

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**ÚJ TÍPUSÚ PROTEIN FOSZFATÁZOK VIZSGÁLATA  
*DROSOPHILA* FAJOKBAN**

Ádám Csaba

Témavezető: Dr. Dombrádi Viktor



DEBRECENI EGYETEM  
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2011

## Új típusú protein foszfatázok vizsgálata *Drosophila* fajokban

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében  
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Ádám Csaba okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája  
(Jelátviteli folyamatok sejt-és molekuláris biológiája programja) keretében

Témavezető: Dr. Dombrádi Viktor

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr. Csernoch László, az MTA doktora  
tagok: Dr. Buday László, az MTA doktora  
Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: 2011. október 12.

Az értekezés bírálói:

Dr. Barta Endre, Ph.D.  
Dr. Török Tibor, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. Csernoch László, az MTA doktora  
tagok: Dr. Buday László, az MTA doktora  
Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora  
Dr. Barta Endre, Ph.D.  
Dr. Török Tibor, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja: 2011. október 12. 13:00

DEOEC I. sz. Belgyógyászati Klinika tanterme

# 1. BEVEZETÉS

## 1.1 Fehérje foszforiláció és defoszforiláció

A fehérjék reverzibilis foszforilációja az összes eukarióta szervezetekben működő gyakori poszttranszlációs módosítás. A reakciót katalizáló enzimek a protein kinázok, a fehérjék szerin, treonin vagy tirozin oldalláncaihoz kapcsolják az ATP vagy ritkábban a GTP gamma-foszfátját. Ennek következtében megváltozik a fehérjék konformációja, ami befolyásolhatja funkciójukat is. Ez a poszttranszlációs módosítás azonban csak akkor képes megfelelő szabályozó szerepet betölteni, ha lehetőség nyílik a kinázok által beépített foszfátcsoport lehasítására. A protein kinázok mellett tehát szükség van a foszfátcsoport hidrolitikus eltávolítására képes enzimekre, a protein foszfatázokra is.

## 1.2 A protein foszfatázok evolúciója

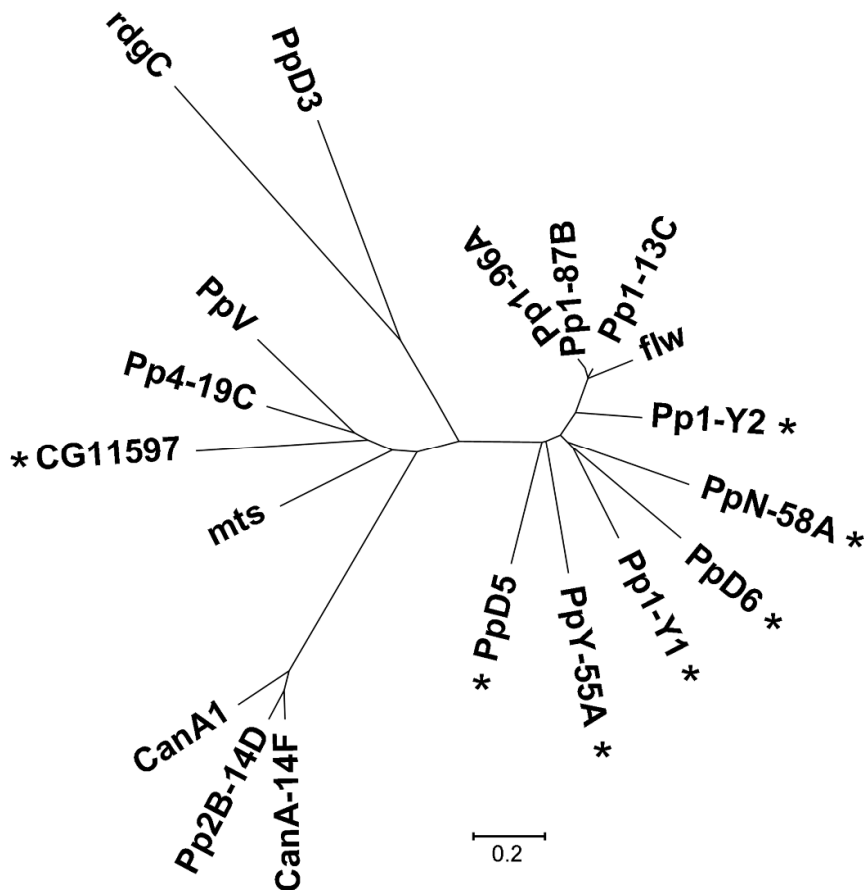
A két kompetáló enzimes család jelentősége egyenértékű a foszforiláció-defoszforiláció alapuló szabályozási folyamatokban, habár a foszfatázok csak a kinázok után alakulhattak ki az alábbi két megfontolás alapján: (1) A reakció mechanizmusa szerint a kinázoknak kell elsőként módosítani a polipeptidek oldalláncait. (2) A foszfatázoknak a kinázok után kellett kialakulniuk, mivel a foszfoprotein szubsztrát nélkül nem lett volna hasznos funkciójuk. Kialakulásuk a már létező hidrolitikus enzimekből történhetett, amelyek katalitikus zsebei fokozatosan alkalmazkodtak az új szubsztráthoz és egyre specifikusabbá váltak.

## 1.3 A PPP enzimes család

Az úgynevezett foszfoprotein foszfatáz (PPP) enzimek a bakteriális diadenozin-tetrafoszfatázokból fejlődtek ki. A PPP csoportok fő jellemvonása, hogy két fémiot tartalmaznak az aktív centrumukban, amelyek segítségével képesek a foszfátcsoportot hidrolizálni a fehérjék szerin vagy treonin oldalláncairól. A PPP alcsoportba tartoznak a Zn/Fe tartalmú enzimek, a PP1, PP2A és PP2B (új nevezéktan alapján PPP1, PPP2, PPP3) foszfatázok. A PPP csoportba sorolhatók azok az új típusú nevezett protein foszfatázok is, amelyek szerkezetük és tulajdonságaik alapján átmenetet mutatnak az említett három alcsoport között. Az új típusú enzimek kimutatása klasszikus enzimaktivitási mérésekkel nem volt lehetséges, azonosításuk csak a molekuláris klónozás technikájával vált lehetővé. Ezek az új foszfatázok az állat- és növényvilág képviselőiben, illetve számos gombafajban is előfordulnak, ahol különböző életfolyamatok szabályozásában vesznek részt.

#### 1.4 A *D. melanogaster* PPP enzimes család

A *Drosophila melanogaster* a molekuláris genetika egy nagyon jól jellemzett modellszervezete. A Flybase adatbázisban való kutatás eredményeképp 19 PPP katalitikus alegységet kódoló gént azonosítottunk ebben az organizmusban (1. ábra). A *D. melanogaster* PPP enzimeit az elsődleges szerkezetük alapján 5 alcsaládra oszthatjuk (vö. 1. táblázat).



1. ábra. *D. melanogaster* foszfoprotein foszfatáz katalitikus alegységek családfája  
A skála 20% aminosav cserét jelöl, \* *Drosophila*-specifikus új típusú foszfatáz

A klasszikus és molekuláris genetikai kutatások arra utalnak, hogy a PPP gének fontos szabályozó szerepet játszanak az ecetmuslicában:

(1) A PPP1 alcsaládkhoz tartozik a *Pp1-13C*, *Pp1-87B*, *Pp1-96A* és a *Pp1-9C* enzim. Az utóbbi gén hiánya a *flapwing* (*flw*) fenotípust okozza, ami a rendellenes szárnyizomfejlődés eredménye. A *Pp1-87B* gén mutációja mitotikus blokkot okoz az anafázisban. A *Pp1-96A* inaktiválása nem eredményezett fenotípusbeli változást. A *Pp1-13C* valószínűleg redundáns gének tekinthető. A PPP1 alcsaládkhoz tartozik továbbá még az új típusúnak tekinthető *PpY-55A*, *PpN-58A*, *PpD5*, *PpD6*, *Pp1-Y1* és a *Pp1-Y2* protein foszfatáz

is. Közülük csak a *PpY-55A* és a *PpN-58A* foszfatázt jellemezték jól irodalmilag, és úgy találták, hogy a hím egyedek heréjében fejeződnek ki.

(2) A kalcineurin/Pp2B/PPP3 kalciummal szabályozott foszfatázokat 3 közeli rokon izoformájuk alapján mutatom be. A *CanA1* egy nagyméretű, 12 intront tartalmazó gén, míg a *Pp2B-14D* és a *CanA-14F* gén nem tartalmaz intront a kódoló régiójában. A *Pp2B-14D* szerepét a veleszületett immunitásban és a nőstények fertilitásában igazolták. A *CanA-14F* génnek nincs ilyen szerepe.

(3) *D. melanogaster*-ben 4 darab 2-es típusú foszfatáz található. Az mts gén hiányában abnormális, csillagszerű mikrotubulus elrendeződés figyelhető meg a sejtekben. A *Pp4-19C* gént először PPX néven írták le, a mikrotubulus szerveződésben való szerepét pedig a „centrosome minus microtubules” (*cmm*) mutáns elemzésével igazolták. A *PpV/Pp6* fehérje felhalmozódása az embriókban a zigotikus transzkripcióban és cellularizációban való szerepére utal. A család új tagja az eredetileg *Pp4-like*-nak nevezett *CG11597*, amely tesztiszben kifejeződő új típusú foszfatáznak tekinthető; a funkcióját eddig még nem sikerült meghatározni.

(4) A PPP5 csoportba tartozó *PpD3* neve azonos a felfedezéséhez vezető PCR termék elnevezésével. A gén az emlős PPP5/Pp5 ortológja. Habár a gén szabályozása és funkciója emlősökben jól jellemzett, *Drosophila*-ban csak keveset tudunk róla.

(5) A PPP7 csoportba tartozó *rdgC*-t olyan protein foszfatázként azonosították, amely képes megvédeni a retinát a fény-aktiválta degenerációtól.

### 1.5 A *D. melanogaster* PPP család eredete

A *D. melanogaster* PPP gének nagy száma, és az a tény hogy a gének egy része nem tartalmaz intront a kódoló régiójában, arra utal, hogy az evolúció során az enzimes család jelentős átalakuláson esett át. A legutóbbi becslések szerint 1 millió évenként 17 gén duplikálódik a *Drosophilidae* családban, amelyből 5-11 duplikáció a *D. melanogaster* alcsoportban történik. Az evolúció során a gének többsége tandem vagy diszperz duplikációval keletkezik, ezen kívül retrotranszpozíciók, kimérés génképződések és a nemkódoló szekvenciákból történő új génképződések is hozzájárulnak a génkészlet kibővítéséhez. Azonban a gének számát az adott fajban a deléciók vagy degradációk is befolyásolják. A gének szerzése és elvesztése közötti dinamikus egyensúly a genom evolúciójának jellegzetes ismertetőjele. A 12 *Drosophila* faj (*D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. sechellia*, *D. yakuba*, *D. erecta*, *D. ananassae*, *D. pseudoobscura*, *D. persimilis*, *D. willistoni*, *D. mojavensis*, *D. virilis*, *D. grimshawi*) genomszekvenciájának közzététele

lehetőséget kínált számunkra a PPP géncsalád összehasonlító elemzéséhez. A *Drosophilidae* család PPP nukleotid és fehérje szekvenciáinak összehasonlításával megpróbáltuk feltárni ennek a viszonylag kis, de erősen konzervatív géncsaládnak az evolúcióját.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Az új típusú PPP gének expressziójának irodalmi jellemzése *D. melanogaster*-ben nem volt teljes, nagyrészt csak a kevésbé megbízható microarray adatok álltak a rendelkezésünkre, ami alapján hím-specifikus expressziójukat feltételezhettük. Továbbá mind az új típusú, mind a klasszikusnak mondható PPP gének evolúciójáról, eredetéről szintén kevés információnk volt.

Az új típusú PPP gének funkciójának és evolúciójának vizsgálata érdekében a következő célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

### 1) Az új típusú PPP gének vizsgálata *D. melanogaster* -ben

- az új típusú PPP gének expressziójának vizsgálata a *D. melanogaster* életciklusa során
- az új típusú PPP gének expressziójának vizsgálata *D. melanogaster* hím egyedek tesztiszében
- az Y kromoszóma szerepének tanulmányozása a hím-specifikusan expresszáló gének esetében
- a *PpY-55A* és a *PpN58A* gén funkciójának vizsgálata géncsendesítés módszerével

### 2) A PPP gének evolúciójának vizsgálata 12 *Drosophila* fajban

- a *Drosophila* és más rovarfajok PPP készletének összehasonlítása
- a szekvencia adatbázisok adatainak kiegészítése és megerősítése
- új PPP gének keresése a fajok szekvencia adatbázisainak felhasználásával
- az új típusú PPP gének expressziójának vizsgálata különböző rovarfajokban
- a foszfatázok evolúcióját érintő genomátrendeződések tanulmányozása
- a PPP gének genomi környezethez való adaptációjának vizsgálata

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1 Anyagok

A kísérletekben felhasznált vegyszerek többségét a *Sigma-Aldrich* cégtől szereztük be. Az oligonukleotid primereket az Integrated DNA Technologies Incorporation-tól szereztük be. Az *Escherichia coli* DH5a törzset a Novagen-től vásároltuk. A felhasznált *Drosophila* törzsek nagy részét a Bloomington *Drosophila* Stock Centerből szereztük be.

#### 3.2 Módszerek

##### *Klasszikus genetikai módszerek*

A *Drosophila* törzseket a szokásos laboratóriumi körülmények között tenyésztettük, és jól látható genetikai markerek alapján szelektáltuk.

Az X/0 hímek és XX/Y nőtények előállításához kapcsolt X és Y kromoszómát és két kapcsolt X kromoszómát tartalmazó egyedeket használtam fel.

Az RNS interferenciához szükséges *PpY-55A* és *PpN58A* transzgén egyedek előállítása Sinka Rozália és Deák Péter (MTA SZBK Biokémiai Intézet, Szeged) segítségével történt. A transzgén egyedeket spermatocyt-specifikus driver törzzsel hajtottuk meg.

##### *Molekuláris biológiai módszerek*

A plazmid DNS-t QIAprep Spin Miniprep plazmid izoláló kit segítségével izoláltuk a cég leírása szerint. A genomi DNS-t kifejlett egyedekből tisztítottuk.

A teljes RNS-t kifejlett egyedekből, illetve hím egyedek testiszéből Trizol reagenssel tisztítottuk. A teljes RNS mintában fennmaradó DNS-t DNáz kezeléssel távolítottuk el. A cDNS mintát teljes RNS-ből reverz transzkriptázzal és oligo(dT)-vel állítottuk elő.

A különböző méretű gDNS és cDNS génszakaszokat *Taq* polimeráz enzim felhasználásával szaporítottuk fel. A PCR termékeket közvetlen szekvenáláshoz Microcon YM-100 oszlop segítségével tisztítottuk.

A *PpY-55A* és a *PpN58A* gént második generációs, RNS interferenciára alkalmas pWIZ vektorba klónoztuk. A két gén egy-egy szakaszát két példányban klónoztuk a vektorba, úgy, hogy 5'-végükkel egymás felé nézve ellentétes orientációban legyenek. Az így előállított vektor konstrukciókat ezt követően *E. coli* DH5a törzsbe transzformáltuk.

Az *in situ* hibridizációt kifejlett *D. melanogaster* Oregon R hímek heréjén végeztük el. A gén- specifikus PCR terméket *Drosophila* gDNS-ből sokszoroztuk fel T7 (szensz

próbához) vagy T3 (antiszensz próbához) promóterrel kapcsolt primerekkel. A jelöléshez a DIG RNA Labeling Mix-et használtuk fel. A szensz próbát negatív kontrollként alkalmaztuk.

A PCR termékek és a klónok szekvenálása Gödöllőn, a BIOMI Kft-nél, az adott génhez tartozó specifikus primer vagy primerpár felhasználásával történt.

### **Bioinformatikai elemzések**

A PPP szekvenciák adatait a FlyBase, az UCSC Genome Bioinformatics és a NCBI adatbázisokból gyűjtöttük össze. Először a 19 ismert *Drosophila* PPP fehérje szekvenciát használtuk a homológ szekvenciák keresésére. Az elsődleges keresési (Blast) eredményeket használtuk a második keresésnél. Az új hipotetikus fehérjeszekvenciák doménszerkezetének meghatározását SMART program segítségével végeztük.

Az adatbázis egyértelmű hibáit (kereteltolódások, korai stopkodonok, inzerciók és deléciók), melyek rendellenes fehérjét eredményeztek, és nem voltak összeegyeztethetőek a közeli rokon PPP enzimek konzervált elsődleges szerkezetével, manuálisan, a pDRAW32 program segítségével javítottuk ki. Amennyiben egy PPP szekvencia hiányzott az adatbázisból, akkor PCR reakció és szekvenálás segítségével próbáltuk azonosítani, amihez a legközelebbi rokon fajok homológ génszakaszai alapján terveztük meg a primereket.

A fehérjeszekvenciákat a pDRAW32, ClustalW és a BioEdit programokkal hasonlítottuk össze. A filogenetikai és molekuláris evolúciós elemzést a MEGA 4.0 szoftver segítségével készítettük el. Az ortológ kapcsolatokat a családfák topológiája alapján valószínűsítettük és mikroszinténia elemzéssel erősítettük meg. A PPP1 alcsaládot multidimenzionális ábrázolási módszerrel is elemeztük. A klasszikus és az új típusú foszfatázok evolúciójának tanulmányozásához az R, dn és ds értékeit a MEGA 4.0 szoftver segítségével számoltuk ki.

A gének Müller elemeken való lokalizációját a Flybase adatbázis alapján adtuk meg. A genomi átrendeződéseket *dot plot*-tal vizsgáltuk.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. Az új típusú foszfatáz gének expressziós mintázata *D. melanogaster*-ben

A *D. melanogaster* intronmentes új típusú PPP retrogénjei (*PpD5*, *PpD6*, *Pp1-Y1*, *Pp1-Y2*, *PpY-55A*, *PpN58A*) a *CG11597* kivételével a microarray adatok alapján hím-specifikus expressziót mutatnak. Közülük a tesztisz-specifikusan kifejeződő *PpY-55A* és *PpN58A* gént már jól jellemezték, így figyelmünk a többi, feltehetőleg hím-specifikusan expresszáldó foszfatáz vizsgálata felé fordult. Munkánk során először RT-PCR módszerrel megvizsgáltuk a *PpD5*, *PpD6*, *Pp1-Y1*, *Pp1-Y2* és *CG11597* gén expresszióját a *D. melanogaster* életciklusa során. A *CG11597* gén különböző mértékben minden fejlődési stádiumban expresszáldik. Ezzel ellentétben a *PpD5*, *PpD6*, *Pp1-Y1* és *Pp1-Y2* gén csak kifejlett hím egyedekben fejeződik ki. Mivel a *CG11597* kivételével a vizsgált PPP gének hím-specifikusan íródtak át, megvizsgáltuk a tesztiszben történő expressziójukat.

A kísérletek alapján megállapítottuk, hogy a vizsgált gének tesztisz-specifikus expressziót mutatnak, mivel a test más részeiben nem, csak a tesztiszben fejeződnek ki. Ezt követően megvizsgáltuk a gének tesztiszben belüli expressziójának helyét is. Ennek érdekében *in situ* hibridizáció technikát alkalmaztunk, amelyet digoxigeninnel jelölt antiszensz RNS próbával végeztünk el. Kontrollként az irodalmilag már jellemzett *PpY-55A* gént használtuk, amely a here disztális régiójában (elsődleges spermaticitákban, cisztasejtek sejtmagjában) és a homorú oldalán (kerek spermaticitákban) fejeződik ki. A *PpD5* és a *Pp1-Y1* próba is hasonló helyeken mutatott festődést, ami a *PpY-55A*-hoz hasonló expressziós lokalizációra utal. A *PpD6* gén esetében pontszerű expressziós mintázat volt megfigyelhető, ami a hosszabbodó spermaticida köteg disztális részének felel meg és a gén posztmeiotikus expressziójára utal.

A gének hím-specifikus expressziójának megerősítése érdekében Y kromoszóma nélküli X/O steril hímeket és Y kromoszómát tartalmazó XX/Y nőtényeket állítottunk elő. RT-PCR módszerrel ezekben az egyedekben is megvizsgáltuk a gének kifejeződését. Az autoszómáisan lokalizált *PpD5*, *PpD6*, *PpY-55A* és *PpN58A* gének termékei megtalálhatók voltak X/O hímelekben, az Y kromoszómán lokalizált *Pp1-Y1* és *Pp1-Y2* géneké pedig értelemszerűen nem. Az XX/Y nőtényekben egyetlen vizsgált foszfatáz sem fejeződött ki. Kísérleteinkkel tehát megerősítettük, hogy az általunk vizsgált gének valóban csak hím egyedekben fejeződnek ki.

#### 4.2 A *PpY-55A* és a *PpN58A* gének funkciójának vizsgálata *D. melanogaster*-ben

Irodalmi adatokból ismert, hogy mindkét foszfatáz csak a hímek heréjében fejeződik ki. Mivel mindezidáig nem sikerült a klasszikus genetikai módszerekkel a génekre nézve mutánsokat előállítani, ezért e gének funkcióját RNS interferencia (RNSi) módszerével kívántuk meghatározni. Ennek érdekében RNS interferenciával történő géncsendesítésre alkalmas törzseket hoztunk létre. Mivel a gének tesztiszben, a *PpY-55A* pedig igazoltan cisztasejteken kívül spermaticitákban is kifejeződik, az RNSi törzseket spermaticita-specifikus driver törzsszel kereszteztük és homozigóta törzseket hoztunk létre belőlük. Az RNS interferencia hatékonyságát RT-PCR módszerrel igazoltuk. A vad típusú egyedekhez képest nem tapasztaltunk fenotípusbeli különbséget, ami egyrészt azzal magyarázható, hogy a hasonló szerkezettel rendelkező új típusú PPP gének átfedő funkciókkal rendelkezhetnek, amelyek így képesek egymás hiányát ellensúlyozni. A másik lehetséges magyarázat, hogy a géncsendesítés nem szüntette meg teljesen a gén kifejeződését és a megmaradt géntermék is elegendő lehetett a vad típus fenntartásához. Továbbá fontos megemlítenem, hogy a felhasznált pWIZ vektor nem alkalmas csírvonalbeli kifejeztetésre, így a rendszerünk csak a szomatikus eredetű tesztisz sejteken működhetett.

#### 4.3 A rovarok PPP készlete

A *Drosophila* PPP gének, és ezen belül az új típusú foszfatázok eredete, kialakulása még kevésbé tanulmányozott területe volt az irodalomnak. A PPP gének katalitikus alegységeinek evolúciójának vizsgálatához a *D. melanogaster*-t használtuk összehasonlítási alapként. Első lépésként adatbázis kutatással megállapítottuk a minimális, 7-8 enzimet magában foglaló alapvető PPP készletet (vö. 1. táblázat), amely jelen van a szekvenált rovarfajok többségében (*Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae*, *Tribolium castaneum*, *Apis mellifera*, *Nasonia vitripennis*, *Acyrtosiphon pisum*, *Pediculus humanus corporis*). Úgy találtuk, hogy a gének többsége intront tartalmaz a kódoló régiójában, kivéve a *Pp2B* gént, ami arra utal, hogy retropozícióval keletkezett, még a *Drosophila* fajok kialakulása előtt.

A következő lépésben megvizsgáltuk a *D. melanogaster*-ben azonosított gének előfordulását a további 11 szekvenált, a *Drosophilidae* családhoz tartozó *Drosophila* fajban is és meghatároztuk azok Müller elemeken (a *Drosophila* fajok genomjának egymásnak megfeleltethető szakaszain) való lokalizációját is (1. táblázat). Úgy találtuk, hogy néhány kivételtől eltekintve valamennyi PPP gén megtalálható a *Drosophilidae* család tagjaiban, ahol az összes PPP-k száma 18 és 22 között változik fajonként. A 8 közös rovar foszfatáz 7 jól

elkülönült csoportra oszlik, amely a fehérjék konzervatív szerkezetére és funkciójára utal. A rovarfajok foszfatázai alcsoportokat képeznek, és jól elkülönülnek a *Drosophila* fehérjéktől, ami a közös eredetüket és független evolúcióval történő keletkezésüket támasztja alá.

#### 4.4 A *Drosophilidae* család PPP génkészlete

A foszfatáz készlet a rovarfajok minimális PPP készletéhez képest a *Drosophilidae* család tagjaiban nem kevesebb, mint 15 dinamikusan változó, új taggal bővült (1. táblázat, 2. ábra).

1. táblázat. A PPP gének lokalizációja a 12 *Drosophila* faj Müller elemein

Osztályozás	Gén név, szinonima <sup>a</sup> /Fajok <sup>b</sup>	Dmel	Dsim	Dsec	Dyak	Dere	Dana	Dpse	Dper	Dwil	Dmoj	Dvir	Dgri
1-es típus vagy PPP1	<b><i>Pp1α-96A, Pp1-96A</i></b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>
	<i>Pp1-87B</i>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>
	<i>Pp1-13C</i>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>
	<b><i>flw, Pp1-9C</i></b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
	<i>Pp1-Y1</i>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>		<u>C</u>	<u>C</u>
	<i>Pp1-Y2</i>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>
	<i>PpD5</i>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>		<u>C</u>	<u>C</u>	
	<i>PpD5+</i>							<b>D</b>	<b>D</b>		<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>
	<i>PpD6</i>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>Y</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>
	<i>PpD6+</i>							<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>		<u>C</u>	
	<i>PpN58A</i>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>
	<i>PpY-55A</i>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	
	<i>PpY+</i>							<u>A</u>	<u>A</u>				
Kalcineurin vagy Pp2B vagy PPP3	<b><i>CanA1</i></b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>
	<i>Pp2B-14D</i>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>
	<i>CanA-14F</i>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>
2-es típus vagy PPP2-4-6	<b><i>mts, Pp2A</i></b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>B</b>
	<b><i>Pp4-19C</i></b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
	<i>Pp4+</i>							<b>B</b>	<b>B</b>				
	<b><i>PpV, Pp6</i></b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
	<i>Pp6+</i>										<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>
	<i>CG11597</i>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>D</u>						
PPP5	<b><i>PpD3, Pp5</i></b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>
PPP7	<b><i>rdgC, Pp7</i></b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>D</b>
PPP	Teljes szám	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>22</b>	<b>22</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>21</b>	<b>18</b>

<sup>a</sup>Vastag szedéssel emeltük ki azokat a géneket, melyek a legtöbb rovarban megtalálhatóak.

<sup>b</sup>A fajnevek rövidítése a következő: Dmel: *D. melanogaster*, Dsim: *D. simulans*, Dsec: *D. sechellia*, Dyak: *D. yakuba*, Dere: *D. erecta*, Dana: *D. ananassae*, Dpse: *D. pseudoobscura*, Dper: *D. persimilis*, Dwil: *D. willistoni*, Dmoj: *D. mojavensis*, Dvir: *D. virilis*, Dgri: *D. grimshawi*.

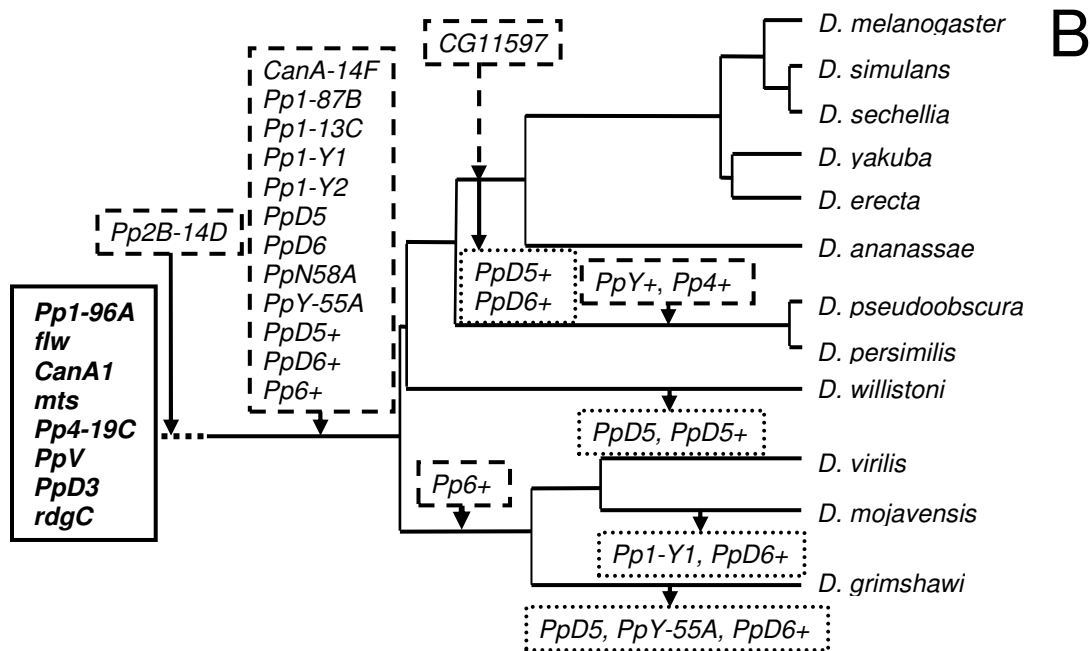
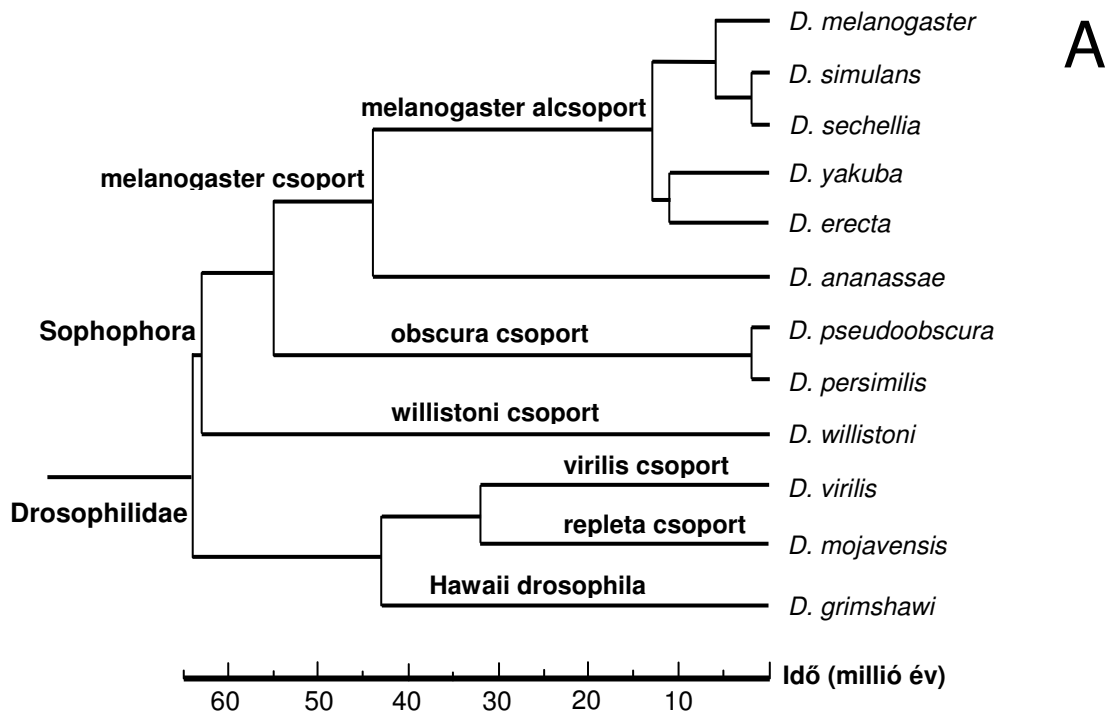
Az intronmentes gének lokalizációját aláhúzott dőlt betűvel jelöltük.

Az üresen hagyott helyek a hiányzó géneket jelöli.

A génduplikációk a génkészlet kibővítésének leghatékonyabb eszközei. Az eredményeink is ezt a feltevést támasztják alá a *Pp2B-14D* és a *CanA-14F* esetében, melyek intronmentes leszármazottai az ősi *CanA1* génnek az összes *Drosophila* fajban. A 8 rovar és a 12 *Drosophila* faj foszfatázainak összehasonlítása alapján feltételezhetjük, hogy a *Pp1-96A* gén ősi, intront tartalmazó alakjából származnak az 1-es típusú foszfatázok. A *Pp1-87B* közvetlenül a *Pp1-96A* génből alakult ki retrotranszpozícióval. A klasszikus foszfatáz gének duplikációján kívül a PPP készlet több új retrogén megjelenésével is bővült (1. táblázat, 2. ábra). Az eredetileg *D. melanogaster*-ben felfedezett új, 1-es típusú foszfatázok (*Pp1-Y1*, *Pp1-Y2*, *PpD5*, *PpD6*, *PpN58A*, *PpY-55A*) jelen vannak mind a 12 *Drosophila* fajban, de hiányoznak más rovarfajokból. Mivel nem találtuk meg az ortológjaikat más élő szervezetben, így ezeket *Drosophila*-specifikus foszfatázoknak nevezhetjük.

A retrotranszpozíciók olyan új PPP enzimeket is eredményeztek (*PpD5+*, *PpD6+*, *PpY+*, *Pp4+*, *Pp6+*), amelyek nincsenek meg *D. melanogaster*-ben (1. táblázat, 2. ábra). Az új gének más kromoszómális lokalizációba épültek be, az ősből pedig megmaradt az eredeti pozíciójában. A szekvencia analízis alapján sikerült megállapítanunk, hogy a *PpD5+* és a *PpD6+* gén a *PpD5* és *PpD6* paralógjaiból keletkezett. A *PpY+* és *Pp4+* retrogéneket az *obscura* csoport két közeli rokon fájában, a *D. pseudoobscura*-ban és a *D. persimilis*-ben azonosítottuk. A *PpY-55A* és *PpY+* szekvenciák közötti hasonlóság és a Müller A elem való közeli elhelyezkedésük azt sugallja, hogy a *PpY+* a *PpY-55A*-ból keletkezett replikatív transzpozícióval. Az előző esethez hasonlóan, a *Pp4-19C* és a *Pp4+* génszekvenciák elemzése feltárta, hogy az intront tartalmazó *Pp4-19C* gén retrotranszpozíciójával keletkezett az intronmentes *Pp4+* gén.

Habár az új PPP gének teljes hosszúságú fehérjét kódolnak, amely tartalmazza a foszfatáz aktivitásához szükséges kritikus szakaszokat, kísérletek nélkül nehéz volt megjósolni, hogy átíródnak vagy inkább inaktív pszeudogénekké degradálódnak. Annak érdekében, hogy erről meggyőződjünk, megvizsgáltuk a már ismert új típusú és az általunk felfedezett PPP gének illetve paralógjaik expresszióját a *Drosophila* fajok evolúciója során. Ehhez 4 egymástól távoli rokon fajt használtunk fel. A *D. ananassae*-t a melanogaster csoportból, a *D. pseudoobscura*-t az *obscura* csoportból, a *D. willistoni*-t a willistoni csoportból, a *D. virilis*-t pedig a virilis csoportból választottuk ki. Kísérleteink során kimutattuk, hogy a vizsgált PPP gének funkcionálisan aktív retrogének, és nagy részük hím-specifikusan fejeződik ki a vizsgált fajokban. Kivételt a *CG11597* gén képez, amely mindkét nemből kifejeződik.



## 2. ábra. A PPP gének evolúciója a Drosophilidae családban

Az ábra A részén a 12 *Drosophila* faj evolúciója látható. A fő alfajokat, csoportokat és alcsoportokat megjelöltük.

Az ábra B részén a PPP gének evolúciója látható. A rovarok alap PPP készlete fekete keretézéssel van ellátva. Az újonnan keletkezett géneket szaggatott vonallal, az elveszített géneket pedig pontozott vonallal keretítettük be. A szaggatott vonal azt jelöli, hogy a Pp2B-14D gén a *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* és *Anopheles gambiae* rovarfajokban keletkezett.

#### 4.5 A hím-specifikus PPP gének gyors evolúciója *Drosophila* fajokban

Irodalomból ismert, hogy a hím-specifikus funkcióval rendelkező géneknek gyorsabb az evolúciója (magasabb a nem-szinonim és a szinonim szubsztitúciók aránya), mint a nem specializáltaknak. Szerettünk volna meggyőződni róla, hogy az általunk tanulmányozott hím-specifikusan kifejeződő gének is követik-e ezt a szabályt. Ennek érdekében elemeztük a 12 vizsgált *Drosophila* faj klasszikus és a nagyrészt hím-specifikus expressziót mutató új típusú protein foszfatázainak katalitikus régióit kódoló nukleotid szekvenciákat. Az elemzés során meghatároztuk a teljes tranzíció/transzverzió arányt (R), a szinonim (ds) és a nem-szinonim (dn) szubsztitúciók számát, illetve az előbbi két adatból a dn/ds arányt is. Az eredményeink szerint az új típusú hím-specifikusan kifejeződő foszfatázok szignifikánsan magasabb dn/ds szubsztitúciós arányokat mutatnak a nem specifikus foszfatázokhoz képest, ami összhangban van a hím-specifikus gének gyorsított evolúciójának elméletével. Eredményeink megerősítik továbbá az „out of testis” elméletet, amely szerint a régebbi PPP retrogének különböző expressziós mintázattal és specializált funkciókkal rendelkeznek, míg a legújabb funkcionáló PPP retrogének hím-specifikusak.

#### 4.6 A PPP gének számának és lokalizációjának változásai

A PPP gének keletkezése mellett a gének elvesztése és a kromoszómális lokalizációbeli, illetve génszerkezeti változások szintén hozzájárultak a PPP család evolúciójához a *Drosophilidae* családban. A hiányzó gének egy részét valószínűleg a random szekvenálási stratégia hibája miatt nem találtuk meg az adatbázisban. Ennek a kiküszöbölése érdekében PCR technikát használtunk a hiányzó gének sokszorozására és azonosítására (1. táblázat). A génmozgások nyomon követéséhez összehasonlítási alapként a *D. melanogaster* PPP gének Müller elemeken való lokalizációját használtuk. Az adatok alapján a PPP gének jól konzervált hellyel és irányultsággal rendelkeznek a melanogaster alcsoport tagjaiban. Másrészt pedig sok PPP gén, elsősorban az 1-es típusúak, gyakran változtatják a helyzetüket (1. táblázat). A génátrendeződések PPP gének evolúciójában betöltött szerepét a következő 3 példán keresztül mutatom be. (1) A *PpY-55A* gén egy intront tartalmazó ősből alakult ki, ami a repleta, virilis és willistoni csoportok tagjaiban is megőrződött. Az intron tartalmú *PpY-55A* eltűnt a *D. grimshawi* fajból. (2) A *D. pseudoobscura* és *D. persimilis* *PpD5+* génje egy egyedi 60 bp-os intront tartalmaz a kódoló régióban. A gén eltűnt a melanogaster és willistoni csoportok tagjaiból, viszont az intronmentes változata kimutatható az összes ősi *Drosophila* alfajban. (3) A *D. virilis* fajban található géncsoportban (*PpD6*, *PpD6+*, *Pp1-Y1*, *Pp1-Y2*) a gének ugyanabban az orientációban, egymás után találhatóak. Ez a géncsoport a melanogaster

csoportban felbomlott. A *PpD6+* a csoport összes tagjából eltűnt. *D. ananassae*-ben pedig a csoport egyik fele (*Pp1-Y2*, *PpD6*) az Y kromoszómába épült be. A melanogaster alcsoport közös ősében a *PpD6* a B elemre vándorolt, míg a *Pp1-Y1* és a *Pp1-Y2* az Y kromoszóma heterokromatikus régiójába került (1. táblázat).

#### 4.7 A PPP gének genomi környezethez való adaptációja

Korábban már leírták, hogy a heterokromatikus környezetben tartózkodó géneknek alacsonyabb a G-C tartalma, mint paralógjaiknak az eukromatikus régiókban. A génadaptációs elméletet továbbfejlesztve megvizsgáltuk, hogy a PPP gének autoszómális kromoszómák és a heterokromatinban gazdag Y kromoszóma közötti mozgása hatással van-e a bázisösszetételükre. Eredményeink szerint a PPP gének átlagos G-C tartalma 50% és 60% között változik, kivéve a *D. willistoni*-t, amely alacsonyabb arányban tartalmazza ezeket a nukleotidokat. A *D. willistoni* esetében megfigyelt alacsonyabb G-C tartalom azzal magyarázható, hogy bizonyos aminosavak kodonjaiban a T-t részesíti előnyben a C-vel szemben. Először megvizsgáltuk a *PpD6*, *PpD6+*, *Pp1-Y1*, *Pp1-Y2* géncsoport G-C tartalmának változását is az átrendeződéseik során. Az elvárásoknak megfelelően a foszfatáz csoporttagok G-C tartalma az átlaghoz közelít, ha eukromatikus környezetben találhatóak, viszont az arány szignifikánsan csökken, amikor az Y kromoszómára kerülnek. A *Drosophila* fajokban található összes, Y kromoszóma és más kromoszómák között áthelyeződő gének G-C tartalmát is összehasonlítottuk. Megállapítottuk, hogy más gének esetében is megfigyelhető a G-C tartalom csökkenése, amikor azok az Y kromoszómára helyeződnek át.

#### 4.8 Következtetések

Az eddigieket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a viszonylag kis PPP család az evolúció számos molekuláris eseményét tükrözi. A munkánk jól szemlélteti, hogy a retrotranszpozíciók, tandem duplikációk, deléciók és áthelyeződések állandóan módosítják a gyümölcslegyek PPP repertoárját. Ebből a szempontból a *Drosophilidae* család egy különlegesen organizmus, mivel az állatvilág egyik legnagyobb PPP készletét halmazta fel. A gének számát, szerkezetét, orientációját és kromoszómális lokalizációját érintő dinamikus átalakulások hozzájárultak a *Drosophilidae* család genetikai változatosságához.

## 5. ÖSSZEFOGLALÁS

A protein foszforiláció és defoszforiláció a szabályozási folyamatok fontos elemei az összes eukarióta szervezetben. Az úgynevezett foszfoprotein foszfatázok (PPP) csoportja a fehérjék Ser és Thr oldalláncáról távolítja el a foszfátcsoportot. A PPP család biokémiai módszerekkel azonosított klasszikus tagokat és olyan új típusú foszfatázokat is magában foglal, amelyek felfedezése molekuláris biológiai vagy genetikai módszerekkel történt.

A *Drosophila melanogaster* genomjában 19 PPP katalitikus alegységet kódoló gént azonosítottam. Az új típusú foszfatázok közül hét *Drosophila*-specifikusnak bizonyult. A nemrég kialakult *CG11597* a *D. melanogaster* minden fejlődési stádiumában kifejeződött. Ezzel ellentétben a *PpD5*, *PpD6*, *Pp1-Y1* és *Pp1-Y2* csak bábokban és a kifejlett egyedek tesztiszében íródott át, hasonlóan a korábban már leírt *PpY-55A* és *PpN58A* génekhez. A *PpD5*, *Pp1-Y1* és a *PpY-55A* mRNS-ét a fejlődő cisztasejteknél, míg a *PpD6* transzkriptumát a hosszabbodó spermatidák disztális végén azonosítottuk *in situ* hibridizációval. Az utóbbi lokalizációja alapján a *PpD6* az egyike lehet a *D. melanogaster* kevés posztmeiotikusan átíródó génjeinek.

A 12 *Drosophila* faj genomszekvenciáját felhasználva nyomon követtük a PPP katalitikus alegységek evolúcióját. A rovarok PPP készletéhez képest a géncsalád jelentős kibővülését figyeltük meg. Megállapítottuk, hogy a *Drosophilidae* család 18-22 PPP génje abból a 8 alapvető foszfatázból fejlődött ki, melyek a rovarfajok többségében is jelen van. Retropozíciók és az ezeket követő duplikációk kibővítették a foszfatáz génkészletet, a szórványos génvesztések pedig hozzájárultak a PPP készlet fajspecifikus változatosságához. A vizsgálataink során 5, eddig nem jellemzett foszfatáz retrogént sikerült azonosítanunk (*PpY+*, *PpD5+*, *PpD6+*, *Pp4+*, *Pp6+*), amelyek csak néhány ősi *Drosophila* fajban találhatók meg. Igazoltuk, hogy ezek az új PPP gének a *D. melanogaster*-ben vizsgált új típusú foszfatázokhoz hasonlóan szintén egyértelmű hím-specifikus expressziót mutatnak. Az eredményeink tehát alátámasztják az „out of testis” hipotézist, amely szerint az új funkcionáló retrogének előnyben részesítik a hímivarszervekben történő expressziót. Azt is igazoltuk, hogy az új típusú, hím-specifikusan expresszálódó foszfatázok szekvenciája sokkal gyorsabban változott, mint a klasszikus foszfatázoké. Tehát eredményeink megerősítik a „faster male” hipotézist. A gének számbeli változásán túl az intron-exon szerkezet és számos PPP retrogén kromoszómális lokalizációja is változott az evolúció során. A kódoló régiók G-C tartalma csökkent, amikor az adott gén az Y kromoszóma heterokromatikus régiójába vándorolt. Tehát elmondható, hogy a PPP enzimek különböző típusú dinamikus genomátrendeződéseit az új funkcionális retrogének molekuláris evolúciója kísérte a *Drosophilidae* családban.

## 6. FÜGGELÉK



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR  
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK /171/2011.

Tételszám:

Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Ádám Csaba

Neptun kód: SKORMA

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Miskei, M., **Ádám, C.**, Kovács, L., Karányi, Z., Dombrádi, V.: Molecular Evolution of Phosphoprotein Phosphatases in Drosophila.  
*PLoS ONE*. 6 (7), e22218, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0022218>  
IF:4.411 (2010)
2. **Ádám, C.**, Henn, L., Miskei, M., Erdélyi, M., Friedrich, P., Dombrádi, V.: Conservation of male-specific expression of novel phosphoprotein phosphatases in Drosophila.  
*Dev. Genes Evol.* 220 (3-4), 123-128, 2010.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00427-010-0332-6>  
IF:2.008

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2011.07.26



*Az értekezéshez kapcsolódó poszterek*

Ádám Csaba, Miskei Márton, Nagy Olga, Pál Margit, Deák Péter, Friedrich Péter, Dombrádi Viktor (2007) Az új típusú protein foszfatázok vizsgálata *Drosophila* fajokban. Magyar Biokémiai Egyesület 2007. évi vándorgyűlése. Debrecen.

Ádám Csaba, Miskei Márton, Nagy Olga, Pál Margit, Deák Péter, Friedrich Péter, Dombrádi Viktor (2008) Új típusú protein foszfatázok expressziója és evolúciója. 38. Membrán Transzport Konferencia. Sümeg.

Ádám Csaba, Pál Margit, Deák Péter, Friedrich Péter, Dombrádi Viktor (2008) Transzgénikus RNS interferencia módszer a PPY és PPN új típusú protein foszfatázok funkciójának tanulmányozására *Drosophila melanogaster*-ben. Magyar Biokémiai Egyesület 2008. évi vándorgyűlése. Szeged.

Ádám Csaba, Henn László, Erdélyi Miklós, Friedrich Péter, Dombrádi Viktor (2009) Új típusú foszfoprotein foszfatázok tisztiz specifikus expressziója. VIII. Magyar Genetikai Kongresszus, XV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok. Nyíregyháza.

Ádám Csaba, Henn László, Erdélyi Miklós, Friedrich Péter, Dombrádi Viktor (2009) Új típusú foszfoprotein foszfatázok expressziójának vizsgálata *Drosophila melanogaster*-ben. 39. Membrán-Transzport Konferencia. Sümeg.

Ádám Csaba, Miskei Márton, Dombrádi Viktor (2009) A foszfoprotein foszfatázok evolúciója *Drosophila* fajokban. Magyar Biokémiai Egyesület 2009. évi vándorgyűlése. Budapest.