

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A POLIUBIQUITIN RECEPTOROK FEJLŐDÉSSTÁDIUM-  
SPECIFIKUS SZABÁLYOZÁSA *DROSOPHILA*  
*MELANOGASTERBEN***

LIPINSZKI ZOLTÁN

Témavezető: Dr. Udvardy Andor

SzTE-TTIK Biológia Doktori Iskola  
MTA-SZBK Biokémiai Intézet

Szeged  
2009

## BEVEZETÉS

Az eukarióta sejtek megfelelő homeosztázisának fenntartásában kiemelkedő szerepe van az ubiquitin-proteaszóma degradációs rendszernek. Ez a biokémiai apparátus végzi a funkciót vesztett, rövid féléletidejű regulátor fehérjék specifikus, kvantitatív és gyors eltávolítását, de a fehérje minőség-ellenőrzés részeként szerepe van az irreverzibilisen denaturálódott proteinek lebontásában is. A folyamat első lépése az ubiquitin-ligáz enzimkaskád, amely felismeri a lebontandó fehérjét, és egy speciális poliubiquitin láncot kapcsol annak valamely lizinjére. Ezt a degradációs jelet az ún. poliubiquitin receptorok ismerik fel és kötik meg, majd a szubsztrátot végső állomásukra, a proteolitikusan aktív 26S proteaszómához szállítják. A 26S proteaszóma két alkomplexumból tevődik össze: a degradációt végző katalitikus magból és a szabályozásért felelős 19S regulátor komplexumból. Ez utóbbi feladata a poliubiquitin receptorok szállította szubsztrátok megkötése, deubiquitilálása, letekerése és bejuttatása a katalitikus magba.

A proteaszómakutatás egyik legvitatottabb és legellentmondásosabb területe a poliubiquitin receptorok működési mechanizmusa. Ennek oka, hogy habár óriási ismeretanyag áll rendelkezésünkre főként az élesztő poliubiquitin receptorainak működését illetően, mindmáig nem értjük, hogy miként ismerik fel specifikus szubsztrátumaikat, hogyan lépnek egymással és a proteaszómával kölcsönhatásba. Élesztőben öt különböző poliubiquitin receptort találtak. Ezek közül az Rpn10, amely egyetlen ubiquitin-interakciós motívumával (UIM), és az Rpn13, amely kiterjedt pleckstrin-szerű doménjével (Pru) köti meg a poliubiquitilált fehérjéket, a proteaszóma regulátor komplexének saját alegységei. Az Rpn10 N-terminális von Willebrand-A (vWA) doménjével, míg az Rpn13 Pru doménjével kötődik a proteaszómához. A másik három receptor (UBA/UBL fehérjék: Rad23, Dsk2 és Ddi1) viszont a proteaszómától független, monomer fehérje, melyek ubiquitinnel kölcsönható doménjükkel (UBA) kötik meg a szubsztrátokat, míg ubiquitin-szerű doménjükkel (UBL) ideiglenesen a proteaszómához kapcsolódnak. Eleinte, főként élesztőben végzett kísérletek alapján úgy gondolták, hogy a poliubiquitin

receptorok összegyűjtik a poliubiquitilált fehérjéket, majd a 19S regulátor komplex nagykiterjedésű Rpn1/Rpn2 alegységek alkotta dokkoló felszínéhez kapcsolódnak.

Az utóbbi időben számos olyan eredmény látott napvilágot, ami arra utalt, hogy a magasabbrendű eukarióták poliubiquitin receptorai szerkezetileg és működési mechanizmusuk szerint is eltérhetnek élesztő ortológjaiktól. Többek között kiderült, hogy az Rpn10 *Drosophila* ortológja a p54, amely a proteaszóma esszenciális alegysége (élesztőben nem), két extra UIM-ot és egy magasabbrendűekben konzervált terminális lizin kazettát tartalmaz. Továbbá egérben kimutatták, hogy differenciális splicing-gal ontogenezis-specifikus Rpn10 változatok jönnek létre, amelyekben a két UIM kombinálódik, – hiányukban az állat embrió korban elpusztul. Emberben pedig két szerkezetében különböző, de esszenciális Rpn10 paralógot találtak, melyek közül az S5a kölcsönhatásba lép az egyik extraproteaszómális poliubiquitin receptorral, a Rad23-mal. Ezen megfigyelésekből kiindulva először magasabbrendűekben, majd később élesztőben is kimutatták, hogy az UBA/UBL poliubiquitin receptorok proteaszómához kapcsolódása szigorúan szabályozott folyamat, valamint a receptorok önmagukra és egymásra hatnak, és specifikus szubsztrátkörrel rendelkeznek.

Ma már tudjuk, hogy a poliubiquitin receptorok több szinten megvalósuló szabályozása fajoként részben azonos, részben azonban drasztikusan eltérő elemekből is állhat az élőlény igényeinek megfelelően. Habár a poliubiquitin receptorok működési mechanizmusa intenzív kutatás tárgya, mindmáig nem született olyan modell, amely az ubiquitin-proteaszóma rendszer ezen fontos elemeinek működési mechanizmusát részletesen bemutatná.

### CÉLKITŰZÉSEK

Korábbi *in vitro* kísérleteinkből tudtuk, hogy a *Drosophila melanogaster* (ecetmuslica) proteaszóma p54 alegysége exogén cink hatására képes disszociálni a proteaszóma regulátor komplexéről, amit a 26S proteaszóma alkomplexumaira történő szétesése és teljes inaktíválódása követ. Extraproteaszómális állapotában a

p54 kölcsönhatásba lép fehérjemódosító enzimekkel. A folyamat reverzibilis, ugyanis a cink elvonását követően a proteaszóma összeszerelődik, a p54 pedig visszaépül a regulátor komplexumba létrehozva az aktív 26S proteaszómát. Ezt a folyamatot a p54 alegység ingázásának nevezzük. A p54 alegység lehetséges *in vivo* ingázását két további megfigyelésünk is valószínűsítette:

1. Kimutattuk, hogy a muslica embrió-lárva heterogén keverékéből homogenitásig tisztított 26S proteaszómában a p54 alegység szubsztöchiometrikus mennyiségben volt jelen. Ezzel szemben a korai embriókból preparált 26S proteaszómában a p54, mint sztöchiometrikus alegység jelent meg. Ez a felfedezés arra utalt, hogy a proteaszóma p54 koncentrációja az egyedfejlődés különböző szakaszaiban eltérő, azaz a p54 a proteaszóma dinamikusan változó alegysége.
2. Keresztkötési kísérletünkben kimutattuk, hogy a p54 ATP jelenlétében két különböző konformációs változatban van jelen az ép 19S regulátor partikulumban. Ez a megfigyelés, valamint az a tény, hogy a p54 kölcsönhatásba lép egy fehérjemodifikációban résztvevő enzimmel, azt sugallta, hogy a p54 posztszintetikus módosuláson mehet keresztül, ami elősegítheti az alegység *in vivo* ingázását és extraproteaszómális szerepét.

**A fenti megfigyelések alapján a következő kutatási célokat tűztük ki:**

- Létrehozni egy transzgénikus muslicák alkotta vizsgálati rendszert, amelyben a p54 alegység sorsát *in vivo* nyomon követhetjük vagy elvethetjük a p54 sejten belüli ingázásának elméletét. Célunk volt olyan, a p54 különböző doménjeit túltermelő transzgénikus állatok létrehozása, amelyek segítségével az endogén p54 extraproteaszómális tartózkodási ideje és moláris mennyisége növelhető. Ha ez sikerülne, lehetővé válna az *in vivo* disszociált p54-en lejátszódott módosulások azonosítása (ha van ilyen), és a p54 kölcsönható partnereinek és extraproteaszómális szerepének vizsgálata. Ehhez két stratégiát választottunk: feltételeztük, hogy ha nagy mennyiségben túltermeltetjük a p54-et vagy annak N-terminális felét, amely a proteaszóma-

kötő vWA domént hordozza, akkor a transzgénikus fehérjék leszoríthatják az endogén p54-et a proteaszómáról az ingázás folyamán. A másik elképzelésünk szerint a p54 C-terminálisának túlermelése a vWA domén hiányában a transzgénikus fehérje extraproteaszómális feldúsulását okozná, ami modellezhetné az endogén p54 disszociált állapotát.

- Megvizsgálni, hogy a p54 alegység koncentrációja hogyan alakul a *Drosophila* ontogenezise folyamán, és ezt milyen biokémiai rendszerek szabályozzák?
- Megvizsgálni, hogy az esszenciális p54 alegység mellett milyen más poliubiquitin receptorok működnek a muslicában, és azok milyen funkcionális egységekkel rendelkeznek? Ennek eldöntésére *in vitro* pull-down és *in vivo* transzgénikus muslicákkal végezhető kísérleteket terveztünk.

### ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

#### *In vitro* módszerek:

- Adatbázisok és predikciós programok kezelése (NCBI, EBI, FlyBase, IUPred, dsCheck)
- *In vitro* DNS rekombinációs technikák: klónozás, rekombináns DNS-ek létrehozása, cDNS szintézis
- Nukleinsav preparálás (genomi DNS, mRNS, cDNS, plazmid)
- Polimeráz láncreakció, szemikvantitatív reverz transzkripcióval kapcsolt PCR
- Fehérjepreparálás biológiai mintából
- Fehérje tisztítási technikák:

Endogén és rekombináns fehérjék kromatográfiai tisztítása

Gélszűrési kromatográfia (FPLC)

Affinitáskromatográfiai tisztítási eljárások

Ioncserélő kromatográfia

Hidrofób kölcsönhatási kromatográfia

- Fehérjék elektroforetikus elválasztása (Natív-PAGE, denaturáló (SDS)-PAGE és 2D-IEF-SDS-PAGE)
  - Fehérjék azonosítása:
    - Fehérjéket specifikusan felismerő ellenanyagok készítése és immunoblot
    - Fehérjék kimutatása különböző festési eljárásokkal
  - Fehérje-fehérje kölcsönhatások és fehérje módosítások kimutatása:
    - Immunoprecipitáció
    - Kémiai keresztkötés
    - Pull-down kísérletek rekombináns és endogén fehérjékkel
    - Tömegspektrometriai analízis (előkészítés)
- In vivo* módszerek:
- P-elem inszerciós transzgénikus *Drosophila* törzsek létrehozása:
    - Transzgénikus fehérjék indukált (UAS-Gal4) termeltetése
    - Indukált (UAS-Gal4) géncsendesítés (RNS interferencia)
  - Szinkronpetéztetés
  - Genetikai interakciós kísérletek

## EREDMÉNYEK

### 1) ***A Drosophila melanogasterben három fő poliubiquitin receptor működik.***

Genomi adatbázisok segítségével, szekvencia és szerkezeti homológia alapján kimutattuk, hogy a *Drosophilában* megtalálható mind az öt élesztőben kimutatott poliubiquitin receptor ortológ (p54 és Rpn13, Rad23, Dsk2 és Ddi1). Embrióból és lárvából preparált össz RNS-ből cDNS könyvtárat készítettünk, majd specifikus oligonukleotid primerekkel, PCR-rel amplifikáltuk a feltételezett receptorok cDNS-ét. GST-hez fuzionált rekombináns fehérjékkel affinitáskromatográfiás pull-down kísérletekben elvégeztük a receptor-domének funkcionális térképezését, és kimutattuk, hogy muslicában három fő poliubiquitin receptor található (p54, Rad23 és Dsk2). Ezek közül a p54 proteaszóma alegység három UIM-ával, míg a Dsk2 egy, a Rad23 pedig két UBA doménjével képes a poliubiquitilált fehérjék

megkötésére. Habár a Ddi1 és Rpn13 fehérjék muslicában is megtalálhatóak, és rendelkeznek az élesztő ortológjaikra jellemző doménekkal, jelenlétük nem esszenciális, és a poliubiquitilált fehérjék kötésében sem vesznek részt jelentős mértékben. Kiegészítve az *in vitro* eredményeinket transzgenikus (RNS-interferencia és fehérje túltermeltetés) *Drosophilákkal* végzett kísérletekkel, *in vivo* rendszerben is igazoltuk, hogy a muslica fő poliubiquitin receptorai a p54, Rad23 és Dsk2, így a továbbiakban ezekkel foglalkoztunk.

## **2) A poliubiquitin receptorok koncentrációja változik az egyedfejlődés folyamán.**

Szinkronizált korú, 15 különböző fejlődési stádiumból (embrió; L1, L2 és L3 lárvák, bábok és kifejlett imágók) származó biológiai mintából nyert összfehérje-extraktumokat készítettünk, majd SDS-PAGE-t követő immunoblot kísérletben megvizsgáltuk a proteaszóma alegységösszetételét. Kimutattuk, hogy a p54 poliubiquitin receptor magas koncentrációban van jelen az embrionális, báb- és adultkori 26S proteaszómában, míg az ontogenezis lárvális szakaszában (L1, L2 és korai L3) a mennyisége hirtelen lecsökken, és csak a lárvastádium legvégén (kései L3) kezd újra felhalmozódni. Kimutattuk, hogy a Rad23 és Dsk2 koncentrációja is hasonlóan alakul a muslica egyedfejlődése folyamán, amit meglepetésünkre nem követ a poliubiquitilált szubsztrátok lárvakori felhalmozódása. Feltételezésünk szerint a poliubiquitin receptorok lárvállapotbeli eliminációja a 26S proteaszóma rendszer inaktiválódásához vezet, melynek biológiai jelentőségét ma még nem ismerjük pontosan.

## **3) A poliubiquitin receptorok szelektíven degradálódnak az ontogenezis lárvális szakaszában.**

Szemikvantitatív reverz transzkripcióval kapcsolt PCR segítségével megállapítottuk, hogy a p54, Rad23 és Dsk2 mRNS-ek mennyisége nem változik az egyedfejlődés folyamán, azaz koncentráció-változásuk nem transzkripcionálisan szabályozott. Kimutattuk, hogy a poliubiquitin receptorok degradálódnak a lárvális

szakaszban (proteolitikus szabályozás), amelynek háttérében egy szerin-proteáz enzim áll. Ezt az enzimet lárva-extraktumból homogenitásig tisztítottuk és tömegspektrometriai módszerrel azonosítottuk. Habár *in vivo* és *in vitro* jellemzése jelenleg is folyik, megállapítottuk, hogy az enzim jelenléte esszenciális, valamint a legkorábbi lárvastádiumban fejeződik ki először, és aktív marad egészen a harmadik lárvastádium végéig. A proteáz aktivitása a lárvastádium legvégén lecsökken, melynek háttérében génjének alacsony kifejeződése és egy specifikus inhibitor (melynek azonosítása most folyik) megjelenése áll.

A poliubiquitin receptorok lárvastádium-specifikus eliminációja a proteaszóma rendszer inaktiválódásának „legolcsóbb” módja, amely jelenségnek a fiziológiai szerepét ma még nem ismerjük. Feltételezésünk szerint a lárvakorban megváltozott környezeti feltételek miatt kikapcsol a proteaszóma rendszer, és a szubsztrátjait, amelyek ebben a stádiumban főleg irreverzibilisen denaturálódott fehérék, lárvaspecifikus szerin-proteázok bontják le.

#### **4) A p54-nek csak a C-terminális része degradálódik az egyedfejlődés folyamán**

Kísérleteink azt igazolták, hogy a p54 degradációja során a fehérje N-terminális része sértetlen marad. Predikciós programokat alkalmazva kiderült, hogy a p54 C-terminálisa rendezetlen szerkezetű, amit kísérletesen rekombináns fehérjék felhasználásával igazoltunk is. Kimutattuk, hogy az általunk azonosított szerin-proteáz a p54 C-terminális rendezetlen szerkezetű elemekre specifikus, és csak azt emészti le. Hasonlóan a p54-hez a Rad23 és Dsk2 interdomén szakaszait is hasonló rendezetlenség jellemzi (predikció), ami magyarázhatja a poliubiquitin receptorok eliminációját végző szerin-proteáz hatásmechanizmusát.

#### **5) A vWA domén jelenlétében a p54 és p54 N-terminális transzgénikus fehérjék beépülnek a proteaszómába.**

Transzgénikus *Drosophilákat* hoztunk létre, melyekben az UAS-Gal4 rendszert alkalmazva túltermeltettük a p54 teljes hosszúságú és N-terminális felét



külön-külön. A kísérlet célja az volt, hogy a vWA domént hordozó, nagy mennyiségben felhalmozódó transzgenikus fehérjék kiszorítsák az endogén p54-et a proteaszómáról, amely ezáltal extraproteaszómálisan stabilizálódik és vizsgálhatóvá válik. Habár mindkét transzgenikus fehérje kvantitatíve beépült a 26S proteaszómába, amit gélszűrési kromatográfiával és immunoblottal igazoltunk, a transzgenikus fehérjék nem tudták kiszorítani az endogén p54-et a proteaszómából, mert expressziós szintjük alacsony volt. Így kellő mennyiségű funkcióképes proteaszóma volt az állatok életben maradásához. Közvetett kísérleti eredményeink alapján úgy véljük, hogy a transzgenikus fehérjék alacsony szinten történő termelődésének fő oka a proteaszóma gének összehangolt szabályozása, amely megakadályozta a transzgenikus fehérjék endogén p54-nél nagyobb mennyiségű kifejeződését.

**6) A p54 C-terminális transzgenikus fehérje extraproteaszómálisan halmozódik fel, konzervált terminális lizinjein ubiquitilálódik, és az állatok pusztulását okozza.**

A transzgenikus *Drosophilákban* túltermeltetett p54 C-terminális fél (p54-CTF) az endogén p54-hez képest nagy moláris koncentrációban fejeződött ki, és az állatok kései lárvakorban bekövetkező pusztulását okozta. Gélszűrési kromatográfiával bizonyítottuk, hogy a vWA domén hiányában a p54-CTF nem épült be a 19S regulátor komplexumba, hanem kizárólag extraproteaszómálisan halmozódott fel, így alkalmasnak tartottuk az endogén p54 feltételezett disszociált formájának modellezésére.

A transzgenikus állatok lárváiból affinitáskromatográfia segítségével tisztítottuk a Strep-címkével fuzionált p54-CTF fehérjét és annak kovalensen módosított formáit. Kétdimenziós IEF-SDS-PAGE-t követő tömegspektrometriai elemzéssel igazoltuk, hogy a p54 C-terminálisa *in vivo* ubiquitilálódik az extraproteaszómális tartózkodása folyamán. *In vivo* féléletidős vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a p54-CTF ubiquitilációja nem degradációs jel (nem poliubiquitin-lánc), hanem mono- és/vagy multiubiquitiláció. Minthogy az ubiquitilációhoz lizin

aminosavakra van szükség, megvizsgáltuk a p54 szekvenciáját, és kimutattuk, hogy a magasabbrendű eukarióták p54 ortológjaihoz hasonlóan egy hét lizinből álló lizin-kazetta található a fehérje karboxi-terminális végén. Transzgénikus muslicákban termeltetett lizin-kazetta mentes p54-CTF- $\Delta$ K fehérje affinitásizisztításával igazoltuk, hogy a terminális lizinek szükségesek és elégségesek ahhoz, hogy a p54 fehérje extraproteaszómális tartózkodása folyamán ubiquitilálódjon. Mivel a p54-CTF- $\Delta$ K termelő állatok életképesek voltak, a p54-CTF extraproteaszómális felhalmozódása csak a terminális lizinek permanens ubiquitilálódása miatt okozhatta az állatok pusztulását. Ez pedig azt feltételezi, hogy ha az ubiquitilált p54 darab hosszú ideig és tartósan van jelen az extraproteaszómális térben, valamilyen esszenciális biokémiai folyamatot zavar meg.

7) **A p54-CTF gátolja a poliubiquitin receptorok fejlődésstádium-specifikus szabályozását végző szerin proteázt.**

*In vitro* degradációs kísérletekben igazoltuk, hogy az extraproteaszómálisan felhalmozódott és terminális lizinjein multiubiquitilálódott p54-CTF transzgénikus fehérje transzkripcionálisan gátolta a poliubiquitin receptorok degradációját végző szerin-proteáz kifejeződését. Ennek következtében a receptorokra specifikus szerin-proteáz aktivitás a normálhoz viszonyítva egy korábbi lárvaállapotban szűnt meg, ami pedig a fő poliubiquitin receptorok korai felhalmozódásához és a proteaszóma rendszer idő előtti reaktivációjához vezetett. Ennek következtében az állatok elpusztultak. Közvetett és közvetlen kísérleti megfigyeléseink alapján úgy gondoljuk, hogy a szerin-proteáz rendszer és a p54 posztisztetikusan módosított formái kölcsönösen, de negatívan szabályozzák egymást, melynek lényege az ubiquitin-proteaszóma rendszer aktivitásának finom-hangolása a muslica ontogenezise folyamán.

**8) A p54-CTF gátolja a poliubiquitilált fehérjék proteaszómális degradációját.**

Meglepő módon a p54-CTF transzgénikus fehérje hatásaként, a megnövekedett poliubiquitin receptor koncentráció ellenére, a poliubiquitilált fehérjeszubsztrátok is feldúsultak a korai lárvastádiumokban. Ezt a látszólagos ellentmondást *in vitro* kísérleteinkkel oldottuk fel. Gélszűrési kromatográfiával igazoltuk, hogy az extraproteaszómálisan stabilizálódott p54-CTF három UIM-a révén megkötötte és csapdába ejtette az endogén p54 szubsztátjait, valamint a Dsk2 poliubiquitin receptort. Mivel a p54-CTF nem tud beépülni a proteaszómába, az endogén p54 és Dsk2 szubsztátjai nem jutnak el a proteaszómához és nem bomlanak le a lárvakor végén, ami poliubiquitilált fehérjék felhalmozódásához és az állatok pusztulásához vezet.

**9) A *Drosophila* Dsk2 a p54-en keresztül kötődik a proteaszómához.**

Mivel az extraproteaszómális p54-CTF csapdába ejtette az endogén Dsk2-t (és szubsztátjait), *in vitro* pull-down kísérletekkel megvizsgáltuk, hogy az ismert *Drosophila* poliubiquitin receptorok képesek-e kölcsönhatni egymás szerkezeti elemeivel? Kimutattuk, hogy a Dsk2 N-terminális ubiquitin-szerű doménje (UBL) nagy affinitással kötődik a p54 C-terminálisának harmadik UIM-ához. Ezt követően igazoltuk, hogy a p54 null-mutánsokból (vagy a p54 RNS-interferenciás transzgénikus állatokból) izolált proteaszómához a p54 hiányában nem képes kötődni sem az endogén Dsk2, sem pedig az affinitásoszlophoz kötött rekombináns Dsk2 vagy annak UBL doménje (vad típusú, p54-et tartalmazó proteaszómához kötődnek). Míg a p54 és Dsk2 közötti erős kölcsönhatást *in vivo* genetikai interakciós vizsgálataink is alátámasztották, addig a p54 és Rad23 között csak gyenge fizikai és genetikai kapcsolatot lehetett kimutatni.

*In vitro* és *in vivo* kísérleteink eredményei alapján kijelenthetjük, hogy szemben az élesztő modellel, ahol a poliubiquitin receptorok a proteaszóma Rpn1/Rpn2 felszínéhez kötődnek, *Drosophilában* a Dsk2 extraproteaszómális poliubiquitin receptor a p54 UIM-án keresztül kapcsolódik a 26S proteaszómához.

## ÖSSZEFOGLALÁS

Kimutattuk, hogy a *Drosophila* három fő poliubiquitin receptora a p54 proteaszóma alegység, valamint a Dsk2 és Rad23 extraproteaszómális fehérjék koncentrációja fejlődésszádium-specifikusan szabályozódik. Embrió-, báb- és adultkorban a receptorok nagy mennyiségben vannak jelen a sejtben, ami az ubiquitin-proteaszóma rendszer magas szintű aktivitására utal. Feltételezésünk szerint ezekben a fejlődési állapotokban egy specifikus ubiquitin-ligáz hatására a proteaszóma p54 alegységének konzervált terminális lizinjei ubiquitilálódnak, minek következtében a fehérje konformációváltást szenved és disszociál a proteaszómáról. Az ubiquitilációnak feltehetően szerepe van a p54 C-terminálisának stabilizálásában és citoszolikus proteázokkal szembeni védelmében is. Mivel a p54 disszociációs-asszociációs egyensúlya a reasszociáció irányába tolódik el, extraproteaszómális tartózkodási ideje extrém rövid. Disszociált állapotban UIM1 és UIM2 motívumaival köti meg saját specifikus poliubiquitilált fehérjéit, míg harmadik UIM-ával kölcsönhatásba lép a szubsztráttal töltött Dsk2 ubiquitin-szerű (UBL) doménjével. Az üres Dsk2 UBL szerkezeti elemét saját ubiquitinnel kölcsönható (UBA) doménje nagy hatékonysággal köti (és ezáltal elérhetetlenné teszi). Miután az UBA domén nagyobb affinitással kapcsolódik a poliubiquitin lánchoz, mint az UBL doménhez, a szubsztrát megkötését követően felszabadul a Dsk2 UBL doménje és kölcsönhatásba lép a p54 harmadik UIM-ával. Így a p54 csak és kizárólag a szubsztráttal töltött Dsk2-t képes megköti. Ezt követően a p54 deubiquitilálódik, és dajkafehérjék segítségével visszakötődik a proteaszóma regulátor komplexének felszínére. A visszaépülés folyamán beszállítja saját és a Dsk2 szubsztrátjait a degradációs apparátusnak, amit a szubsztrát lebontása és a Dsk2 disszociációja követ. A p54 ingázásának praktikus előnye, hogy a visszaépülés folyamán két poliubiquitin receptor szubsztrátja egyidejűleg kerül a proteaszómához.

Lárvában, amikor az állat megváltozott környezeti körülmények között él, kevesebb poliubiquitinlált fehérje keletkezik, amit a proteasóma rendszer aktivitásának csökkenése követ. Ennek legegyszerűbb és legolcsóbb módja a poliubiquitin receptorok degradációja. Lárvában aktiválódik egy esszenciális szerin-proteáz, amely szelektíven képes felismerni és lebontani a szabad és proteasómához kötött poliubiquitin receptorok rendezetlen szerkezetű részét, ami a receptorok és a proteasóma rendszer gyors inaktiválódásához vezet. Feltételezéseink szerint lárvakorban, amikor a hipoxiás életmódnak köszönhetően megnő az irreverzibilisen denaturalódott fehérjék mennyisége, aktiválódik egy sor speciális szerin-proteáz, amely a proteasómánál hatékonyabban és gyorsabban képes lebontani a veszélyes termékeket. A lárvakor végén, transzkripció szabályozás eredményeként és egy specifikus inhibitor megjelenésével, gátlódik a szelektív szerin-proteáz aktivitás, minek következtében a poliubiquitin receptorok koncentrációja megnő (hiszen az mRNS-ük változatlan mennyiségben van jelen a sejtekben). A feldúsult p54 ubiquitinlálódik, és feltehetően transzkripcionálisan gátolja a lebontását végző szerin-proteáz további kifejeződését, elősegítve az ubiquitin-proteasóma rendszer gyors reaktivációját.

Habár még nem teljesen ismerjük és értjük ennek a szabályozási folyamatnak a biológiai jelentőségét, úgy gondoljuk, hogy az embrió korban az erős mitotikus aktivitás, a nagyfokú poliubiquitinlált fehérje termelődés, a báb stádiumokban a lárvális struktúrák hisztolízise, valamint az adult állatok reprodukív aktivitásának biztosítása magasabb poliubiquitin receptor koncentrációt igényel, mint a hipoxiás környezetben fejlődő lárva szöveteinek működése.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönet és mély tisztelet illeti tanáromat és témavezetőmet, **Dr. Udvardy Andort** elméleti és gyakorlati tanácsaiért, odafigyeléséért és türelméért. A gondolkodásra és precizításra készítő törekvései esszenciális alapját képezik a mindennapi munkámnak. Köszönöm **Udvardy Katalinnak** a kísérletek előkészítésében nyújtott segítségét. Precizitása és kiterjedt figyelme mindannyiunk munkáját elősegíti. Továbbá sok köszönettel tartozom **Dr. Kiss Petrának**, amiért bevezetett a molekuláris biológia gyakorlati alkalmazásába, és készségesen rendelkezésemre bocsátotta transzgenikus törzseit és eredményeit. Köszönet illeti továbbá **Dr. Szabó Áront** hasznos tanácsaiért, **Dr. Pál Margitot** a muslicagenetikában nyújtott segítségéért, **Dr. Deák Pétert**, amiért lehetővé tette számomra a mikroszkópos munkát genetikai műhelyében, az MTA SZBK Proteomikai Csoportját, különösen **Dr. Medzihradzky F. Katalint**, **Dr. Hunyadi-Gulyás Évát** és **Klement Évát** az ubi quitiláció kimutatásában nyújtott segítségükért. Köszönöm **Dr. Boros Imre Miklós** és **Dr. Maróy Péter** tanszékvezető egyetemi tanároknak, **Dr. Fekete Éva** és **Dr. Szöllősiné Varga Ilona** tanárnőknek az egyetemi és doktorandusz éveim alatt nyújtott támogatásukat, valamint **Dr. Venetianer Pál** tanár úrnak és **Dr. Kiss Antalnak** a doktori értekezésem formai és tartalmi részére vonatkozó javaslataikat.

Végül, de nem utolsó sorban tisztelet illeti **családomat** támogatásukért és felelősségem, **Lipinszki Ugró Tímeát** türelméért, bátorításáért és mindenekelőtt kitartó jelenlétéért.

## KÖZLEMÉNYEK

- ⇒ **Lipinszki, Z.**, Kiss, P., Pal, M., Deak, P., Szabo, A., Hunyadi-Gulyas, E., Klement, E., Medzihradzsky, K. F. and Udvardy, A. (2009) Developmental-stage-specific regulation of the polyubiquitin receptors in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Cell Science*. 122, 3083-3092  
*IF: 6.247*
- ⇒ Kiss, P., Szabo, A., Hunyadi-Gulyas, E., Medzihradzsky, K. F., **Lipinszki, Z.**, Pal, M. and Udvardy, A. (2005) Zn<sup>2+</sup>-induced reversible dissociation of subunit Rpn10/p54 of the *Drosophila* 26 S proteasome. *Biochemical Journal*. 391, 301-310  
*IF=4,224*
- Szabo, A., Pal, M., Deak, P., Kiss, P., Ujfaludi, Z., Pankotai, T., **Lipinszki, Z.** and Udvardy, A. (2007) Molecular characterization of the Rpt1/p48B ATPase subunit of the *Drosophila melanogaster* 26S proteasome. *Molecular Genetics and Genomics*. 278, 17-29  
*IF=2.978*
- Idézetek száma: 9  
Összesített impakt faktor: 13.449
- ⇒ A doktori értekezésben közvetlenül felhasznált közlemények