiát. Elkerülendő az ubiquitin interakciós doménekhez kötődő nagyszámú multiubiquitinált fehérje zavaró hatását, és célzottan vizsgálni ezzel a nagyfokú homológiát mutató fehérje szakasszal kölcsönható fehérjéket az alegység C-terminális felének az ubiquitin interakciós domének utáni szakaszát klónoztuk GST-tag után és GSH-Sepharóz oszlopon Drosophila embrionális fehérje extraktból halásztunk kölcsönható fehérjékre. Két domináns kölcsönható fehérjét, az alfa- és beta-tubulint sikerült tömegspektrometriás módszerrel azonosítanunk.

A 26S proteaszóma regulátor szubkomplexumát alkotó közel 20 alegység funkcióit korábban csak élesztőben tanulmányozták szisztematikusan az alegységeket kódoló gének mutációinak analízisével. A Drosophila genetika kiváló lehetőséget kínál ezen alegységek funkciójának megismeréséhez magasabb rendű eukariótákban. Korábbi vizsgálatainkban a p54 ubiquitin receptor alegység deléciós mutánsának analízisével jól demonstráltuk, hogy bár az élesztő analízisével rendkívül fontos információkat nyerhetünk egy fehérje funkciójáról, magasabb eukariótákban a funkciók általában sokkal diverzifikáltabbak, az élesztőben nyert adatok nem mindig elégségesek a magasabb eukariótákban zajló folyamatok megértéséhez. Ennek a koncepciónak a szellemében folytattuk a regulátor komplex alegységeit alkotó fehérjék genetikai analízisét. Vizsgálataink célja a regulátor komplex egy másik fontos funkcionális egységének, az ATPase alegységeknek genetikai tanulmányozása volt. A regulátor komplexben 6 különböző AAA típusú ATPase alegység található, melyek feltételezett funkciói a szubsztrát fehérje letekerése anti-chaperonin hatásuk révén, a katalitikus partikulumba kapuzott centrális csatornájának felnyitása és a szubsztrát fehérjének a katalitikus partikulumba történő betáplálása. Élesztőben mind a 6 ATPase alegység gén ATP-kötő doménjében található konzerválódott lizin mutációját vizsgálták már, megállapították, hogy bizonyos alegységek mutációja letális következményű, bizonyos alegységek mutációja csak stressz körülmények között okoz súlyos fenotipikus változásokat, míg az Rpt1 alegység mutációja detektálható fenotipikus változást nem eredményezett. Az alegységek funkcióinak magasabb eukariótákban bekövetkező

diverzifikációját vizsgálva *Drosophila*-ban előállítottuk az élesztő Rpt1 alegység homológjának (p48B gén) egy hipomorf mutációját. A hipomorf mutánsban a p48B mRNS és fehérje koncentrációja 30-szor alacsonyabb a vad típusú *Drosophila*-ban mért értékeknél, a mutáció lárvális letalitást eredményezett a 2. lárv stádiumban, a 26S proteaszóma összeszerelődésének súlyos zavarához vezetett, a multiubiquitínált fehérjék nagyfokú felhalmozódását eredményezte, megváltoztatta az alegység foszforilációs mintázatát, és a p48B fehérjének a kromatin állományból történő teljes depléciójához vezetett. A *Drosophila* mutáns vizsgálata ismét tanúbizonyságot tett a magasabb eukarióták genetikai vizsgálatának szükségessége mellett.

A *Drosophila* ováriumában lejátszódó, morfológiailag jól nyomon követhető fejlődés-specifikus érési folyamatok lehetőséget teremtettek a 26S proteaszóma szövet- és fejlődés-függő intracelluláris lokalizációjának tanulmányozására. Az oogenezis során a 26S proteaszóma magas koncentrációban volt kimutatható a dajka sejtek és a folliculáris epitel sejtek citoplazmájában, míg ezen sejtek magjában a proteaszóma koncentrációja alig érte el a detektálhatóság szintjét. Az oocitákban viszont a 26S proteaszóma eloszlása csaknem fordított képet mutatott, nagyon alacsony citoplazmatikus lokalizáció mellett a fejlődés previtellogenikus szakaszában a 26S proteaszóma fokozatosan növekvő nukleáris akkumulációját figyeltük meg. Az oogenezis vitellinogenikus szakaszában a 26S proteaszóma intracelluláris redisztribúcióját figyeltük meg: az oociták sejtmagjában a proteaszóma koncentrációja fokozatosan csökkent, míg a folliculáris epiteliális sejtek magjában a proteaszóma koncentrációjának nagyfokú emelkedését találtuk.

Az ubiquitin-proteaszóma rendszer egy másik nagyon fontos multiprotein komplexének, a sejtciklus szabályozásában centrális szerepet játszó ubiquitin protein ligáz aktivitású APC komplexnek (anaphase promoting complex) a molekuláris-genetikai vizsgálatát is megkezdtük. A komplexet alkotó 11 alegység közül a 3 tetratricopeptid ismétlődő egységeket tartalmazó alegység funkcióját vizsgáltuk RNS interferenciával történő transkripcionális elhallgattatás technikájával. Az *Apc6* és *Apc8* gének elhallgattatása a fejlődés késleltetését, pupális letalitást, az apoptózis nagyfokú növekedését és mitotikus defektusokat eredményezett. Az *apc7* gén elhallgattatása viszont nem eredményezett letalitást vagy sterilitást, csak a kromoszóma szegregáció kis fokú zavarát tudtuk megfigyelni. Miután az APC komplex felelős a mitotikus ciklinek sejtciklus-függő multiubiquitinációjáért részletesen vizsgáltuk a ciklin A és ciklin B intracelluláris degradációját mutánsainkban. Az *Apc6* és *Apc8* mutánsokban a ciklin B degradációja a várakozásnak megfelelően gátolt volt, a ciklin A degradációjában azonban a mutáció változást nem eredményezett. Ez egy fontos, új megfigyelés, azt jelzi, hogy a mitotikus ciklinek degradációjának mechanizmusa magasabb eukariótákban bonyolultabban szabályozott mint élesztőben.

A pályázati ciklus során két másik téma kutatását is az OTKA pályázatomban anyagi támogatásával végeztem. Részletesen vizsgáltuk az ADA2 hiszton acetiltranszferáz adaptor szerkezetét és funkcióját molekuláris biológiai és genetikai módszerekkel, valamint részt vettünk a *Drosophila* humorális és celluláris immunitását biztosító vérsejt fagocitózis receptorok molekuláris jellemzésében.

A pályázati időszak alatt végzett kutatási eredményeink segítségével a pályázatban résztvevő két PhD hallgató sikeresen megvédte téziseit és doktori fokozatot szereztek, két diákörös hallgatónk pedig diploma dolgozatot készített.

A pályázati időszak alatt a 2005 évi FEBS Meeting „Proteasomes and intracellular protein degradation” symposiumát szerveztem.