

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés

**ÚJ TÍPUSÚ PROTEIN FOSZFATÁZOK VIZSGÁLATA
DROSOPHILA MELANOGASTER-BEN**

Kókai Endre

Témavezető: Prof. Dr. Dombrádi Viktor

**Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum
Orvosi Vegytani Intézet**

2006

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. BEVEZETÉS	7
1.1. Fehérje foszforiláció-defoszforiláció	7
1.2. A foszfoprotein foszfatáz (PPP) enzimcsalád	8
1.2.1. A <i>Drosophila</i> PPP enzimcsalád	9
1.2.2. A <i>Drosophila</i> tesztisz specifikus protein foszfatázok	11
1.3. A protein foszfatázok regulációja	12
1.3.1. Új típusú protein foszfatázokkal kölcsönható fehérjék	13
2. CÉLKITŰZÉSEK	14
3. ANYAGOK	15
3.1. Vegyszerek	15
3.2. Nukleinsav preparátumok	17
3.2.1. cDNS-ek	17
3.2.2. <i>Drosophila</i> Genomi DNS preparátum	17
3.2.3. <i>Drosophila</i> RNS preparátum	17
3.2.4. DNS standard	17
3.2.5. Oligonukleotidok	17
3.2.6. Vektorok	18
3.3. Kísérleti organizmusok és sejtvonalak	18
4. MÓDSZEREK	19
4.1. Vektor konstrukciók összeállítása	19
4.1.1. PCR stratégiák	19
4.1.2. Klónozás	21
4.2. Élesztő két-hibrid kísérletek	21
4.2.1. <i>Drosophila</i> 3. lárvális stádiumú cDNS könyvtár szűrés	21
4.2.2. Élesztő sejtek újratranszformálása	22
4.3. Rekombináns fehérjék előállítása	22
4.3.1. Bakteriális expresszió	23
4.3.2. Expresszió emlős sejtekben	24
4.4. Nukleinsav vizsgáló módszerek	24
4.4.1. Southern blot	24

4.4.2. Northern blot	25
4.4.3. mRNS <i>in situ</i> hibridizáció	25
4.5. Fehérje vizsgáló módszerek	25
4.5.1. Fehérjék koncentrációjának meghatározása	25
4.5.2. SDS poliakrilamid gélelektroforézis	26
4.5.3. Tömegspektrometria	26
4.5.4. CD-spektroszkópia	26
4.5.5. Felületi plazmon rezonancia spektroszkópia	26
4.5.6. „Pull-down” kísérlet	27
4.5.7. Limitált proteolízis	28
4.5.8. Fehérje foszforiláció	28
4.5.9. Protein foszfatáz Y enzimaktivitás mérés	29
4.6. Immunológiai módszerek	30
4.6.1. Immunprecipitáció	30
4.6.2. Poliklonális ellenanyag előállítása és tisztítása	
Affinitáskromatográfiával	30
4.6.3. Western blot	31
4.6.4. Immunlokalizáció	31
5. EREDMÉNYEK	33
5.1. PPY-nal kölcsönható fehérjék kimutatása	33
5.2. A PPY-PPYR1 kölcsönhatás megerősítése és specifitásának igazolása	35
5.2.1. Élesztő két-hibrid módszer	35
5.2.2. Immunprecipitáció	36
5.2.3. Pull-down kísérlet	37
5.2.4. Felületi plazmon rezonancia vizsgálat	38
5.3. A rekombináns PPYR1 biokémiai jellemzése	40
5.3.1. Tömegspektrometria	40
5.3.2. SDS PAGE	41
5.3.3. CD-spektroszkópia	41
5.3.4. Proteáz érzékenység	42
5.3.5. Hőstabilitás	43
5.4. A PPYR1 RNS kötésének vizsgálata	43
5.4.1. RNS kötés igazolása CD-spektroszkópiával	43
5.4.2. RNS kötés kimutatása dot blottal	44

5.5. A PPYR1 egy foszforilálható fehérje	45
5.5.1. <i>In vitro</i> foszforiláció	45
5.5.2. A foszforilált PPYR1 hatása a PPY aktivitására	46
5.6. A PPYR1 mRNS vizsgálata	47
5.6.1. Northern blot	48
5.6.2. <i>In situ</i> hibridizáció	48
5.7. A PPYR1 protein expressziós mintázata	49
5.7.1. A PPYR1 protein expressziója az egyedfejlődés során	49
5.7.2. A PPYR1 szövet specifikus expressziója	50
5.7.3. Immunlokalizáció	51
6. AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE	56
7. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	62
8. SUMMARY	63
9. IRODALOMJEGYZÉK	64
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	74
11. FÜGGELÉK	75

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

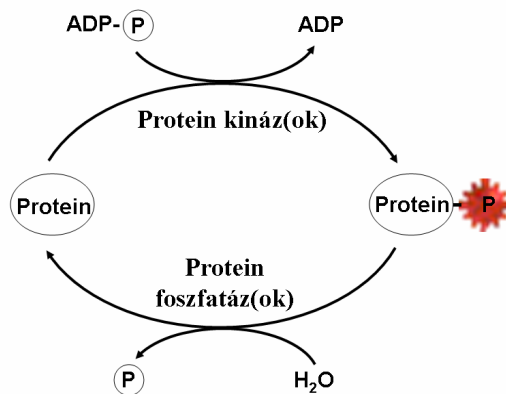
BSA	borjú szérum albumin
CD	cirkuláris dikroizmus
CM	karboxi-metil
CSN5	szignáloszóma komponens 5
DHB	2,5-dihidroxi-benzoészav
DMEM	Dulbecco minimális esszenciális tápfolyadék
dNTP	dezinukleozid-trifoszfát
DSP	széles specifitású protein foszfátáz
DTT	ditiotritol
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
FBS	fötális borjúszerum
FCP	RNS polimeráz II C-terminális doménjére specifikus protein foszfátáz
FITC	fluoreszein-izotiocianát
HA	hemagglutinin
HEPES	N-(2-hidroximetil)piperazin-N'-(2-etán-szulfonsav)
His	hisztidin
HRP	torma peroxidáz
IPTG	izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid
kDa	kilodalton
MALDI	mátrix alapú lézer deszorpció és ionizáció
MBP	mielin bázisos fehérje
OA	okadainsav
OD	optikai denzitás
ORF	nyitott leolvasási keret
PAGE	poliakrilamid-gélelektroforézis
PBS	foszfát alapú puffer
PBST	PBS + 0,01% Tween
PCR	polimeráz láncreakció
PICK1	protein kináz C kölcsönható fehérje 1
PKA	protein kináz A
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid

PP	protein foszfatáz
PPP1R2	protein foszfatáz 1 hőstabil inhibitor 2
PPP4R2	PP4 regulátor 2
PPYR1	PPY regulátor 1
PSD	„post-source decay” módszer
PTP	protein tirozin foszfatáz
rpm	percenkénti fordulatszám
RT-PCR	reverz transzkriptáz PCR
RU	„response unit”
SD	komplett szintetikus táptalaj
SD-LT	SD, leucin és triptofán nélkül
SD-LTH	SD, leucin, triptofán és hisztidin nélkül
SDS	nátrium-dodecilszulfát
St	standard
TAE	Trisz, ecetsav, EDTA puffer
TCA	triklór-ecetsav
TOF	Time of flight
Tris	Trisz-(hidroximetil)-amino-metán
X-gal	5-bróm-4-klór-3-indol- β -D-galaktozid

1. BEVEZETÉS

1.1 Fehérje foszforiláció-defoszforiláció

A fehérjék foszforilációja az evolúció korai szakaszában kialakult kovalens módosítás. Az utóbbi évek kutatási eredményei számos példát szolgáltatnak a foszforiláció jelentőségére prokariotákban [1], [2]. A folyamat evolúciós sikerességét mutatja, hogy a foszforilációért felelős protein kinázok minden eukarióta élőlényben megtalálhatóak és szerkezetük egyetlen ősi enzimre vezethető vissza [3]. A negatív töltésű foszfátcsoport hozzákapcsolódása a szerin, treonin ill. tirozin aminosav-oldalláncokhoz megváltoztatja a töltéseloszlást, amely következtében a fehérje szerkezete is megváltozik. A foszfátcsoport stabilizálhatja a fehérje szerkezetét, növelheti a tápértékét, szabályozó szerepet tölthet be, de előfordulhat, hogy a módosítás fiziológiai szerepe nem ismert. A szerkezeti adatok alapján megállapították, hogy a foszfátcsoport kétféleképpen befolyásolhatja egy enzim aktivitását. A bakteriális izocitrát dehidrogenáz aktív helyére beépülő foszfátcsoport közvetlen szterikus gátlás révén fejt ki gátló hatását [4]. A glikogén foszforiláz foszforilációja pedig egy bonyolult konformációváltozás hálózaton keresztül, közvetett úton növeli meg az enzim aktivitását [5]. A foszforiláció mint regulációs lehetőség csak akkor válhatott hatékonnyá, amikor lehetővé vált reverzibilis működése, azaz lejátszódott a fehérje defoszforilációja. A protein kinázok mellett szükség volt tehát a foszfátcsoportot hidrolízissel eltávolítani képes enzimekre, a protein foszfatázokra (1. ábra)



1. ábra. A fehérjék reverzibilis foszforilációja. A protein kinázok foszfát csoportot kapcsolnak a fehérjék szerin, treonin vagy tirozin oldalláncához, a protein foszfatázok pedig eltávolítják azt.

Az ellentétesen ható kinázok és foszfatázok egyenértékűen fontos elemei a szabályozó rendszereknek [6]. A protein foszfatázok a protein kinázokkal ellentétben konvergens módon alakultak ki az evolúció során [7], ezért nagyon sokfélék lehetnek; szubsztrát specifikitásuk, katalitikus alegységük szerkezete és a katalizált reakció mechanizmusa alapján több enzimesaládba sorolhatók. A szerin vagy treonin specifikus protein foszfatázok két fémiont tartalmaznak az aktív centrumban [8], és ezek segítségével hidrolizálják a foszfoészter kötést. Szerkezetük alapján az ún. foszfoprotein foszfatáz (PPP), fémionfüggő protein foszfatáz (PPM), ill. az RNS polimeráz II C-terminális doménjére specifikus protein foszfatáz (FCP) csoportba sorolhatjuk őket. A fehérjék tirozin oldalláncát a protein tirozin foszfatáz (PTP) család tagjai defoszforilálják [9] [10], amelyek egy aktív cisztein oldalláncot használnak a szubsztrát foszfátjának lehasítására, cisztein-foszfat köztitermék képződése közben. Azonos reakció mechanizmus szerint működnek az ún. kettős vagy széles specifikitású protein foszfatázok (DSP), amelyek egyaránt képesek defoszforilálni a fehérjék szerin, treonin és tirozin oldalláncait.

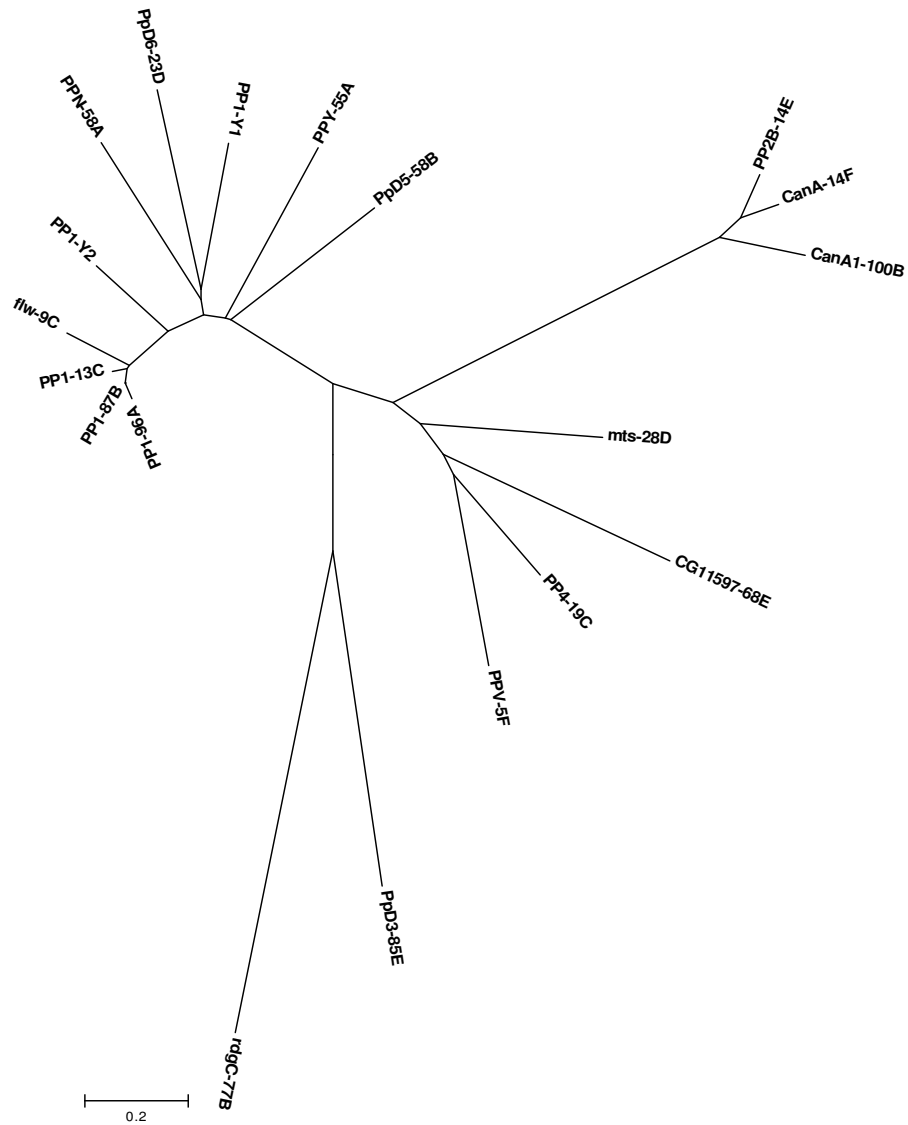
1.2 A foszfoprotein foszfatáz (PPP) enzimesalád

A Ser/Thr specifikus protein foszfatázok közé tartozó PPP enzimesalád tagjai már megtalálhatóak az ősi archea baktériumokban is, de itt nem töltenek be esszenciális funkciót. Az eukarióta élőlényekben a PPP család számos tagja van jelen, a sejtekből készített kivonatokban mérhető protein foszfatáz enzimaktivitásért, döntően három PPP enzim felelős, a protein foszfatáz 1, 2A és 2B (PP1, PP2A, PP2B) [11]. A PP1 és a PP2A esszenciális feladatokat lát el az eukarióta sejtek életműködésében, az enzimek aktivitásának gátlása vagy az azokat kódoló gének inaktiválása egyaránt az élőlény pusztulásához vezet. A PP2B, vagy más néven calcineurin gátlása nem vezet letalitáshoz, azonban fontos szabályozó szereppel rendelkezik. A szervátültetésekkor alkalmazott immunszuppresszorok, a ciklosporin A és az FK506 a PP2B aktivitásának gátlása révén fejtik ki hatásukat. A három fent említett „klasszikus” foszfatáz aktivitását foszforilált fehérjeszubsztrátok és specifikus gátlószer alkalmazásával lehet megmérni és elkülöníteni. A család többi tagjának aktivitását csak nehezen lehet detektálni a hagyományos biokémiai módszerekkel. Kimutatásukat csak a molekuláris klónozás módszere tette lehetővé, ezért ezeket „új típusú” protein foszfatázoknak nevezzük [8]. Az első rekombináns DNS technikával azonosított protein foszfatáz a PPX (újabb nevén PP4) volt [12], amely a PP2A katalitikus alegységhez hasonló fehérjét kódolt. Az első, teljes hosszúságú új típusú protein foszfatázt kódoló cDNS-eket egy évvel később

írták le [13] [14]. Ezt követően számos hasonló foszfatázt ismertek fel, amelyek szerkezetük alapján átmenetet mutatnak a klasszikus PP1, PP2A és PP2B protein foszfatázok között [15] [8]. Mindazokat az új típusú protein foszfatázokat, amelyek rendelkeznek a megfelelő humán homológgal, a humán genom program előírásai szerint számozással jelölték. Ezek a PP4, PP5, PP6 és PP7 jelölést kapták. A humán homológgal nem rendelkező enzimek a számok helyett nagybetűs jelölést kaptak. A *Drosophila*-ban két ilyen protein foszfatáz van, amely a PPY [14] ill. a PPN [16] elnevezést kapták. Gombákban három új típusú foszfatázt azonosítottak, amelyeket PPG, PPQ és PPZ-nek neveztek [17]. Polimeráz láncreakcióval Chen és munkatársai [18] további új típusú protein foszfatázok részleges szekvenciáit fedezték fel élesztőben, ecetmuslicában és emberben. Evolúciós szempontból különlegesen érdekesek azok az új típusú protein foszfatázok, amelyek az élőlények egy szűk csoportjában találhatóak meg és viszonylag későn különültek el a klasszikus foszfatázoktól. Ezért vizsgálataink a *Drosophila* PPY és PPN enzimekre irányultak.

1.2.1 A *Drosophila* PPP enzimcsalád

A szerkezeti hasonlóságokon alapuló könyvtárszűrések és PCR reakciók, valamint a klasszikus genetika módszereinek felhasználásával az ecetmuslicában található PPP enzimcsalád számos tagját leírták, még mielőtt a *Drosophila* genom program befejeződött volna [19]. A *Drosophila* genom program lehetőséget biztosított a korábban még nem azonosított protein foszfatáz katalitikus alegységek megtalálására. A *Drosophila* eukromatin régiójában lévő gének között csak egyetlen olyan PPP-t kódoló gént (CG11597) sikerült találni, amit korábban még nem ismertek. Az Y kromoszóma heterokromatin régiójának gondos áttekintése után további két protein foszfatáz gént találtak (PP1-Y1 és PP1-Y2) [20]. A *Drosophila* teljes PPP családfáját a 2. ábra mutatja be.



2. ábra. A *Drosophila* PPP foszfatáz katalitikus alegységek családfája. A fehérjék elsődleges szerkezetének összehasonlítását a Clustal W szoftver segítségével végeztük, a családfát a Mega3 szoftver alkalmazásával szerkesztettük. A skála 20% aminosav cserét ábrázol. Az ábrán a protein foszfatáz neve után föltüntettük a katalitikus alegységet kódoló gén lokalizációját. Mivel az Y kromoszóma egyes régióit nem látták el számozással, az itt található két foszfatáz lokalizációja hiányzik. A genetikailag jellemzett katalitikus alegységeket hárombetűs rövidítéssel adtuk meg.

A 2. ábrán látható, hogy a *Drosophila melanogaster*-ben összesen 19 PPP foszfatáz katalitikus alegységet kódoló gén van. Ezek között megtaláljuk a klasszikus PP1, PP2A (mts)

és PP2B (CanA) protein foszfatázokat, az új típusú PP4, PP5 (PpD3), PP6 (PPV), PP7 (rdgC), PPN, PPY, PpD5 és PpD6 foszfatázokat, valamint az Y kromoszómán elhelyezkedő két protein foszfatázt. Ezen enzimek funkciójára vonatkozóan csak néhány esetben áll rendelkezésünkre genetikai információ [19]. Az rdgC a retina fejlődésében játszik fontos szerepet, hiányában a *Drosophila* összetett szeme degradálódik, ebből ered a retinal degeneration C elnevezés [21]. A protein foszfatáz 1 katalitikus alegység négy különböző izoformáját kódoló gének a 9C, 13C, 87B és 96A genetikai régióban lokalizálható (2. ábra). Munkacsoportunk korábban alaposan jellemezte a PP1 87B izoforma funkcióját a sejtciklus szabályozásában [22] [23], az interfázisos kromoszóma szerkezetének kialakításában [15] [24], valamint a tanulás folyamatában [25]. A protein foszfatáz 1 9C izoformája a *Drosophila* izom kialakulásáért felelős, a hiányában megfigyelhető szárnytorzulásra utal a flap wing (flw) jelölés [26]. Újabban leírták a PP1 9C izoformának az aktin-miozin citoskeleton szerveződésében betöltött szerepét, hiányában fokozódik a nem izom eredetű miozin könnyűlánc fehérje foszforilációja, ami az aktin polimer szerkezetének sérüléséhez vezet [27]. A PP2A katalitikus alegységének hiányában abnormális csillagszerű mikrotubulus elrendezés figyelhető meg a sejtekben, erre utal a microtubule star (mts) rövidítés [28]. A többi *Drosophila* protein foszfatáz funkciójára utaló mutánst még nem sikerült azonosítani, így csak közvetett bizonyítékaink vannak a PPY és PPN protein foszfatázok lehetséges fiziológiás szerepéről.

1.2.2 *Drosophila* specifikus protein foszfatázok

A PPY-t kódoló cDNS-t Dombrádi és munkatársai [14], a PPN-t pedig Armstrong és munkatársai [16] klónozták. A gének lokalizációját a PPY esetében az 55A, a PPN-nek pedig az 58A régióban, a második kromoszóma jobb karján határozták meg. Mind a két gén terméke szerkezeti hasonlóságot mutat a PP1 izoformákkal (ld. 2. ábra). A genomi szekvencia megismerése után kiderült, hogy a gének kódoló régiója nem tartalmaz intront és a teljes *Drosophila* genomban csak egy-egy ilyen gén található (azaz a PPY-nak és a PPN-nek nincsenek izoformái). A génexpresszió mRNS szintű vizsgálata azt mutatta, hogy mind a két transzkript az egyedfejlődés során először a lárvastádiumban jelenik meg, majd kimutatható a bábban és a kifejlett hím egyedekben. Az mRNS hiányzott a korai fejlődési alakokból és a kifejlett nőstényekből is. Feltételezhető, hogy a lárva és a bábállapotban is csak a hímekben fordul elő. A szövetspecifitási vizsgálatok azt igazolták, hogy a PPY és a PPN mRNS a kifejlett hím egyedek heréjében lokalizálódik. Ezt a megfigyelést a PPY esetében Armstrong

és munkatársai [29] fehérje szintű vizsgálatokkal is megerősítették. Western blot módszerrel bizonyították, hogy a PPY fehérje csak a kifejlett muslicák heréjében detektálható. Immunhisztokémiai módszerekkel azt is megállapították, hogy a PPY fehérje a herében a cisztasejtek sejtmagjában akkumulálódik. Ez alapján javasolták a PPY spermafejlődésben betöltött szerepét. Azt, hogy a PPY valóban protein foszfatáz aktivitással rendelkezik, a rekombináns fehérje enzimaktivitásának mérésével lehetett bebizonyítani. Armstrong és munkatársai [29] foszforiláz kinázt, ill. glikogén foszforilázt használtak az enzimaktivitás mérésére. A mérések szerint az enzim specifitását és okadainsav iránti érzékenységét illetően a protein foszfatáz 1-hez hasonlít, azonban nem gátolható a protein foszfatáz hőstabil inhibitoraival és ebből a szempontból inkább a protein foszfatáz 2A biokémiai tulajdonságával mutat hasonlóságot. A rekombináns foszfatázok inhibitor-1 és 2-vel történő gátlása általában nehezen detektálható, így az utóbbi mérések nem annyira bizonyító erejűek. A fenti kísérleti eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a PPY a PPP család egyik kevésbé ismert PP1-szerű tagja. A PPN-nel szemben eddig még nem termeltek antitestet, így a fehérje előfordulására vonatkozó adatok is hiányoznak. A PPN enzim aktivitását még nem közölték, azonban saját nem közölt előkísérleteink szerint a rekombináns PPN rendelkezik mielin bázisos fehérjével mérhető protein foszfatáz aktivitással. Az enzim aktivitása csak magas koncentrációjú (500 nM) okadainsavval gátolható jelentős mértékben, és nem érzékeny a foszfatáz 1 hőstabil inhibitorára. Ezek szerint a PPN nemcsak lokalizációját, hanem aktivitását illetően is hasonlít a PPY-hoz. Tekintettel arra, hogy mind a mai napig nem sikerült a klasszikus genetikai módszerekkel PPY illetve PPN mutánsokat előállítani, ezen foszfatázok fiziológiás szerepe továbbra is nyitott kérdés maradt.

1.3 A protein foszfatázok regulációja

A közelmúltban befejeződött genom programok azt igazolták, hogy a protein kinázok katalitikus alegységét kódoló gének száma jóval nagyobb, mint a protein foszfatáz gének száma. A humán genom program adatai alapján a szerin/treonin specifikus protein kinázok és protein foszfatázok aránya ~10:1 az emberben [30] [31], míg a *Drosophila*-ban a genom program alapján ez az arány ~6:1 [32]. Felmerül a kérdés, hogyan képesek a protein foszfatázok egyenrangú partnerként együtt működni a nagyszámú protein kinázzal? A választ a PPP családba tartozó protein foszfatáz katalitikus alegységek azon tulajdonsága adja, hogy mindig regulátor vagy kölcsönható alegységgel alkotott holoenzim formában fordulnak elő az élő sejtekben. A protein foszfatáz 1 esetében már több mint ötven kölcsönható fehérjét

azonosítottak, amelyek többsége rendelkezik egy konzervált foszfatáz 1 felismerő hellyel ami más kötőhelyekkel együtt felelős a stabil komplex kialakításáért [33] [34]. A PP2A katalitikus alegység általában dimert alkot az ún. A regulátor alegységgel, amelyet kivételes esetben más fehérje is helyettesíthet. Ehhez a többnyire állandó maghoz kapcsolódnak a változatos B alegységek (B', B'', B''') vagy egyéb más regulátor fehérjék [35]. A PP2B katalitikus alegység szintén holoenzimet alkot egy regulátor B alegységgel, amely kalciumot képes megkötni. Az enzim teljes aktivitásához szükség van még a kalcium-kötő képességű kalmodulin kapcsolódására [36]. A protein foszfatáz katalitikus alegységekkel kölcsönható fehérjék megváltoztatják az enzimek aktivitását, szubsztrátspecifitását és különböző sejtkompartmentekhez irányítják az enzim aktivitást [37] [38] [31]. A regulátor fehérjék így biztosítják a protein foszfatázok számára az egymástól térben és időben is elkülönülő biokémiai folyamatokban való részvételt.

1.3.1 Új típusú protein foszfatázokkal kölcsönható fehérjék

Az új típusú protein foszfatázokkal kölcsönható fehérjék közül sokkal kevesebbet ismerünk. A PPP4-nek három különböző regulátor alegysége van: az $\alpha 4$, immunglobulinreceptorhoz kapcsolódó foszfoprotein [39] [40], a PP4_{RI}, 13 ismétlődő szekvenciariészletet tartalmazó fehérje, melynek szerkezete hasonló a PP2A A alegységéhez [41] [42], és a PPP4R2 centroszómákhoz kapcsolódó fehérje [43]. Igazolták továbbá a PPP4 kölcsönhatását a c-Rel, NF κ B p50, és RelA transzkripciós faktorokkal [44], a Gemin3 és Gemin4 fehérjékkel, amelyek a motoros neuron túlélési komplex tagjai [45], valamint az inzulin receptor szubsztrát 4 fehérjével [46]. Az új típusú PPP5 protein foszfatáz esetében ismerünk a legtöbb kölcsönható fehérjét. A tetratrikopeptid ismétlődést tartalmazó doménje kapcsolódni képes a Hsp90-glükokortikoid receptor heterokomplexhez [47] [48] [49], a kriptokróm 2-höz [50], az anafázis-promóter komplex CDC27 alegységéhez [51], az apoptózis szignál-regulált kináz 1-hez [52] [53], a heterotrimer G protein Ga12 és Ga13 alegységéhez [54], a copine I, II és IV membránhoz kötődő fehérjékhez [55], az ellenőrzőpont ATM kinázhoz [56], valamint a DNS-függő protein kináz katalitikus alegységéhez [57]. A SIT4/PPP6 katalitikus alegység komplexet alkot a mitózis során a különböző molekulatömegű ún. SIT4-kötő fehérjékkel (SAP155, SAP185, SAP190) [58]. Kimutatták, hogy a Hal3 nevű fehérje és homológja, a Vhs3 gátló hatást fejt ki a Ppz1 gomba specifikus új típusú protein foszfatáz aktivitására [59] [60].

A fent felsorolt példák alapján azt mondhatjuk, hogy az új típusú protein foszfatázok számos eltérő biokémiai folyamatban játszhatnak fontos szerepet. A funkciójuk megismerésének az egyik lehetséges útja a regulátor alegységek és kölcsönható partnerek azonosítása. Dolgozatomban, ezért a *Drosophila* protein foszfatáz Y-nal és N-nel kölcsönható fehérjéket tanulmányoztam.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A *Drosophila* specifikus protein foszfatáz Y és N különlegessége, hogy a kifejlett hím egyedek testiszéiben fordul elő, funkciójukat azonban nem ismerjük. Felmerült bennünk a kérdés, milyen új regulációs lehetőségeket teremt az evolúciós szempontból fiatal PPY és PPN megjelenése a klasszikus protein foszfatázok mellett.

Ennek megválaszolása érdekében fő célkitűzéseink a következők voltak:

1. A PPY és PPN foszfatázokkal kölcsönható fehérjék azonosítása élesztő két-hibrid módszerrel.
2. A feltételezett kölcsönhatás megerősítése.
3. Egy a PPY foszfatázhoz kapcsolódó fehérje kiválasztása és a kölcsönhatás specifitásának ellenőrzése.
4. A kölcsönható fehérje biokémiai jellemzése.
5. A kölcsönható fehérjét specifikusan felismerő ellenanyag előállítása.
6. A kölcsönható fehérje expressziós mintázatának és lokalizációjának vizsgálata a *Drosophila*-ban.

3. ANYAGOK

3.1 Vegyszerek

A plazmid DNS, és a gél fragment izoláló kité, valamint a Ni-NTA agaróz gyantát a Qiagen, a teljes RNS izoláláshoz szükséges Trizol reagenst a Gibco Life Technologies, okadainsavat és a Komplet Freund adjuvánst a Calbiochem, Digoxigenin RNS jelölő és detektáló kité és a 1 x EDTA mentes proteáz inhibitor koktélt a Roche, a Sepharose és Sephadex G-25 Corsa gyantát, a Rediprime II. kité és a Hybond-N⁺ membránt az Amersham Biosciences, a Supersignal West Pico kemilumineszcens szubsztrátot a Pierce, a proteináz K enzimet a Merck cégektől, az [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP és a [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP izotópokat az Izotóp Intézettől (Budapest) vásároltuk. Minden más vegyszer a Sigma-Aldrich, a molekuláris biológiai munkákhoz szükséges enzimek pedig a Promega és a New England Biolabs cégektől származtak. A PP1 hőstabil inhibitor (PPP1R2) nyúl vázizomból Cohen [61] leírása alapján készítettük. A Western blot és immunológiai módszerekhez felhasznált antitesteket a 1. táblázatban mutatom be.

1. táblázat. A kísérletek során felhasznált antitestek felsorolása. A táblázatban feltüntettem az élőlényt, amiben az ellenanyag kifejllesztésre került, a kísérlet során alkalmazott hígítást és a gyártó céget vagy intézetet.

Első antitest				
Antitest	Élőlény	Használt hígítás		Származás
		Western blot	Immunhisztokémia	
anti-Myc A14	nyúl poliklonális	1:1000	-	Santa Cruz
anti-HA 12CA5	egér monoklonális	1:1000	-	F. Hoffmann La-Roche Ltd.
anti-Penta-His	egér monoklonális	1:2500	-	Qiagen
anti-PPYR1	nyúl poliklonális	1:5000	1:500	Debreceni Egyetem Orvosi Vegytani Intézet
anti-PPY	nyúl poliklonális	1:2000	1:500	Dundee Egyetem MRC Fehérje-Foszforilációs Részleg
Második antitest				
Antitest	Élőlény	Használt hígítás		Származás
anti-egér-HRP	kecske	1:5000		Sigma A0168
anti-nyúl-HRP	kecske	1:5000		Sigma A0545
anti-nyúl-Cy3	nyúl	1:100		Jackson ImmunoResearch Laboratories

3.2 Nukleinsav preparátumok

3.2.1 cDNS-ek

A *Drosophila melanogaster* 3. lárvális stádiumból izolált, λ ACT fág cDNS könyvtár (ATCC 87290, American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA) AT19571-pOTB7 plazmidban található teljes hosszúságú cDNS (1130 bp) (Invitrogen Corporation)

3.2.2 Drosophila Genomi DNS preparátum

A genomi DNS-t a kifejlett *Drosophila*-ból, M. Ashburner [62] leírása alapján izoláltam.

3.2.3 Drosophila RNS preparátum

A teljes RNS-t a *Drosophila* testisből, ováriumából és 16 órás embriókból Trizol reagenssel (Gibco Life Technologies) tisztítottam a cég leírása szerint.

3.2.4 DNS standard

Agaróz gélelektroforézis során alkalmazott 1 kb DNS létrát a Promega cégtől vásároltuk.

3.2.5 Oligonukleotidok

A kísérletekhez az MWG-Biotech AG és az Integrated DNA Technologies Incorporation által gyártott oligonukleotidokat használtuk (2. táblázat).

2. táblázat. Oligonukleotidok. A táblázatban az oligonukleotid neve mellett feltüntettem a DNS szekvenciáját. Aláhúzással jelöltem a klónozásnál alkalmazott restriktív enzimek felismerő helyét, és vastag szedéssel kiemeltem a cDNS-ekben megtalálható szekvenciákat.

Elnevezés	DNS szekvencia
PPY 5' ATG- <i>Nde</i> I	GGCTCATATGGCCGTCTTAACTACTC
PPY 3'- <i>Not</i> I	GGGAGCGGCCGCGAATTTAATTGCACGAAGTG
PPN 5' ATG- <i>Nde</i> I	CCGACATATGATGAAGAAGTTACTAAG
PPN 3'- <i>Not</i> I	GGGAGCGGCCGCTAACTGGATATGCAATTTAC
CG15031 5' ATG- <i>Nde</i> I	CCGACATATGAACGTACCACTCGTAGC
CG15031 3'- <i>Not</i> I	GGGAGCGGCCGCCATCGTCTTCCAGCTCTC

3.2.6 Vektorok:

- pET-28a(+): bakteriális fehérje expressziós vektor (Novagen)
- pACT: GAL4 transz-aktivátor domént tartalmazó vektor (BD Biosciences)
- pGBK T7: GAL4 DNS-kötő domént tartalmazó vektor (BD Biosciences)
- pcDEF3-HA: hemagglutinin fúziós fehérje szekvenciát tartalmazó, módosított emlős expressziós vektor [63]
- pcDEF3-Myc: Myc epitóp fúziós fehérje szekvenciát tartalmazó, módosított emlős expressziós vektor [64]

3.3 Kísérleti organizmusok és sejtvonalak

- Escherichia coli*: BNN132 törzs (Molecular Biotechnology GmbH),
XL-10 Gold törzs (Stratagene),
BLR (DE3) törzs (Novagen)
- Saccharomyces cerevisiae*: Y190 törzs (Clontech)
- COS-7 emlős sejtvonala: ECACC 87021302 (New England Biolabs)
- D. melanogaster*: Oregon R vad típusú törzs (Szeged Drosophila Központ, Szegedi Egyetem)

4. MÓDSZEREK

4.1 Vektor konstrukciók összeállítása

A bakteriális, az élesztő és emlős sejtes expresszióhoz szükséges vektor konstrukciókat azonos elv alapján készítettem. A megfelelő gén kódoló szekvenciáját, amennyiben az nem tartalmazott intront, közvetlenül genomi DNS templátról vagy a megvásárolt cDNS-ről PCR módszerrel szaporítottam fel. A termékek végén restrikciós enzimek felismerő helyét alakítottam ki, amely lehetővé tették a restrikciós emésztést követően a megfelelő vektorba való beillesztést.

4.1.1 PCR stratégiák

A PPY (1 - 945 nukleotid) és a PPN (1 - 975 nukleotid) teljes kódoló szekvenciáját genomi DNS templátról amplifikáltuk, ugyanis ezen régiók egyik esetben sem tartalmaznak intront. A PPYR1 kódoló régiót (1 – 831 nukleotid) az AT19571-pOTB7 jelű plazmidról szaporítottam fel PCR módszerrel. A kísérlethez a PPY 5' ATG-*Nde*I és PPY 3' -*Not*I; PPN 5' ATG-*Nde*I és PPN 3' -*Not*I valamint a CG15031 5' -ATG-*Nde*I és CG15031 3' -*Not*I oligonukleotid párokat használtam a következőkben leírt reakcióközeg és hőmérsékleti profil alkalmazásával.

Reakció közeg

MgCl ₂ (2 mM)	1,6 µl
PCR puffer (1 X)	2,0 µl
dNTP (0.2 mM)	0,4 µl
primer 1-2 (0.4 µM – 0.4 µM)	1,0 µl
Pfx gold polimeráz (2 U)	0,4 µl
H ₂ O	13,6 µl
<u>cDNS/genomi DNS (0.3 µg)</u>	<u>1,0 µl</u>
	20,0 µl

PPY és PPN PCR hőmérsékleti profil

94°C	2	perc	}	5 ciklus
92°C	0,3	perc		
56°C	0,5	perc		
72°C	1	perc		

92°C	0,3	perc	}	30 ciklus
60°C	0,5	perc		
72°C	1,0	perc		

72°C 10 perc

PPYR1 PCR hőmérsékleti profil

94°C	2	perc	}	5 ciklus
92°C	0,3	perc		
55°C	0,5	perc		
72°C	1	perc		

92°C	0,3	perc	}	30 ciklus
65°C	0,5	perc		
72°C	1,0	perc		

72°C 10 perc

A PCR termékeket agaróz gélben választottam el, és gél extrakciós kit (Qiagen) segítségével izoláltam. A méretüket az agaróz gélelektroforézis során DNS standard (Promega) alkalmazásával, mennyiségüket pedig a 260 nm hullámhosszon mért fényelnyelésük alapján határoztam meg.

4.1.2 Klónozás

A PCR termékeket *Nde* I – *Not* I kettős restrikciós emésztés és foszfatáz kezelést követően ligáltam az azonos restrikciós enzimekkel kezelt vektorokba. A PPY és PPN cDNS-t az élesztő két-hibrid könyvtárszűrésnél alkalmazott GAL4 DNS-kötő domént tartalmazó pGBKT7 „csali” vektorba illesztettem. Az AT19571-pOTB7 plazmid által kódolt 0,9 kb *Bg*III - *Bcl*I cDNS szekvenciát (20 - 888 nukleotid) a pACT vektor *Bg*III - *Xho*I restrikciós helyére ligáltam. A PPY, PPN és PPYR1 fehérjék baktériumban történő termelése érdekében mind három PCR terméket a pET28a vektorba ligáltam, amely a fehérje N-terminális végére hat hisztidint kapcsol. Az emlős sejtben történő expresszió megvalósításához a PPY és PPN kódoló régióját a módosított pcDEF3-HA vektorba [63] illesztettem, amely N-terminálisan egy hemagglutinin (HA) peptid szekvenciát kapcsol a fehérjéhez. A PPYR1-et kódoló cDNS-t, pedig módosított pcDEF3-Myc vektorba [64] klónoztam, amely a fehérje N-terminális végén egy Myc peptidet kódol. A klónozásokat minden esetben a fent leírt stratégia szerint végeztem. A konstruktokat DNS szekvenálással ellenőriztem terminációs módszerrel, ABI PRISM 377 DNS szekvenáló készülék alkalmazásával (PE Applied Biosystems) az Oxfordi Egyetem Zoológia Intézetében.

4.2 Élesztő két-hibrid kísérletek

A PPY-nal és PPN-nel kölcsönható fehérjék azonosítására az élesztő két-hibrid módszert választottuk. Ez alkalmas *Drosophila* cDNS könyvtár által kifejezett fehérjék közül a katalitikus alegységekhez kapcsolódók azonosítására, amennyiben a két foszfatázt használjuk „csaliként”.

4.2.1 *Drosophila* 3. lárvális stádiumú cDNS könyvtár szűrés

A *Drosophila* 3. lárvális stádiumú, λ ACT fág cDNS könyvtár BNN132 baktérium törzsbe transzformálva állt rendelkezésemre. A baktérium törzs lehetővé teszi a cDNS inzertek kivágását egy ún. *cre-lox* mediálta rekombináció segítségével. Ezt követően a kivágott cDNS szekvenciákat a pACT élesztő két-hibrid vektorba helyeztem, amely a GAL4 fehérje transz-aktivátor domén DNS-t kódolja. Az élesztő két-hibrid szűrést a PPY-pGBKT7 és PPN-pGBKT7 „csali” vektor és a cDNS szekvenciákat hordozó pACT vektor felhasználásával végeztem Bennett [65] leírása szerint. A két-hibrid kísérletben Y190 jelű élesztő törzset

transzformáltam. A sejteket 15 mM 3-amido-1,2,4-triazol jelenlétében, komplett szintetikus (SD) táptalajon növesztettem fel. Ezt követően ellenőriztem szelektív táptalajon a telepek hisztidin autotrófiát komplementáló képességét, valamint a telepek β -D-galaktozidáz aktivitását, 5-bróm-4-klór-3-indolil- β -D-galaktopiranozid (Sigma) szubsztrát alkalmazásával. A kettős pozitív telepeket választottam ki további vizsgálatokhoz. A telepekből izolált plazmid DNS-t *E. coli* XL-10 Gold törzsbe transzformálva szaporítottam fel. A PPY esetében 21, a PPN esetében pedig 5 telepből származó plazmidot izoláltam és szekvenálással azonosítottam az inzertált cDNS-eket.

4.2.2 Élesztő sejtek újratranszformálása

A PPY-PPYR1 fehérje-fehérje kölcsönhatás specifikitását élesztő két-hibrid módszerrel ellenőriztem. A pACT-PPYR1 konstruktot együtt transzformáltam a PPY-pGBKT7, majd a PPN-pGBKT7, valamint a *Drosophila* protein foszfatáz 1 négy különböző izoformáját kódoló pAS2-PP1 α 87B [66], pAS2-PP1 β 9C, pAS2-PP1 α 13C, pAS2-PP1 α 96A [65] konstrukttal, Y190 élesztő törzsbe. Pozitív kontrollként a pAS2-SV40 T antigént és a pACT-p53 fehérjét kifejező plazmidokat (Clontech) használtam. Negatív kontrollként pedig a protein foszfatáz 1 miozin-kötő alegységét kifejező pACT-MYPT-75D plazmidot [27] transzformáltam együtt a pGBKT7-PPY vektorral. A sejteket SD táptalajra szélesztettem, amely nem tartalmazott sem leucint, sem triptofánt (SD-LT) és 30°C-on növesztettük hét napig. A felnőtt telepek közül ötöt-ötöt átoltottam két párhuzamos, SD-LT táptalajra. Míg az egyik mintát β -D-galaktozidáz aktivitás vizsgálatra használtam fel, addig a tartalék mintát sterilen tartottam és pozitív β -D-galaktozidáz eredmény esetén 85 % glicerin jelenlétében -70°C-on tároltam.

4.3 Rekombináns fehérjék előállítása

A PPY-t és PPYR1-et a közöttük lévő kölcsönhatás igazolása, valamint a PPYR1 jellemzése céljából baktériumokban és emlős sejtekben termeltem. Baktériumban His-PPY és His-PPYR1, emlős sejtekben pedig HA-PPY és Myc-PPYR1 formában termelődtek a rekombináns fehérjék. Kontrollként a rekombináns PPN fehérjét használtam, amelyet baktériumban His-PPN, emlős sejtekben pedig HA-PPN formában termeltem.

4.3.1 Bakteriális expresszió

A rekombináns His-PPY, His-PPN és His-PPYR1 fúziós fehérjéket *E.coli* BLR (DE3) törzsben expresszáltam a pET expressziós rendszer (Novagen) leírása szerint. 1600 ml LB + 50 µg/ml kanamycin (Sigma) baktérium kultúrából indultam ki, amelyet 37°C-on növesztettem OD₆₀₀ > 0,6 értékig, majd indukáltam 0,4 mM IPTG-vel és további három órán át inkubáltam 28°C-on a His-PPY, His-PPN és 30°C-on a His-PPYR1 esetében. A sejteket összegyűjtöttem 4500 x g fordulattal 15 percig történő centrifugálással 4°C-on, és

-20°C-on tároltam egy éjszakán át. Az összegyűjtött sejteket (5-6g) 30 ml lízis pufferben (25 mM Tris-HCl pH:7,5; 250 mM NaCl; 0,1 % Triton X-100; 1 mM β-merkaptóetanol; 5 mM imidazol; 1 mM PMSF; 1 mM benzamidin; 1 x EDTA mentes proteáz inhibitor koktél) szuszpendáltam fel és 3 x 30 másodpercig (közben 30 másodperc jégen tartottam) ultrahanggal tartam fel (Branson Sonifier 250 készülékkel). A lizátumot 10000 x g fordulattal 20 percig centrifugáltam, 4°C-on.

A His-PPYR1 fehérje a felülúszó frakcióban volt megtalálható, így közvetlenül tudtam tisztítani a baktérium sejtek lízisét követően. A felülúszóhoz kb. 10-15 ml, 1 ml lízis pufferben ekvibrált Ni-NTA agaróz (Qiagen) gyantát adtam és 60-90 percig forgatás közben inkubáltam 10°C-on.

A His-PPY és His-PPN fehérjék a pellet frakcióban voltak, így renaturáló körülményeket alkalmaztam a tisztításhoz. A sejtek feltárását a fent leírt módon végeztem, majd a pellet frakciót 20 ml pellet lízis pufferben (lízis puffer + 6 M guanidin-hidroklorid) szobahőmérsékleten oldottam fel, 20 perc forgatás közben. A lizátumot 4 l renaturáló pufferben (25 mM Tris-HCl pH:7,2; 250 mM NaCl; 1 mM MnCl₂; 0,1 % Tween-20; 0,4 % β-merkaptóetanol) hígítottam. Két óra folyamatos kevertetés után 2 ml lízis pufferben ekvibrált Ni-NTA agaróz (Qiagen) gyantát adtam hozzá, a kevertetést egy éjszakán át folytattam 10°C-on. A gyantát mindkét esetben összegyűjtöttem 1 cm átmérőjű oszlopon és mostam 100 x térfogat mosó I. pufferrel (25 mM Tris-HCl pH:7,2; 800 mM NaCl; 1 mM β-merkaptóetanol; 20 mM imidazol; 1 mM PMSF; 1 mM benzamidin) és 100 x térfogat mosó II. pufferrel (25 mM Tris-HCl pH:7,2; 200 mM NaCl; 1 mM β-merkaptóetanol; 30 mM imidazol; 1 mM PMSF; 1 mM benzamidin). A Ni-NTA agaróz gyantához kötött fehérjét imidazol grádiens (30-250 mM) alkalmazásával 20ml eluáló pufferrel (25 mM Tris-HCl pH:7,2; 200 mM NaCl; 1 mM β-merkaptóetanol; 1 mM PMSF; 1 mM benzamidin; 1 x EDTA mentes proteáz inhibitor koktél) 1 ml-es frakciónként mostam le. Az összegyűjtött

frakciókhoz (20 ml) 0,1 % β -merkaptoetanolt adtam és centrikonnal (YM-10 green, Amicon) 10 ml-re töményítettem a cég leírása alapján. Ezt követően dializáltam 100 x térfogat PBS pH: 7,0; 60 % glicerollal szemben. A fehérje mintát -20°C-on tároltam.

4.3.2 Expresszió emlős sejtekben

A COS-7 emlős sejteket DMEM tápfolyadékban tenyésztettem, amely 2mM glutamint, 10% filter sterilizált és hőinaktivált FBS-t, valamint 0,1mg/ml gentamicint (Sigma) tartalmazott. A sejteket 37°C-on, 5% CO₂ jelenlétében, Heraeus termosztátban növesztettem és Axiovert 25 típusú inverz fénymikroszkóppal (Zeiss) ellenőriztem. A pcDEF3-HA-PPY, pcDEF3-HA-PPN valamint a pcDEF3-Myc-PPYR1 plazmidokat FuGENE 6 Transzfekciós Reagens (Boehringer Mannheim) segítségével jutattam a sejtekbe a cég által leírt módszer szerint. A rekombináns fehérjéket termelő sejteket “pull-down” és immunprecipitációs kísérletekhez használtam fel.

4.4 Nukleinsav vizsgáló módszerek

Southern blot módszerrel megerősítettem a Drosophila adatbázisban található információt, hogy a PPYR1 gén egy kópiában fordul elő az *ecetmuslica* genomjában. A PPYR1 mRNS szervespecifikus kifejeződését és lokalizációját Northern és mRNS *in situ* hibridizációval ellenőriztük.

4.4.1 Southern blot

A kísérletben 2 μ g genomi DNS-t 3-3 olyan restrikciós endonukleáz enzimmal (*Hind* III, *Xho* I, *Eco* R I) emésztettem, amely a PPYR1 gén kódoló régiójában nem tartalmaz felismerő helyet. A megemésztett DNS-t 0,8 % agaróz (BioRad) gélen választottam el TAE puffer rendszerben, majd vákuum készülék (BioRad Model 785 Vacuum blotter) segítségével Hybond-N⁺ nylon membránra vittem át (Amersham Biosciences). A membránt 80°C-on 30 percig szárítottam és szárazon tároltam. A prehibridizálást 10 ml oldatban (6 x SSC, 0,5% SDS, 5 x Denhardt oldat, 100 μ g / ml denaturált hering sperma DNS, 50 % formamid) 3 órán keresztül 42 °C-on, Midi Dual 14 (HYBAID) készülékben végeztem. Próbaként 1 μ g PPYR1 cDNS PCR fragmentet használtam, a jelölést RediprimeTM II. kit (Amersham Biosciences)

alkalmazásával végeztem a cég leírása szerint, 0,27 mCi [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP izotóp (specifikus aktivitás: 6000 Ci/mmol) felhasználásával. A be nem épült nukleotidokat Sephadex G-25 Corsa (Amersham Biosciences) gyantán történő gélszűrőssel távolítottam el. A hibridizáló oldat radioaktivitása $2,8 \times 10^6$ cpm/ml volt. A hibridizálás 15 órán keresztül 42 °C-on történt. A mosást 2 x SSC; 0,1 % SDS-oldattal 2 x 15 percig szoba-hőmérsékleten majd 0,1 x SSC; 0,1 % SDS oldattal 1 x 30 percig 42 °C-on végeztem. A detektálást három napon át autoradiográfiával végeztem, CP-BU New NIF100 jelű (AGFA) filmet használtam.

4.4.2 Northern blot

Az RNS preparátumokat Northern blot módszerrel vizsgáltam Sambrook és munkatársai [67] szerint. Próbaként az AT19571-pOTB7 plazmidból kivágott 1,13 kb *EcoRI* - *XhoI* cDNS fragmentet használtam. Az így előállított DNS szakaszt 0,27 mCi [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP (specifikus aktivitás: 6000 Ci/mmol) (Izotóp Intézet Kft, Budapest) radioaktív nukleotiddal jelölve szaporítottam fel Rediprime II. kit (Amersham Biosciences) alkalmazásával. A be nem épült nukleotidok eltávolítását, a hibridizálást és a mosást a Southern blot módszernél leírt körülmények szerint végeztem. A hibridizáló oldat radioaktivitása $1,5 \times 10^7$ cpm/ml volt. A detektálást két napig autoradiográfiával végeztem.

4.4.3 mRNS *in situ* hibridizáció

Az *in situ* hibridizációs kísérleteket Dr. Erdélyi Miklós (MTA SzBK, Genetikai Intézet, Szeged) laboratóriumában Szuperák Milán végezte Ephrussi és munkatársai [68] leírása alapján. A ribonukleotid próba előállításához *EcoRI* restrikciós enzimmal linearizálta az AT19571-pOTB7 plazmidot. Az antiszensz digoxigenin-jelölt RNS próba T7 promóter és Dig-RNS jelölő kit (Roche) felhasználásával készült, a jelölt RNS kimutatása is a kit reagensivel történt a cég leírása szerint.

4.5 Fehérje vizsgáló módszerek

4.5.1 Fehérjék koncentrációjának meghatározása

Az affinitáskromatográfiával tisztított és a dialízissel töményített fehérjék koncentrációját Bradford-módszerrel [69] határoztam meg.

4.5.2 SDS poliakrilamid gélelektroforézis

A fehérjék méretét és tisztaságát 12 % SDS-PAGE-en történő elválasztással [70] vizsgáltam Sigmamarker (Sigma) standard fehérje elegy alkalmazásával.

4.5.3 Tömegspektrometria

A rekombináns His-PPYR1 fehérjét (28 µg) 10% SDS-PAGE-en tisztítottam és Coomassie Brilliant Blue G250 festéssel tettem láthatóvá. A gélből kivágtam a 47 kDa molekulaméretű fehérje sávot. A minta MALDI-TOF tömegspektrometriás vizsgálatát Dr. Medzihradszky Katalin (MTA SzBK Tömegspektrometriai Laboratórium, Szeged) végezte Sümegi és munkatársai [71] szerint. A preparátumot DTT-vel történő redukálás és jódecetamidós alkilálás után tripszinnel emésztették (4 óra, 37°C-on). Extrakció után a peptideket C18-as ZipTip-pel (ZT) tisztították, a ZT-ről 10 µl 0,1 % TFA, 50% AcN-tel eluálták. A minta tömegspektrometriás vizsgálata DHB mátrixban normál targeten történt (RP_2-3 kDa_short). Ily módon 43 peptidet különítettek el, ezek az általunk ismert szekvenciát tartalmazták. A találatot megerősítették a legintenzívebb csúcs (K) FIMSDFGTKK (E) (186–195 aminosav) PSD spektrumának ellenőrzésével is.

4.5.4 CD-spektroszkópia

A PPYR1 CD spektrumát Dr. Friedrich Péter és Dr. Tompa Péter laboratóriumában (MTA Enzimológiai Intézet, Budapest) Dr. Tantos Ágnes határozta meg. A fehérjét 0,075 mg/ml koncentrációban vizsgálták 0,01 mg/ml teljes Drosophila RNS preparátum jelenlétében vagy a nélkül. A kísérletet foszfát pufferben (pH 7.0) végezték, 1 mm falvastagságú küvettában, Jasco J-720 spektropolariméterrel folyamatos üzemmódban, 1 nm sáv szélességgel, 8 sec válaszidőt és 20 nm/perc pásztázási sebességet alkalmaztak. Az állandó 20 °C hőmérsékletet Neslab RTE-111 cirkulációs vízfürdő biztosította.

4.5.5 Felületi plazmon rezonancia spektroszkópia

A PPY és PPYR1 fehérjék közötti kölcsönhatást felszíni plazmon rezonancia segítségével is ellenőriztem. A kísérlethez Biacore X készüléket használtam (Biacore AB, Svédország) és a

méréseket Sensor Chip CM5 (karboximetilált dextrán) Research Grade alkalmazásával végeztem. A mérés megkezdése előtt a készüléket és a felhasznált szenzor chip-et a Biacore X Control Software alkalmazásával kalibráltam. A CM5 szenzor chip két különálló felszínnel rendelkezett (Fc1, Fc2), az Fc1 felszínre a baktériumban termelt és tisztított His-PPY, az Fc2 felszínre pedig a hasonlóan előállított His-PPN fehérjét kapcsoltam. Először az Fc1 felszínt aktiváltam 35 µl N-hidroxiszukcinimid/N-etil-N'-(dimetilaminopropil)-karbodiimid oldattal. Ezt követően kötöttem a His-PPY fehérjét (35 µl: 0,375 mg/ml; 10 mM Na-acetát; 150 mM NaCl, pH 5) az aktivált felszínre, majd a szabadon maradt kötőhelyeket etanol-aminnal (35 µl; 1M) blokkoltam, az átfolyási sebesség 5 µl/min volt. A His-PPN-t hasonlóan kötöttem az Fc2 felszínre (35 µl: 0,45 mg/ml; 10 mM Pipes; 150 mM NaCl, pH 6,5). A kapcsolt fehérje mennyiségét a rezonancia szignál (RU) változásával követtem nyomon. 1000 RU változás 1 ng/cm² fehérje kapcsolódásának felel meg. A His-PPY esetében az alapvonalhoz képest 1600 RU, a His-PPN esetében, pedig 1650 RU változást tapasztaltam. A His-PPYR1 fehérje különböző anyagmennyiségeit (0,4; 0,525; 0,8 µmol), az így kialakított felszíneken áramoltattam át HBS pufferben (10mM Hepes; 150 mM NaCl; 3 mM EDTA; 0,005 % P₂₀ felületaktív detergens, pH 7,4) 20°C-on. A mérési adatokból a BIAevaluation Software 4,1 alkalmazásával meghatároztam a His-PPYR1 asszociációs és disszociációs állandóit a két különböző felszínen.

4.5.6 „Pull-down” kísérlet

A COS-7 sejteket pcDEF3-Myc-PPYR1, illetve az üres pcDEF3-Myc vektorral transzfektáltam. 48 óra tenyésztés után kétszer mostam a sejteket 0°C-os PBS oldattal. A 35 mm átmérőjű tenyésztőedények tartalmához 0,4 ml lízis puffert (lásd: immunprecipitáció) adtam és 30 percig inkubáltam jégen mozgatva. A feltárt sejtörmeléket centrifugálással (2500×g, 10 perc, 4°C-on) gyűjtöttem össze. A Myc-PPYR1-et tartalmazó 0,4 ml felülúszóhoz 1,2 µg His-PPY vagy 1,2 µg His-PPN tisztított rekombináns fehérjét és 50 µl Ni-NTA agarózt (Qiagen) adtam. A mintákat 1 órán át inkubáltam 4 °C-on folyamatos rázás közben. A gyantát centrifugálással gyűjtöttem össze, majd ötször mostam 1 ml lízis pufferrel és végül 30 µl 2xSDS mintapuffert adtam az egyes mintákhoz és forrásban lévő vízben inkubáltam 5 percig.

4.5.7 Limitált proteolízis

A His-PPYR1 fehérje proteáz érzékenységét Dr. Friedrich Péter és Dr. Tompa Péter laboratóriumában (MTA Enzimológiai Intézet, Budapest) Dr. Tantos Ágnes vizsgálta. A rekombináns fehérje emésztését tripszinnel (Sigma) és proteináz K (Merck) enzimekkel végezték PBS pufferben (pH 7,5; Sigma), 20°C-on. A reakció az enzim hozzáadásával indult, majd 30 másodperc után SDS-PAGE mintapufferrel állították le és 5 percig inkubálták forrásban lévő vízben. 1:50; 1:100; 1:300 és 1:1000 enzim-szubsztrát anyagmennyiség arányt alkalmaztak, amelyet úgy állították be, hogy az enzim mennyiségét változtatták a szubsztrát állandó (0,5 mg/ml) koncentrációja mellett. A kontroll minta nem tartalmazott enzimet. A proteáz érzékenységet proteaszóma emésztéssel is megvizsgálták. A vizsgálatokhoz *Drosophila* 20S proteaszóma preparátumot használtak, amelyet Udvardy [72] leírása alapján tisztítottak. A kísérlet során 1 µM PPYR1 fehérjét adtak 20 nM 20S proteaszóma preparátumhoz, 50 µM epoxomicin (Calbiochem) jelenlétében vagy hiányában. A kezelést 37 °C-on 10 percig végezték, a következő puffer jelenlétében: 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM DTT. Mintavétel a proteaszóma hozzáadása előtt (0 perc), majd 5 és 10 perc együttes inkubálás után történt, a reakciót SDS-PAGE mintapuffer hozzáadásával állították le és az elegyet öt percig inkubálták forrásban lévő vízben. A mintákat 12,5 % SDS-poliakrilamid gélen választották el Laemmli [70] módszere szerint, és ezüst festéssel tették láthatóvá (Bio-Rad Silver Stain Kit) 0,01 % KMnO₄ jelenlétében.

4.5.8 Fehérje foszforiláció

A His-PPYR1 fehérje (0,22 mg) foszforilációját 0,5 µg cAMP-függő protein kináz enzimmel (Upstate) végeztem, amely specifikus aktivitása 8,1 nmól foszfát/perc/µg a cég által használt Kemptide szubsztráttal mérve. A 150 µl reakcióközeg (50 mM Tris-HCl pH:7,5; 50 mM NaCl; 1 mM benzamidin; 1 mM PMSF; 1 mM β-merkaptotanol; 0,5 mM ATP; 25 mM MgCl₂) 0,155 mCi [³²P]-ATP-t (specifikus aktivitás: 400 Ci/mmol, teljes aktivitás a reakció közegben: 1,7x10⁸ cpm/mM ATP) tartalmazott. A reakció elegyet 30°C-on inkubáltam 2 órán keresztül. 1, 10, 30, 60, 90, 120 perc elteltével 3-3 µl-t kivettem a közegből és kationcserélő papírra (Whatman P81) cseppenttem. A mintákat 3x10 percig 0,5 % H₃PO₄ oldattal mostam és 5 ml 0,25 N NaOH-ot tartalmazó folyadékszcintillációs csőbe tettem, majd megmértem a

radioaktív minták Cserenkov sugárzását. A [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP specifikus aktivitás ismeretében kiszámítottam, hány mól foszfát épült be a különböző időpontokig 1 mól His-PPYR1 fehérjébe. Kontrollként elvégeztem a reakciót His-PPYR1 nélkül is. A 2 órás mintákból 3-3 μl -hez 2xSDS mintapuffert adtam és inkubáltam 5 percig forrásban levő vízben, majd SDS-PAGE-sel elválasztottam a mintákat. A gélt 80°C-on szárítottam 2 órán keresztül és a ^{32}P beépülést röntgenfilm (Agfa) segítségével, autoradiográfiával detektáltam.

4.5.9 Protein foszfatáz Y enzimaktivitás mérés

A milelin bázisos proteint (MBP) Posas és munkatársai [73] korábban eredményesen használták a *Saccharomyces cerevisiae* PPZ1 új típusú foszfatáz szubsztrátjaként. Az MBP foszforilálását Posas és munkatársai [73] szerint végeztem. 1 mg MBP (Sigma) foszforilálását 31,5 μg marhaszívából tisztított PKAc enzimmal (Upstate) végeztem (20 mM Tris-HCl pH:7,0; 4 % glicerol; 0,4 mM benzamidin; 6 mM β -merkaptotanol; 0,5 mM ATP; 25 mM Mg-acetát); 0,25 mCi [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP (specifikus aktivitás: 400 Ci/mmol, a teljes radioaktivitás a reakció közegben: $5,18 \times 10^8$ cpm/mM ATP) jelenlétében. A foszforilálási reakciót 45 percig 30 °C-on inkubáltam és 1 ml 10 % TCA oldattal állítottam le. A csapadékot 3 perc szobahőmérsékleten 13000xg fordulattal történő centrifugálással gyűjtöttem össze és mostam 8 x 1 ml 10 % TCA oldattal, majd 3 x 1 ml 96 % etanollal. A végső pelletet 1 ml (50 mM Tris-HCl pH:7,0; 10 % glicerol; 1 mM benzamidin; 14 mM β -merkaptotanol) pufferben oldottam fel és 4 °C-on tároltam. A jelölési reakció után a MBP szubsztrát radioaktivitása $6,6 \times 10^6$ cpm / mg volt.

Az enzimaktivitás mérés során a reakcióközeg a következő összetevőkből állt: 30 μl reakció puffer (50 mM Tris-HCl pH:7,0; 0,1 mM EDTA; 5 mM DTT; 1 mM MnCl_2), amely tartalmazta a gátlószerként használt OA-at (10 nM) vagy inhibitor-2-t (PPP1R2) (0,4 μM) vagy rekombináns His-PPYR1-t (2,5 μM és 5 μM) vagy a foszforilált His-PPYR1-et (2,5 μM), valamint 10 μl His-PPY (1,1 μM). Ezen komponensek összemérése után 5 percig 30 °C-on inkubáltam az elegyet. A reakciót 10 μl ^{32}P -MBP (3,5 mM) hozzáadásával indítottam és 10 percig inkubáltam 30 °C-on. A reakció leállítását 200 μl 20 % TCA oldattal végeztem, a mintát 10 percig jégen tartottam. A csapadékot 12000 x g fordulaton 5 perc centrifugálással gyűjtöttem össze. A felülúszóból 200 μl -t folyadékszintillációs csőbe mértem, ami 5 ml 0,25 M NaOH-ot tartalmazott és megmértük a radioaktív minták Cserenkov sugárzását. 1 U annak

az enzimaktivitásnak felelt meg, amely során 1 nM $^{32}\text{P}_i$ válik le 1 perc alatt a szubsztrátról az adott reakció körülmények között.

4.6 Immunológiai módszerek

A PPY-PPYR1 kölcsönhatást a rekombináns fehérjék immunprecipitációjával is megerősítettem. A PPYR1 lokalizációjának vizsgálata céljából pedig poliklonális antitestet állítottam elő, amelyet fejlődési, szövetspecifitási és immunhisztokémiai vizsgálatokhoz használtunk fel.

4.6.1 Immunprecipitáció

A COS-7 sejteket 35 mm átmérőjű edényben tenyésztettem, a tenyésztő folyadék eltávolítása után a sejteket kétszer mostam 0°C-os PBS oldattal. Az egyes tenyésztőedényben lévő sejtekhez 0,4 ml lízis puffert (50mM Tris-HCl pH 7,5; 0,5% Triton-X 100; 150mM NaCl; 1× Roche komplett, EDTA-mentes protáz inhibitor koktél) adtam és 30 percig inkubáltam jégen mozgatva. A feltárt sejtörmelékot centrifugálással (10000×g, 10 perc, 4°C-on) gyűjtöttem össze, a felülúszó lizátumot immunprecipitáltam 2µg anti-HA 12CA5 egér monoklonális antitest (Hoffmann La-Roche Ltd.) és GammaBind Plus Protein G-Sepharose (Amersham Biosciences) alkalmazásával, a következő weboldalon található leírás szerint: <http://www-biology.ucsd.edu/labs/aroian/protocols/IP.htm>.

4.6.2 Poliklonális anti-PPYR1 ellenanyag előállítása és tisztítása affinitáskromatográfiával

250 µg tisztított rekombináns PPYR1 fehérjét (PBS pH: 7,0; 60 % glicerol) homogenizáltam 50 v/v% Komplet Freund adjuvánssal (Calbiochem) és ezt oltottam be nyúlba. Két és négy hét múlva megismételtem az oltást azonos mennyiségű fehérjével, amely homogenizálását Inkomplet Freund Adjuvánssal (Sigma) végeztem. Az anti-PPYR1 szérumot 10 nappal az utolsó oltást követően izoláltam, PPYR1 elleni antigenitását dot blot és Western blot módszerrel vizsgáltam. A szérumból a PPYR1 specifikus immunglobulinokat Brewis és munkatársai módszere alapján [74], affinitáskromatográfiával tisztítottam. A baktériumban termeltetett PPYR1 fehérjét 1 g cián-bromid aktivált Sepharose 4B (Amersham Biosciences) 1 cm átmérőjű oszlophoz kapcsoltam, és ezen áramoltattam át a szérum 10 ml térfogatát. Ezt

követően mostam az oszlopot először 20 ml (20 x oszloptérfogat) 10mM Tris-HCl (pH: 7,5); majd 30 ml (30 x oszloptérfogat) 10mM Tris-HCl (pH: 7,5); 500 mM NaCl pufferrel. Az eluálást 10 ml (10 x oszloptérfogat) 100 mM glicin (pH: 2,5) oldattal végeztem, az eluátumhoz azonnal hozzáadtam 1/10-ed térfogat 1M Tris-HCl (pH: 8,8) puffer oldatot és 0,01 % Na-azid jelenlétében -20°C-on tároltam. Az így tisztított PPYR1 specifikus szérumot használtuk a Western blot és immunhisztokémiai kísérletekhez.

4.6.3 Western blot

A fehérje preparátumokat SDS-PAGE-vel Laemmli [70] szerint választottam el, majd Immobilon-P PVDF membránra (Milipore) vagy Hybond™ ECL™ nitrocellulóz membránra (Amersham Biosciences) transzferáltam. A kísérletekhez BioRad elektroforézis és transzfer készüléket használtam. A fehérjék membránra történő átvitelét transzfer pufferben (120 mM Tris-HCl, 40 mM glicin, 20 v/v% metanol), 25V állandó feszültséggel, 12-16 órán át végeztem. A transzfert követően a membránt reverzibilisen festettem Ponceau S oldattal (Sigma), amely lehetővé tette a standard, ismert molekulatömegű fehérjék azonosítását. A festék eltávolítása után a membránt 1 órán át blokkoló pufferben (1×PBST, 5 v/v% alacsony zsírtartalmú tejpor vagy az anti-His antitest esetében 3 v/v% BSA) inkubáltam. A blokkoló pufferhez hozzáadtam a megfelelő első antitestet és 1 órán át 20°C-on vagy 12 órán át 4°C-on folytattam tovább az inkubálást. Míg a rekombináns fehérjék kimutatására Anti-Myc A14 (Santa Cruz) nyúl poliklonális, anti-HA 12CA5 (Hoffmann La-Roche Ltd.) egér monoklonális és anti-penta-His (Qiagen) monoklonális antitestet, addig a natív PPYR1 azonosításához anti-PPYR1 antitestet használtam. Az első antitesteket kecskében kifejllesztett, torna peroxidáz enzimhez kapcsolt anti-egér (Sigma A0168) vagy anti-nyúl (Sigma A0545) második antitesttel jelöltem és Supersignal West Pico kemilumineszcens szubsztráttal (Pierce) tettem láthatóvá. A reagens által kibocsátott fényt röntgen filmen (Agfa vagy Fuji) rögzítettem a jel erősségétől függően 3 másodperctől 20 percig tartó expozícióval.

4.6.4 Immunlokalizáció

Az immunhisztokémiai kísérleteket Dr. Gausz János laboratóriumában (MTA SzBK, Genetikai Intézet, Szeged) Dr. Ádám Géza végezte. A kísérlethez felhasznált Drosophila embriók chorion rétegét eltávolította, a testisz és ovárium mintákat PBS-ben izolálta. Az így

előkészített preparátumokat 4 v/v% formaldehidet tartalmazó PBS oldatban fixálta és háromszor mosta 1 v/v% Triton-X 100 tartalmú PBS-sel. Az immunofestést Ádám és munkatársai által leírt módszer szerint végezték [75]. Az embriókamrák RNáz kezelését további két PBS-sel történő mosás előzte meg. Az RNáz A emésztés 37 °C-on, 2 órán át történt 400 µg/ml enzim jelenlétében. Az affinitástisztított anti-PPY és anti-PPYR1 antitesteket 1:500 hígításban alkalmazta. Második antitestként Cy3-jelölt anti nyúl (Jackson ImmunoResearch Laboratories) szérumot használt 1:100 hígításban. A PPY és PPYR1 lokalizációjának azonosításához Zeiss LSM 510 Confocor 2 konfokális mikroszkópot használt.

5. EREDMÉNYEK

5.1 A PPY-nal kölcsönható fehérjék kimutatása

A *Drosophila* testisz specifikus protein foszfatáz Y és N funkciójának tanulmányozása érdekében élesztő két-hibrid módszerrel kölcsönható fehérjéket kerestünk. A kísérletben 3. stádiumú cDNS könyvtár szűrését végeztük, ami a *Drosophila* fejlődése során a legtöbb mRNS-ről átírt cDNS-t tartalmaz. Az *ecetmuslica* egyedfejlődésének ebben a stádiumában fejeződik ki először a PPY és a PPN mRNS, így a könyvtár alkalmas valós kölcsönhatások kimutatására. „Csaliként” a pGBKT7-PPY konstruktot használtuk, amely tartalmazta a PPY teljes hosszúságú kódoló szekvenciáját. Az élesztő két-hibrid rendszerben, ha kölcsönhatás alakul ki két fehérje között, akkor elkezdődik a vektorban található két riporter génről az mRNS átírás és a fehérje termelés. A hisztidin auxotrófiát komplementáló riporter gén működését a telepek szelektív táptalajon (SD-LTH) történő növekedésével, míg a β -galaktozidáz fehérje kifejeződését az enzim aktivitásával tudjuk kimutatni. Az $1,2 \times 10^6$ db transzformáns telep közül 126 növekedett SD-LTH táptalajon, β -galaktozidáz aktivitást viszont csak 21 db telep esetében tudtunk kimutatni. Elvégeztük a kettős pozitív telepek által kódolt cDNS szekvenciák meghatározását. Ez alapján három inverz, két genomi DNS, valamint további hat ál pozitív szekvenciát azonosítottunk. A nem fiziológiás kölcsönhatásokat a más kutató csoportok által azonosított és a <http://www.fccc.edu/research/labs/golemis> internetes oldalon megtalálható eredmények alapján zártuk ki a további vizsgálatokból. Ezek közül öt a szukcinát-koenzim-A-ligáz enzimet, egy pedig a 20 S riboszómális fehérjét kódolta. Tehát tíz valódi pozitív klón maradt csak, amelyek öt különböző génről átíródó cDNS-nek feleltek meg (3. táblázat). A pGBKT7-PPN „csali” vektor felhasználásával összesen öt pozitív telepet azonosítottunk, ezeket mind ellenőriztük. A DNS szekvenálás alapján mind az öt klón azonos génből származott (3. táblázat).

3. táblázat. Az élesztő két-hibrid kísérlet alapján azonosított, *Drosophila* protein foszfatáz Y-nal és N-nel kölcsönható géntermékek.

„Csali” vektor	Kölcsönható fehérje (gén kód)	Független klónok száma	Szekvenálással azonosított nukleotidok száma	Fehérjét alkotó aminosavak száma	A fehérje azonosítása
pGBK T7- -PPY	CG15031	1	614	309	<i>DmVig</i> homológ RNS-kötő fehérje
	CG14884	1	720	327	szignáloszóma CSN5 komponens
	CG4362	6	648	216	homospermidin szintetáz
	CG7255	1	585	870	aminosav transzporter
	CG1553	1	608	834	PP1-kötő fehérje
pGBK T7- -PPN	CG6167	5	620	487	PKC α kölcsönható fehérje

A protein foszfatáz Y-nal kölcsönhatott a CG15031 génről átíródó, Vasa intronikus génnel homológiát mutató, feltételezhetően RNS-kötő fehérje [76], a szignáloszóma CSN5 komponense [77], a homospermidin szintetáz enzim (hat független klónban) (CG4362), egy aminosav transzporter (CG7255), valamint egy PP1-kötőként leírt fehérje (Dr. Bennett Dainmark, nem közölt adat). A PPN esetében egyetlen fehérje kapcsolódását tudtuk kimutatni, ezt viszont 5 független klón is megerősítette. A CG6167 gén terméke közel 65 % homológiát mutat a humán PKC α kölcsönható (PICK1) fehérjével [78].

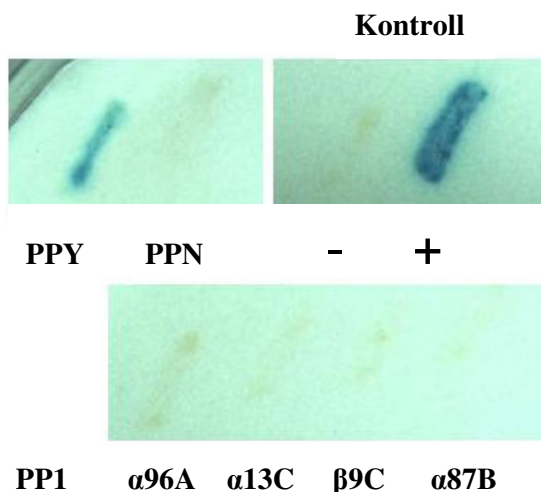
A kölcsönhatások megerősítése érdekében az azonosított kölcsönható fehérjéket és a GAL4 fehérje transzaktivátor doménjét kifejező vektort újratranszformáltuk élesztő sejtekbe, a megfelelő protein foszfatázt a GAL4 DNS-kötő doménnel fúziós formában kifejező vektorral. Mind a hat transzformáns telep kinőtt a megfelelő szelektív táptalajon, és ki tudtuk mutatni a β -galaktozidáz riporter gén működését, ami megerősítette a feltételezett kölcsönhatást.

5.2 A PPY-CG15031 kölcsönhatás megerősítése és specifikitásának igazolása

A további vizsgálatok céljára a CG15031 Celera Genom azonosítóval jelölt (Génbank azonosító: NM_132784) gén termékét a PPY-nal kölcsönható fehérjét választottuk. Southern blot kísérlettel megerősítettük a *Drosophila* Flybase adatbázisban (<http://flybase.bio.indiana.edu/>, *Drosophila melanogaster* genom program 2004. 3.2 verziója) található információt, mely szerint egyetlen CG15031 gén található az *ecetmuslica* genomban. A gén a *Drosophila* X kromoszómájának 13B3 régiójában lokalizálódik. A CG15031 cDNS-t korábban tesztisz könyvtárból izolálták (Berkeley *Drosophila* Genome Project <http://www.fruitfly.org/EST/>). Mivel a PPY is tesztiszben található, a kölcsönhatásnak *in vivo* jelentősége lehet. A kölcsönhatást három független módszerrel is megerősítettük.

5.2.1. Élesztő két-hibrid módszer

A PPY és a CG15031 gén által kódolt fehérje közötti kölcsönhatás specifikását a *Drosophila* specifikus PPN (Génbank azonosító: Y17355) és a PP1 négy különböző izoforma (Génbank azonosítók: NM_080198, NM_080182, NM_079760 és NM_167229) cDNS-ét tartalmazó élesztő két-hibrid vektorok közvetlen transzformálásával ellenőriztük (3. ábra).



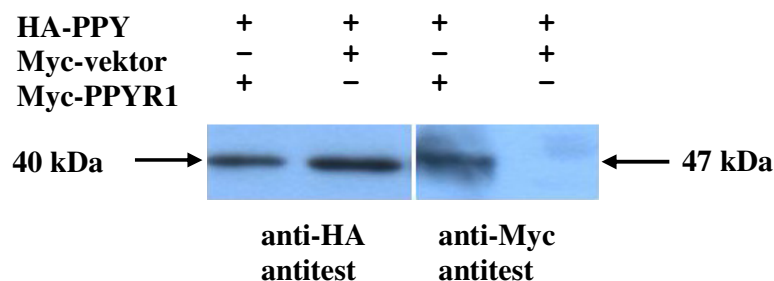
3. ábra. A PPY-CG15031 kölcsönhatás specifikitásának igazolása. A PPY, PPN valamint a PP1 β 9C, PP1 α 13C, PP1 α 87B és a PP1 α 96A protein foszfatáz katalitikus alegység izoformákat az élesztő két-hibrid „csali” vektor a GAL4 DNS-kötő doménnel együtt tartalmazta. Ezen konstruktokat páronként transzformáltuk a CG15031, GAL4 aktivátor domént kifejező plazmival Y190 jelű élesztő törzsbe. A kölcsönhatást β -galaktozidáz enzimaktivitás kimutatásával (kék színű termék) vizsgáltuk. Negatív kontrollként (-) a protein foszfatáz 1 miozin-kötő regulátor alegység és a PPY, pozitív kontrollként (+) pedig az SV40 vírus T antigén és a p53 fehérje együttes kifejezése szolgált.

A 3. ábra alapján megállapíthatjuk, hogy a pozitív kontroll mellett csak a PPY-CG15031 géntermék kombináció esetében tapasztaltunk pozitív β -galaktozidáz aktivitást. A CG15031 a várakozásainknak megfelelően nem kötődött a *Drosophila* protein foszfatáz 1 egyik izoformájához sem élesztő két-hibrid rendszerben, hiszen nem tartalmazza a kötésért felelős konzervált felismerő helyet [34]. A kölcsönhatás specifikitását mutatja, hogy a *Drosophila* testisz specifikus PPN sem lép kapcsolatba a CG15031 fehérjével. Ezen eredmények alapján a CG15031 génterméket elneveztük a PPY elsőnek azonosított regulátor alegységének (PPYR1).

5.2.2. Immunprecipitáció

A PPY-PPYR1 kölcsönhatás további megerősítése érdekében COS-7 emlős sejtekben együtt fejeztük ki a PPY-hemagglutinin fúziós fehérjét (HA-PPY) és a PPYR1 myc epitóp

szekvenciával fuzionált változatát (Myc-PPYR1). Ezt követően immunprecipitációt végeztünk anti-HA antitesttel, majd a precipitátumban a PPY és PPYR1 fehérjéket anti-HA és anti-Myc antitesttel detektáltuk (4. ábra).



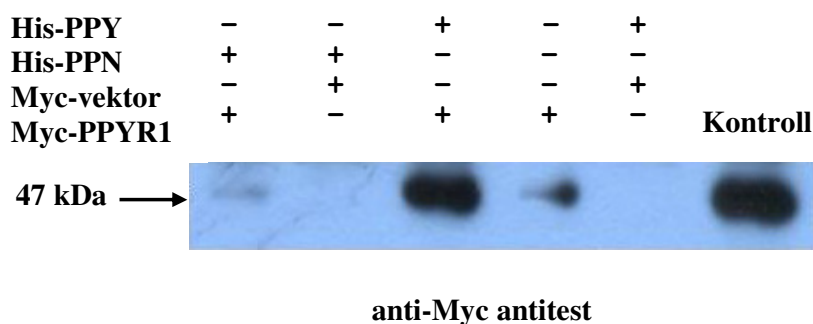
4. ábra. A PPY-PPYR1 kölcsönhatás megerősítése COS-7 emlős sejtekben. Együtt termeltettük a PPY-hemagglutinin fúziós fehérjét (HA-PPY) és a PPYR1-et myc epitóp szekvenciával (Myc-PPYR1) COS-7 emlős sejtekben, 48 órán keresztül. Ezt követően az HA-PPY fehérjét immunprecipitáltuk anti-HA antitesttel és Protein-G-Sepharose gyantához kötöttük az immunkomplexet. A centrifugálással összegyűjtött gyantát 2xSDS mintapufferrel, forrásban lévő vízben inkubáltuk 5 percig. A minták HA-PPY tartalmát anti-HA antitesttel ellenőriztük, és anti-Myc antitesttel mutattuk ki a kapcsolódó Myc-PPYR1-et. Negatív kontrollként az HA-PPY konstruktot transzfektáltuk együtt a Myc-szekvenciát hordozó vektorral.

A HA-PPY mindkét esetben jelen volt a komplexben, a Myc epitóra specifikus antitest azonban csak a rekombináns PPYR1 jelenlétében adott jelet 47 kDa méretnél. Tehát a Myc-PPYR1 a HA-PPY fehérjén keresztül kapcsolódott az immunkomplexhez. A kísérlet eredménye megerősítette a kölcsönhatást a két fehérje között. Az emlős rendszerben kifejezett PPY molekulatömege nagyobb méretűnek bizonyult (40 kDa) a gélelektroforézis során, mint a baktériumban kifejezett fehérje (36 kDa) (v.ö. 6. A ábra). Ez a méretbeli különbség feltételezhetően a PPY eukarióta sejtekben bekövetkező poszttranszlatívus módosításának eredménye lehet.

5.2.3. „Pull-down” kísérlet

A baktériumban termeltetett és affinitáskromatográfiával tisztított PPY fehérjét (His-PPY) hozzáadtuk olyan COS-7 sejtek lizátumához, amelyek nagy mennyiségben termelték a Myc-PPYR1-et. A PPY N-terminális végén elhelyezkedő, hat hisztidinből álló fúziós peptid

lehetővé tette a His-PPY Ni-agaróz gyantához való kötését. Azt, hogy a komplex megkötötte a PPYR1-et is, anti-Myc antitesttel tudtuk kimutatni (5. ábra).

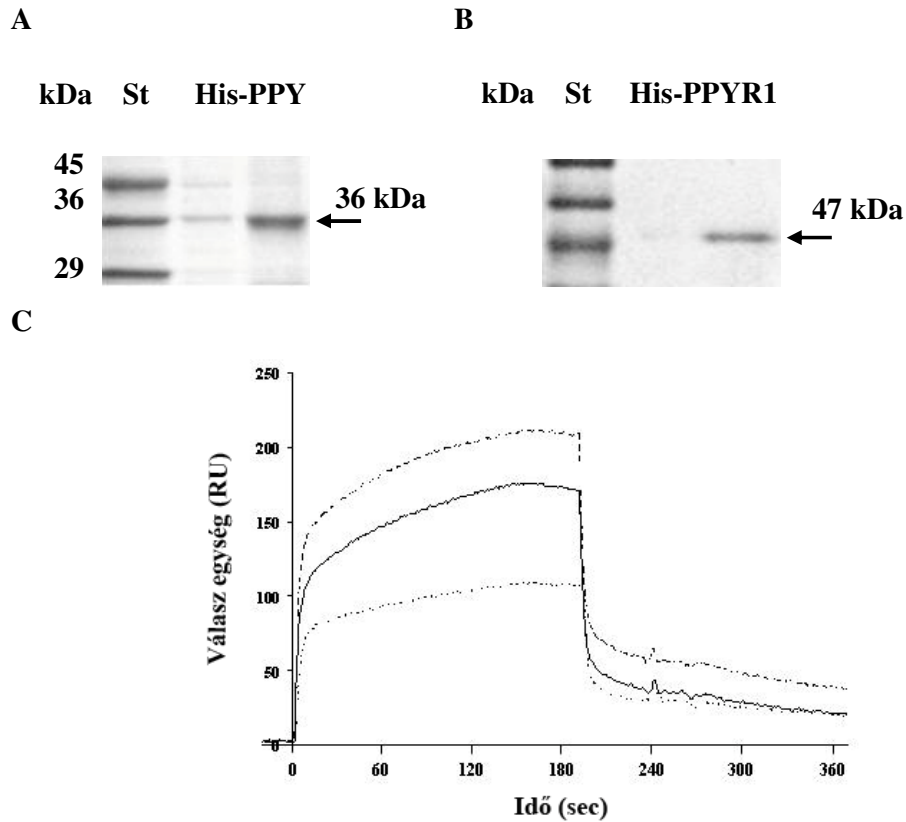


5. ábra. A PPY-PPYR1 kölcsönhatás megerősítése rekombináns fehérjék segítségével. Affinitáskromatográfiával tisztított rekombináns His-PPY vagy His-PPN fehérjét adtunk olyan COS-7 emlős sejtek lizátumához, amelyek a Myc-PPYR1 fehérjét illetve a Myc peptidet termelték (Myc-vektor). A kontroll sáv a Myc-PPYR1-et kifejező sejtek lizátumából készült minta volt. A detektálást Western blot módszerrel végeztük. A rekombináns fehérjék molekulatömegét kilodalton (kDa) egységben tüntettük fel.

A komplex kialakulásának specifikusát igazolja, hogy a His-PPN fehérje nem kötődött a PPYR1-hez. A PPYR1 kismértékben képes a Ni-agaróz gyantához aspecifikusan kapcsolódni, a His-PPN esetében látható gyenge jel ennek a következménye.

5.2.4 Felületi plazmon rezonancia vizsgálat

A *Drosophila* PPY és PPYR1 fehérjéket *E. coli* baktériumban termeltettük, az N-terminálisan elhelyezkedő His-fúziós peptid lehetővé tette a Ni-agaróz affinitáskromatográfiás tisztítást (6. A, B ábra). A His-PPY és His-PPYR1 között kialakuló fizikai kölcsönhatás kinetikáját felületi plazmon rezonancia mérésen alapuló Biacore-X készülékkel vizsgáltuk meg (6. C ábra). A méréseket követően meghatároztuk a két fehérje közötti disszociációs állandót (K_d), amely $(6,2 \pm 1,6) \times 10^{-8}$ M ($n=3$) érték volt. Azonos körülmények között a His-PPN és a His-PPYR1 között a K_d érték sokkal magasabbnak bizonyult $(4,2 \pm 0,6) \times 10^{-4}$ M ($n=3$). A mérések alapján számított disszociációs állandó négy nagyságrenddel volt magasabb a PPN felszínen átáramoltatott PPYR1 esetében a PPY felszínhez képest. Tehát a PPYR1 egy új specifikus PPY-kötő fehérje.



6. ábra. Az *E. coli*-ban termeltetett rekombináns fehérjék kölcsönhatásának vizsgálata. A His-PPY (A) és His-PPYR1 (B) fehérjéket *E. coli* baktériumban termeltettük, és Ni-agaróz affinitáskromatográfiával tisztítottuk. A molekulásúly standard mellett közvetlen elhelyezkedő sáv a mosó frakciót, a másik sáv pedig a 100 mM imidazollal eluált frakciót tartalmazza mindkét ábrarészleten. (C) A PPY-PPYR1 kölcsönhatás kinetikájának meghatározása. A rekombináns His-PPY-t Biacore szenzor chip felszínéhez kötöttük és ezen a felületen áramoltattuk állandó átfolyási sebességgel a His-PPYR1 0,4 μ M (pontozott vonal); 0,5 μ M (folytonos vonal); 0,8 μ M (szaggatott vonal) koncentrációjú mintáját (1-180 sec). Ezután fehérjementes pufferrel mostuk a felületet (181-360 sec). A kapott választ relatív skálán tüntettük fel (RU). Az ábra három független kísérlet egyikének az eredményét mutatja be.

5.3 A rekombináns PPYR1 biokémiai jellemzése

A PPYR1 gén és cDNS szekvenciájának ismeretében egy 309 aminosavból álló fehérje keletkezését jósolhatjuk. Mutációját eddig még nem írták le, a gén funkcióját nem ismerjük. A PPYR1 jellemzése érdekében elvégeztük az *E. coli*-ban expresszált rekombináns protein biokémiai vizsgálatát.

5.3.1 Tömegspektrometria

A baktériumban kifejezett His-PPYR1 aminosav sorrendjét tömegspektrometriával ellenőriztük. A módszer segítségével 28 peptidet azonosítottunk, amely 77%-ban fedte le az általunk várt szekvenciát (7. ábra). A His-PPYR1 fehérje 20 aminosavból álló plazmid szekvenciát tartalmaz az N-terminális részen, ez magában foglalja a hat hisztidin maradékot. Ezt követi a CG15031 gén terméke, ami 277 aminosav hosszúságú. A C-terminális hordoz még egy 15 aminosavból álló plazmid által kódolt szekvenciát is.

```
mgssshhhhhssglvprgshMNVPLVALTKDPKMKSQKSSMVAVPK  
MSQKPQKAARLFQPKVENKITLTTPLTAPKKERVKDIKVADPLEKEVE  
SVFVTVPKNKLCCKTRNRPGDRLFDRRSGS*KRTGVKAVEKRNAGAAH  
NWGSIQQEIDLRLQRTNLRTEFGMKLPKVSFVYDYDSSEETEQYTLDE  
WRAMQAQKKQVLNKFIMSDFGTKKEVTGGSEETVRAEGSGDTLDTKGL  
DKTGGTEQTGNTETGERSAGSGETEATAASGVPDASGGSGGTEGSGGL  
GGSGELEDDGgrtrappppplrsgc
```

7. ábra. A His-PPYR1 aminosav szekvenciája. A MALDI-TOF tömegspektrometriával azonosított szekvenciát aláhúzással, a jósolt RNS-kötő domént dőlt betűvel, a feltételezhető foszforilációs helyet csillaggal, a cAMP-függő protein kináz felismerő helyét, pedig vastag-dőlt betűvel jelöltük. A C-terminálison elhelyezkedő heptapeptid ismétlődéseket szürke háttérben tüntettük fel. A vektor által kódolt szekvenciát kisbetűk jelölik.

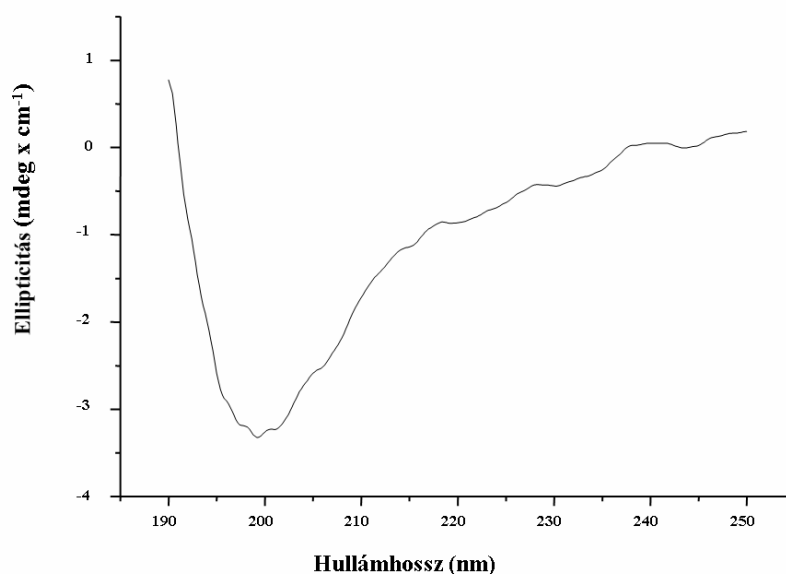
A rekombináns PPYR1 elsődleges szerkezete tehát megegyezett a cDNS által kódolt fehérje aminosav sorrendjével, és alkalmas volt a fehérje *in vitro* biokémiai jellemzésére.

5.3.2. SDS poliakrilamid gélelektroforézis

A His-PPYR1 aminosav szekvenciája alapján a rekombináns fehérje molekulatömegét 33 kDa méretűnek, az izoelektromos pontját pedig 9,4-nek számítottuk az ExPASy nevű program (<http://au.expasy.org>) alkalmazásával. Kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy a rekombináns PPYR1 denaturálódott és kicsapódott, ha az oldat pH-ja 9 fölé emelkedett, tehát a jólt izoelektromos pont értéke igazolást nyert. A kísérletesen, SDS poliakrilamid gélelektroforézissel meghatározott molekulatömeg azonban az emlős sejtekben (4. ábra) és a baktériumban (6. B ábra) termeltetett rekombináns PPYR1 esetében is nagyobbak adódtak (47 kDa), mint a számított érték. A látszólagosan nagyobb molekulatömeg a szerkezeti rendezettséget nem mutató fehérjék egyik jellemző tulajdonsága [79] [80]. A fehérje rendezetlenségét több független módszerrel is alátámasztottuk.

5.3.3 CD spektroszkópia

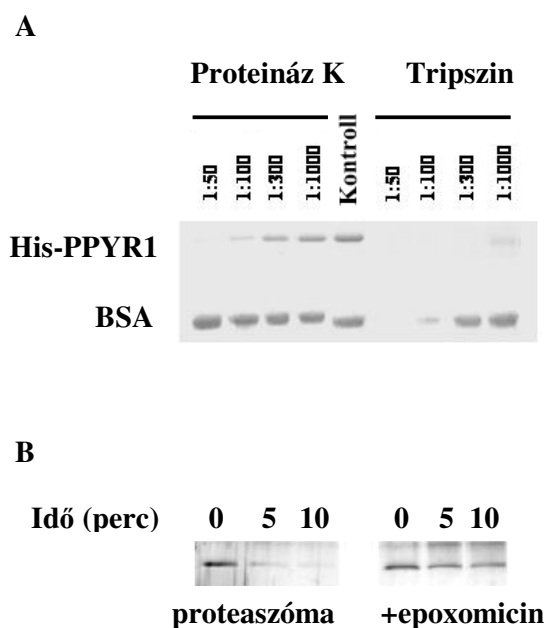
A PPYR1 CD spektrumának vizsgálata alapján (8. ábra) megállapítottuk, hogy a fehérje spektruma 200 nm-nél mutat minimum értéket, és 230 nm hullámhossznál közelít a polarizációs szög a nullához. Ez a kép olyan fehérjékre jellemző, amelyekben nincsenek jól meghatározható, ismétlődő szerkezeti elemek [79].



8. ábra. A His-PPYR1 CD-spektruma. Az ábra öt különböző mérés átlagát mutatja a puffer spektrumának korrekcióba vétele után.

5.3.4 Proteáz érzékenység

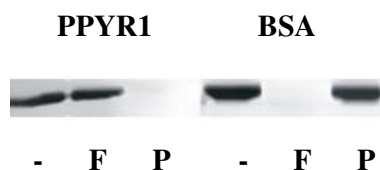
Ismeretes, hogy a rendezetlen fehérjék, jó szubsztrátjai a proteázoknak, mert flexibilis szerkezetük bele tud illeszkedni az enzimek katalitikus zsebébe. Ezért összehasonlítottuk a His-PPYR1 és a BSA érzékenységét a proteináz K és a tripszin enzimekkel szemben (9. A ábra). Azt tapasztaltuk, hogy a PPYR1 lebomlása mindkét esetben sokkal hatékonyabban ment végbe. Másik megfigyelésünk az volt, hogy a 20S proteaszóma ubiquitin módosítás nélkül is hatékonyan bontotta le a PPYR1-et, hasonlóan az alfa-synuklein [81] és p21^{Cip1} [82] rendezetlen fehérjékhez (9. B ábra). Ezt a folyamatot gátolni tudtuk a proteaszóma specifikus inhibitorával, az epoxomicinnel.



9. ábra. A His-PPYR1 proteázok iránti érzékenysége. (A) A His-PPYR1 emésztése tripszin és proteináz K enzimekkel, különböző enzim:szubsztrát arány alkalmazásával, a reakcióidő: 0,5 perc. Az emésztett mintákat SDS-PAGE-vel választottuk el és Coomassie Brilliant Blue G-250 festékkel tettük láthatóvá. Összehasonlításként azonos körülmények között kezelt BSA fehérje látható az ábra alsó részén. A kontroll sáv az emésztetlen fehérjéket tartalmazza. (B) His-PPYR1 emésztése tisztított proteaszómával adalék nélkül és 50 mM epoxomicin jelenlétében.

5.3.5. Hőstabilitás

A legtöbb rendezetlen fehérje hőstabil, mert nem tartalmaz hidrofób központi részt és magas hőmérsékleten is oldható marad. A PPYR1 esetében azt tapasztaltuk, hogy 10 perc forralást követően is változatlanul a felülúszóban maradt. A kontrollként alkalmazott BSA viszont csak a pellet frakcióban volt megtalálható (10. ábra).



10. ábra. A PPYR1 hőstabilitása. 0,05 mg/ml His-PPYR1-et és 0,05 mg/ml BSA-t PBS-ben, 10 percig forraltunk, majd a mintákat 4°C-on centrifugáltuk 100.000xg fordulattal, 10 percig. A kezeletlen (-) mintát, a centrifugálás után kapott felülúszót (F) és pellet (P) frakciókat SDS-PAGE-vel vizsgáltuk.

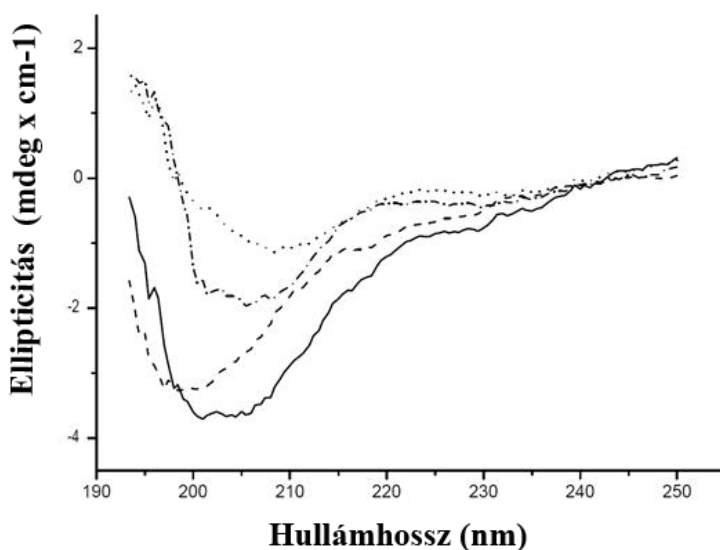
5.4 A PPYR1 RNS kötésének vizsgálata

A PPYR1 elsődleges fehérje szerkezetének összehasonlító vizsgálata egy hialuron/RNS-kötő domént azonosított (7. ábra). Ez megtalálható a hialuron-kötő fehérjében (HABP4) [83] és az 1-es típusú plazminogén aktivátor gátló (PAI-1) mRNS-kötő fehérjében [76], ahol a PAI-1 mRNS stabilitásáért felelős. A domén szerkezet nagymértékű homológiája alapján feltételeztük, hogy a PPYR1 is képes RNS molekulákhoz kapcsolódni.

5.4.1 RNS kötés kimutatása CD-spektroszkópiával

Megvizsgáltuk a rekombináns His-PPYR1 RNS-kötő képességét CD-spektroszkópiás módszerrel. Felvettük külön-külön a His-PPYR1 és a *Drosophila* teljes fehérjementes RNS preparátum CD spektrumát, és ezen értékek összegzéséből számított adatokat

összehasonlítottuk a fehérje-RNS elegy mért CD spektrumával. Azt tapasztaltuk, hogy a számított érték alacsonyabb, mint a kísérletesen meghatározott (11. ábra), tehát a rekombináns PPYR1 *in vitro* kötődni képes az RNS-hez. Azt feltételezzük, hogy egy időleges, gyenge kölcsönhatás alakul ki a fehérje és a ribonukleinsav között.

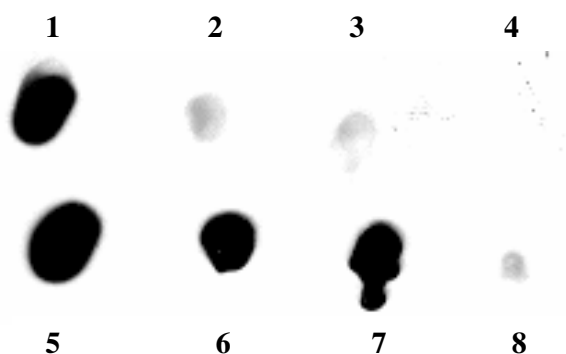


11. ábra. A PPYR1 RNS-kötő képességének vizsgálata CD spektroszkópiával. A His-PPYR1 CD-spektruma (szaggatott vonal), *D. melanogaster* teljes RNS preparátum CD-spektruma (pontozott vonal), His-PPYR1 és az RNS preparátum együttes CD-spektruma (szaggatott-pontozott vonal) polarizációs szög egységben megadva. A számított His-PPYR1 és az RNS preparátum együttes spektrumát a folyamatos vonal mutatja. Minden spektrum öt különböző mérés átlagát mutatja, a puffer spektrumával való korrekció után.

5.4.2 RNS kötés kimutatása dot blottal

Megfigyeltük, hogy a PPYR1 specifikus poliklonális antitest pozitív immunreaktivitást mutat a *Drosophila*-ból izolált teljes RNS mintával szemben (12. ábra). Az RNS minta RNáz vagy proteínáz K kezelését követően is pozitív jelet adott az antitesttel, nem tudtuk viszont kimutatni a PPYR1-et az RNáz emésztést követő proteáz kezelés után. A *Neurospora crassa* eukarióta fonalas gombából izolált teljes RNS preparátum viszont nem adott keresztreakciót a PPYR1 specifikus antitesttel. Ez az eredmény érthető, hiszen az *N. crassa* genomjában nem található a PPYR1-nek megfelelő gén. Azt feltételezzük, hogy a PPYR1 fehérje együtt marad

az RNS molekulával a tisztítás során, és ezt a kapcsolatot csak az RNS lebomlása után lehet megszüntetni (12. ábra).



12. ábra. A PPYR1 RNS-kötő képességének vizsgálata dot blottal. A PPYR1 specifikus antitest pozitív immunreaktivitást mutatott a *Drosophila*-ból izolált 10 µg teljes RNS mintával (5). Nem tudunk hasonló jelet kimutatni sem 10 µg *Drosophila* genom DNS (2), sem 10 µg *Neurospora crassa* teljes RNS (3) preparátumból. A PPYR1 a *Drosophila* RNS RNáz (6) vagy proteináz K (7) kezelése után továbbra is kimutatható volt, csak az RNáz emésztést követő proteináz K emésztés hatására (8) nem kaptunk pozitív reakciót. Kontrollként 180 ng rekombináns His-PPYR1 kezeletlen (1) és proteináz K emésztett (4) mintákat vittünk fel a membránra.

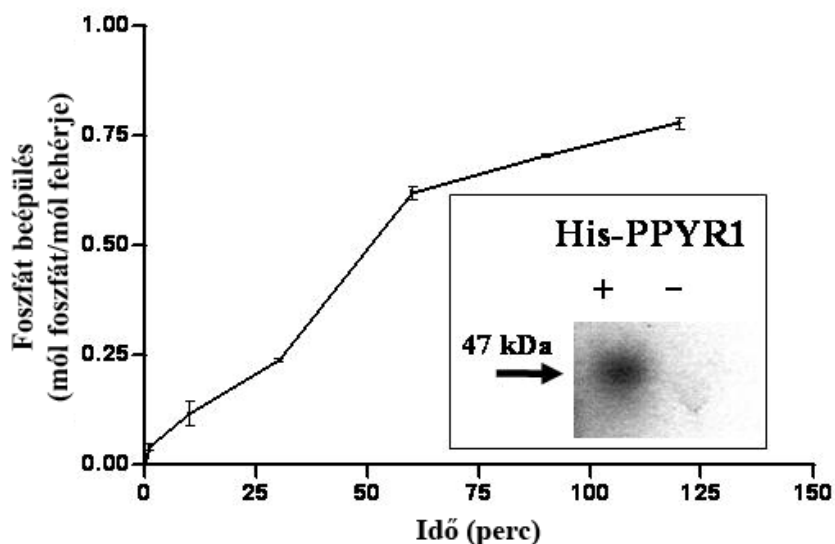
5.5 A PPYR1 egy foszforilálható fehérje

A számítógépes szerkezetvizsgálattal azonosítottunk egy feltételezhető cAMP-függő protein kináz (PKA) foszforilációs helyet a PPYR1 szekvenciában (7. ábra). *In vitro* foszforilációs kísérletben kívántuk bizonyítani, hogy a PKA enzim képes foszfát csoportot kapcsolni a His-PPYR1-hez.

5.5.1 *In vitro* foszforiláció

A rekombináns His-PPYR1-et PKA enzimmel és [γ - 32 P]ATP-vel *in vitro* két óráig inkubálva közel 1 mól foszfát beépülését tudtuk kimutatni 1 mól His-PPYR1 fehérjében (13. ábra). SDS-PAGE-t követő autoradiográfiával egy 47 kDa molekulatömegű sávot azonosítottunk, a

His-PPYR1 nélkül végzett reakciót követően semmilyen jelet sem tudtunk detektálni. A foszfátcsoport tehát a His-PPYR1 fehérjébe épült be.

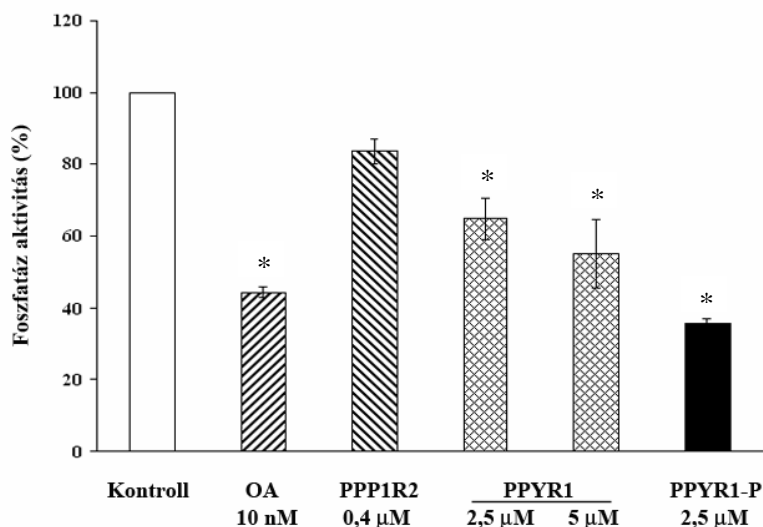


13. ábra. A PPYR1 *in vitro* foszforilációja. A baktériumban termelt His-PPYR1-et marha rekombináns protein kináz A katalitikus alegységgel foszforiláltuk $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ jelenlétében. A fehérjét TCA-val csaptuk le és meghatároztuk a beépült radioaktivitást. A grafikon három független kísérlet eredményének átlagát ábrázolja, a szórás feltüntetésével ($p < 0,05$). A belső ábrarészlet a reakcióelegyből 120 perc elteltével vett mintát (+) ábrázolja, SDS-PAGE és autoradiográfiát követően. (-) a kontroll reakciót jelöli, amely a His-PPYR1 nélkül történt.

5.5.2 A foszforilált PPYR1 hatása a PPY aktivitására

A baculovírus expressziós rendszerben kifejezett PPY aktivitását elsőként Armstrong és munkatársai [29] mérték meg, foszforiláz a és foszfozazein szubsztrát alkalmazásával. A baktériumban termelt His-PPY aktivitásméréshez mielin bázisos fehérje szubsztrátot használtunk, amelyet Posas és munkatársai [73] korábban már felhasználták a *Saccharomyces cerevisiae* PPZ1 új típusú foszfatáz aktivitás méréséhez. Eredményeink összhangban voltak a korábbi megfigyelésekkel, a PPY enzimaktivitás gátolható volt 10 nM okadainsavval, viszont a feleslegben alkalmazott inhibítor-2/PPP1R2 fehérjével nem (14. ábra). Megvizsgáltuk a His-PPYR1 hatását is a PPY aktivitására; a félmaximális gátlást 5 μM koncentrációban fejtette ki a kölcsönható fehérje. Az *in vitro* foszforilált His-PPYR1 ennél kétszer hatékonyabban gátolta

a foszfatázt. Megmértük a PPY aktivitását a foszforilált PPYR1-et használva szubsztrátként (0,42 mg/ml), és azt tapasztaltuk, hogy a specifikus aktivitás alacsonyabb volt ($5,8 \pm 1,4$ U/mg), mint a mielin bázisos fehérje szubsztrát esetében.



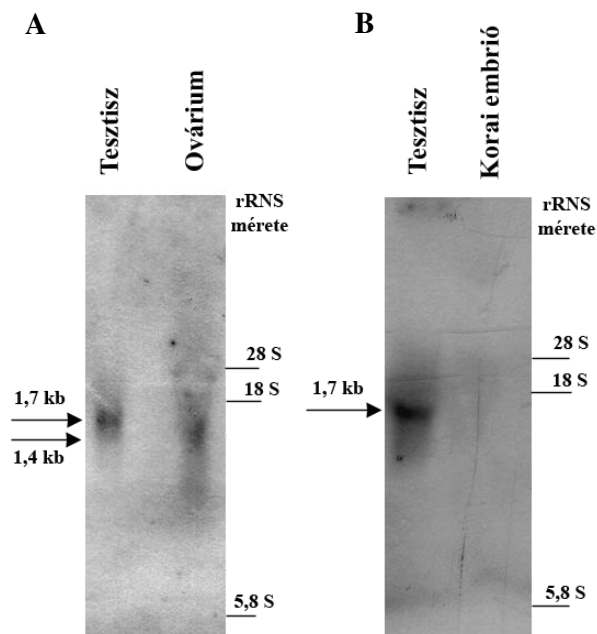
14. ábra. A rekombináns PPY foszfatáz aktivitását mielin bázisos fehérje szubsztrát alkalmazásával mértük. Az okadainsavat (OA) 10 nM, az inhibitor-2 (PPP1R2) fehérjét 0,4 µM, a rekombináns PPYR1-t 2,5 és 5 µM, a PKA-val foszforilált PPYR1-et (PPYR1-P) pedig 2,5 µM koncentrációban alkalmaztuk. Az enzim specifikus aktivitása gátlószerek nélkül 25 U/mg volt, ezt az értéket ábrázoltuk 100%-nak a kontroll esetében. A diagrammon hat független mérés eredményeinek átlagát ábrázoltuk a szórások feltüntetésével. A csillaggal (*) jelölt oszlopok szignifikáns eltérést jelentenek a kontrollhoz képest ($p < 0,05$).

5.6 A PPYR1 mRNS vizsgálata

A PPYR1 funkciójának jobb megismerése érdekében mRNS és fehérje szinten is megvizsgáltuk a géntermék expresszióját. Az mRNS kimutatását Northern hibridizációval, szerv és sejten belüli lokalizációját pedig *in situ* hibridizációval végeztük. A PPYR1 fehérje expresszióját Western blot és immunhisztokémiai módszerekkel határoztuk meg.

5.6.1 Northern blot

A PPYR1 mRNS kimutatására a teljes hosszúságú cDNS kódoló régióját használtuk próbaként. A testiszben egy 1,7 kb, az ováriumban egy 1,4 kb méretű mRNS-t tudtunk kimutatni (15. A ábra). A korai embrióban nem volt kimutatható mennyiségben jelen a PPYR1 mRNS (15. B ábra).

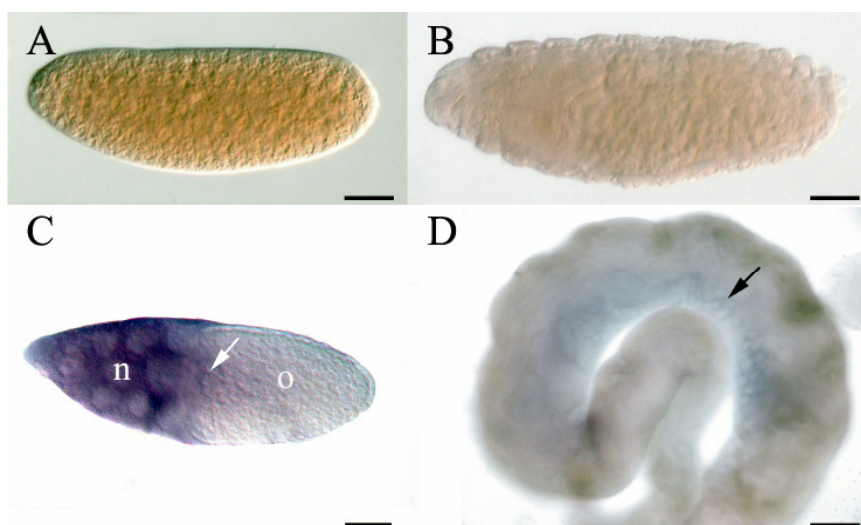


15. ábra. A PPYR1 mRNS szövetspecifikus megjelenése. 30 μ g testisz, 70 μ g ovárium és 30 μ g korai embrió (2. stádium) teljes RNS mintát vizsgáltunk Northern blottal, PPYR1 specifikus cDNS próba alkalmazásával. A sávokat autoradiográfiával mutattuk ki, 7 nap expozíciót követően. A sávok méretét a három rRNS sáv mérete alapján határoztuk meg. Az mRNS-ek mérete közötti különbség két eltérő méretű fehérje keletkezését eredményezheti.

5.6.2 mRNS *in situ* hibridizáció

A PPYR1 mRNS szövetspecifikus kifejeződését a *Drosophila* ivarszervekben *in situ* hibridizációval követtük nyomon. A Northern blot eredményével összhangban a PPYR1 mRNS hiányzott a korai, 2. stádiumú embrióból és a későbbi 17. stádiumú embrióban sem tudtuk kimutatni (16. A és B ábra). A transzkript jelen volt viszont a korai petekamra

szomatikus- és ivarsejtjeiben is (16. C ábra). A PPYR1 mRNS a petekamra follikuláris és dajkasejtjeiben halmozódott fel nagyobb mennyiségben. Megfigyelhető az mRNS sejtplazma áramlással való szállítódása is a dajkasejtekből a 11. stádiumú petesejtbe (16. C ábra). Valószínűleg a PPYR1 mRNS degradálódik a petesejt érése során, mert a korai embrióban már nem tudtuk kimutatni jelenlétét. Erős festődést figyelhettünk meg az elsődleges spermociták sejtplazmájában (16. D ábra), ami a PPYR1 mRNS jelenlétét jelzi a testisz ezen sejtjeiben.



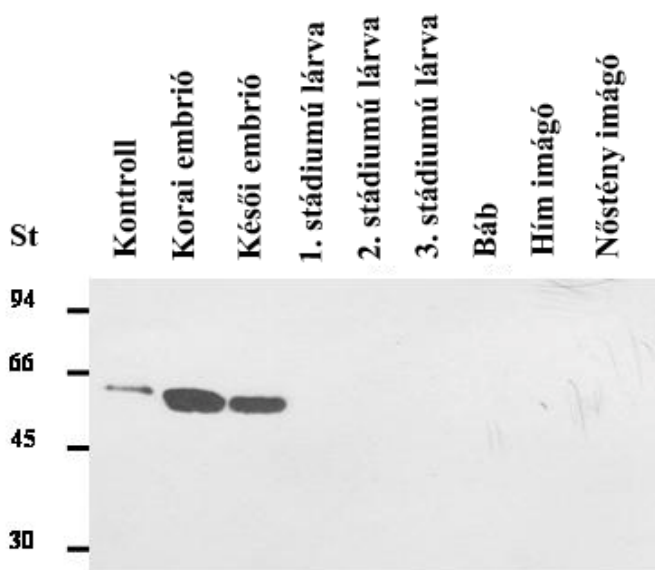
16. ábra. A PPYR1 mRNS expressziója a *Drosophila*-ban. Korai, 2. stádiumú (A), késői, 17. stádiumú (B) embrióban a PPYR1 mRNS mennyisége a kimutathatósági szint alatt volt. (C) A PPYR1 mRNS expressziója a 11. stádiumú petekamra állapotban, o jelöli a petesejtet, n jelöli a dajkasejtet, a fehér nyíl a PPYR1 mRNS bejutását mutatja a petesejtbe a gyors sejtplazma áramlás során. (D) A testiszben az elsődleges spermocitákban (fekete nyíl) volt jelen a PPYR1 mRNS. Az ábrán feltüntetett vonalak 50 μ m-nek felelnek meg.

5.7 A PPYR1 protein expressziós mintázata

5.7.1 A PPYR1 protein expressziója az egyedfejlődés során

A PPYR1 fehérje kifejeződését az ecetmuslica egyedfejlődése során az általunk előállított poliklonális anti-PPYR1 antitesttel vizsgáltuk. Western blot kísérletben a korai, 2. stádiumú embrió esetében erős immunreakciót mutatott egy 47 kDa méretű fehérje, ennek mérete

megegyezett a pozitív kontrollként alkalmazott rekombináns His-PPYR1 fehérjével (17. ábra). A jel erőssége csökkent a késői, 17. stádiumú embrió mintánál, és az egyedfejlődés további lárva, báb, kifejlett imágó stádiumában nem volt kimutatható.



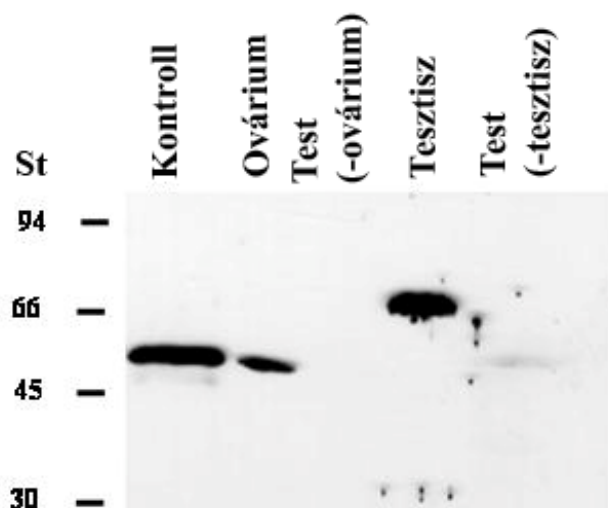
17. ábra. A PPYR1 protein expresszióját a *Drosophila* különböző fejlődési állapotaiban Western blot módszerrel vizsgáltuk. A korai (2. stádiumú), késői (17. stádiumú) embrióból, az első, második és harmadik stádiumú lárvákból, a bábból és a kifejlett hím és nőstény imágókból egyaránt 30 μ g fehérje kivonatot vizsgáltunk SDS-PAGE után a PPYR1 specifikus antitesttel. Pozitív kontrollként a rekombináns His-PPYR1 10 ng mennyiségét használtuk. St: molekulásúly standard (kDa).

Abban az esetben, ha a módszer érzékenységét fokoztuk, az első és a második antitest koncentráció növelésével gyenge jelet kaptunk a báb és a kifejlett egyedek kivonatában is (nem dokumentált eredmény).

5.7.2 A PPYR1 szövetspecifikus expressziója

A PPYR1 kifejeződését elsősorban a reproduktív szervekben vizsgáltuk Western blottal. Az ováriumból készült kivonatban egy 47 kDa méretű fehérjét mutattunk ki (18. ábra), amely méretét tekintve megegyezett az embrióban található fehérjével. A tesziszóól kimutatott fehérje mérete viszont 66 kDa volt, ez az eltérés összhangban van a Northern hibridizációval a

tesztiszből kimutatott mRNS nagyobb méretével. Az ivarszervek eltávolítása után visszamaradt testből nem vagy csak gyengén volt detektálható a jel.



18. ábra. A PPYR1 szövetspecifikus kifejeződése a *Drosophila*-ban. Az ováriumot öt nőstény egyedből, a tesztiszt szintén öt hím egyedből izoláltuk. Az ivarszervek eltávolítása után visszamaradó testeket is vizsgáltuk Western blottal. A pozitív kontroll 50 ng His-PPYR1 fehérje volt. St: molekulásúly standard (kDa).

5.7.3 Immunlokalizáció

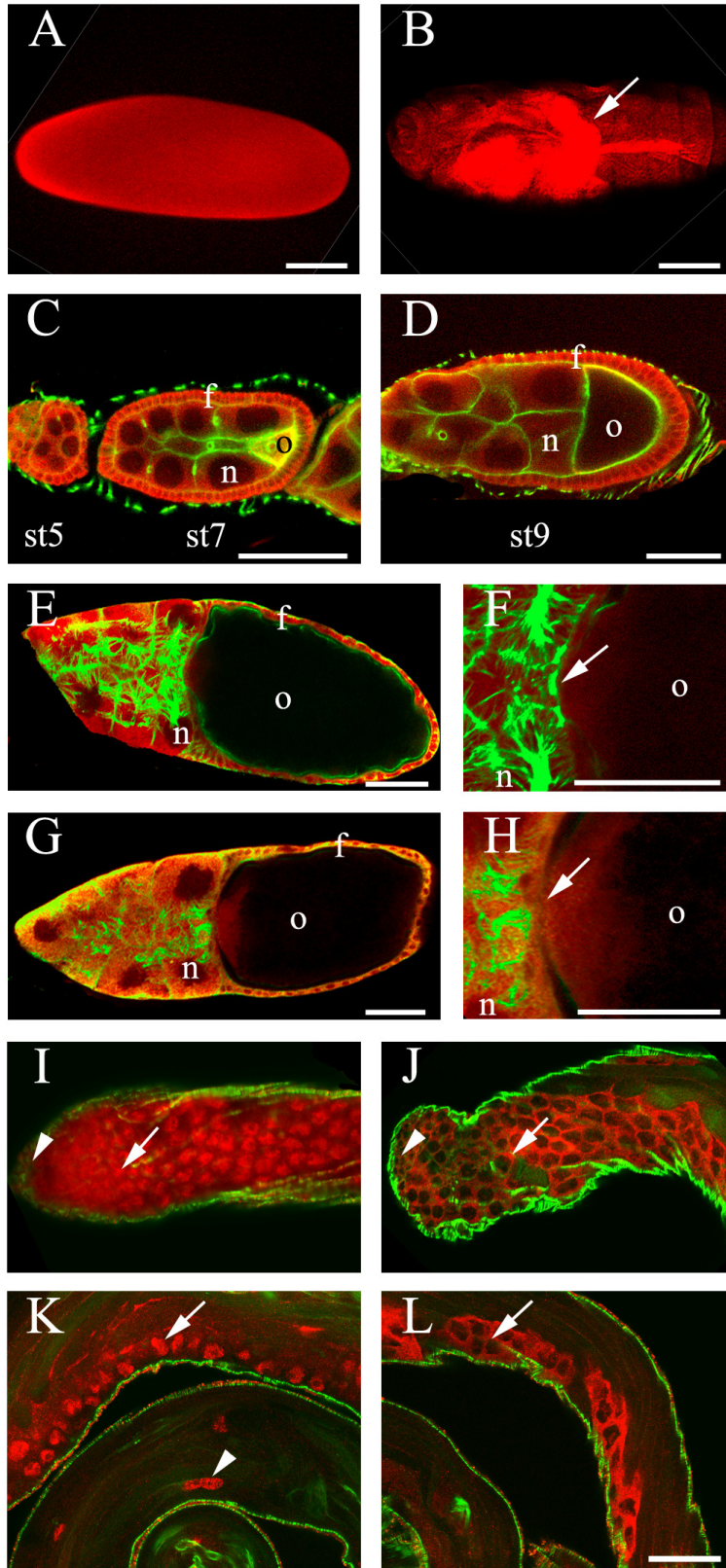
Immunhisztokémiai módszerrel tanulmányoztuk a PPYR1 sejten belüli lokalizációját a *Drosophila* embrióban, az ováriumban és a tesztiszben. Elsőként az anyai eredetű gén termékét mutattuk ki az embrióban és az ováriumban. Az egyedfejlődési Western vizsgálattal összhangban erős jelölődést tapasztaltunk az embrió korai, 2. stádiumában (19. A ábra). A későbbi, 17. stádiumú embrióban a jel erőssége csökkent és elsősorban a kialakuló tápcsatorna területére koncentrált (19. B ábra). A fehérje lokalizációs vizsgálatok azt mutatták, hogy a PPYR1 a petekamra fejlődésének 7. állomásáig a follikuláris sejtekben és az ivarsejtekben egyaránt jelen van (19. C ábra). Magas szinten marad a follikuláris és dajkasejtekben a 9. stádiumú petekamrában, míg a petesejtben lecsökken mennyisége (19. D ábra). A 11. stádiumban teljesen hiányzik a petesejtből a fehérje, és a magasabb felbontás ellenére sem mutatható ki (19. E ábra). A felbontást tovább növelve gyenge festődést láthatunk a dajkasejtekből kiinduló sejtplazma beáramlásának területén (19. F ábra). A PPYR1, tehát a dajkasejtekből fehérje formában szállítódik a petesejtbe, viszont nehezen kimutatható ebben a környezetben. Ezt az ellentmondást a PPYR1 RNS-kötő képessége

alaján tudtuk feloldani [76]. Amennyiben előkezeltük a fixált petekamra preparátumot RNáz enzimmel az immunfestés előtt, a PPYR1 jól festődött kis és nagy felbontás mellett is a 11. stádiumban (19. G és H ábra). Az ivarszerv specifikus Western blot kísérletben kimutattuk, hogy a PPYR1 zigótikus formában is termelődik a tesztiszben, ahol a PPY is jelen van. A két fehérje közötti kölcsönhatás kialakulásának ebben a szervben van fiziológias jelentősége. Immunfestéssel kimutattuk, hogy mindkét fehérje jelen van a tesztisz apikális részén elhelyezkedő csírasejtekben és az elsődleges spermatocitákban is (19. I és J ábra). A PPYR1 elsősorban a sejtek citoplazmájában, a PPY pedig a sejtmagban volt kimutatható. Az antitestek specifikitását a rekombináns és endogén fehérjék közötti kompetíciós Western blot és immunhisztokémiai kísérletekkel igazoltuk (nem dokumentált eredmény). A PPY megtalálható volt a tesztisz ciszta sejteinek magjában is (19. K ábra), ahogy korábban Armstrong és munkatársai [29] leírták, a PPYR1 viszont nem volt jelen ezekben a sejtekben (19. L ábra).

Lásd az ábrát és a magyarázatot a következő oldalon.



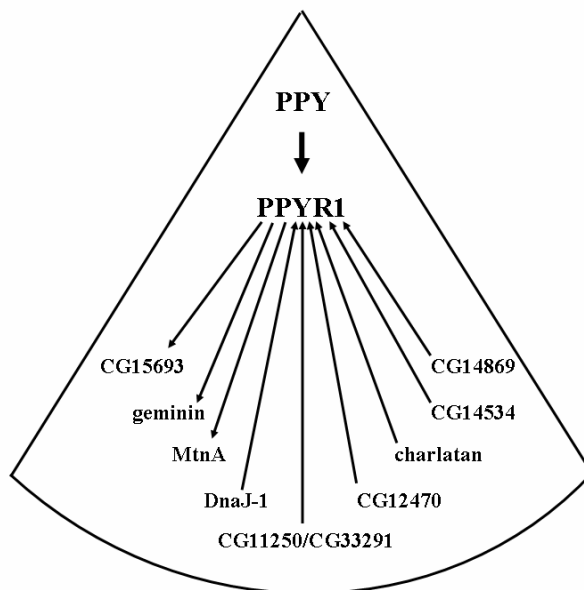
19. ábra. A PPYR1 és PPY fehérjék immunhisztokémiai lokalizációja. (A és B) korai (2. stádiumú) és késői (17. stádiumú) teljes embrió immunfestése, PPYR1 specifikus első antitest és Cy3 jelölt második antitest (piros) felhasználásával. A (B) részen a nyíl az intenzíven festődő tápcsatornát jelöli. (C-E) A PPYR1 (piros) kifejeződése a korai (5-7. stádiumú), a középső (9. stádiumú) és a késői (11. stádiumú) petekamra fejlődése során. A dajkasejtek és a petesejt kapcsolata kis felbontással (E) és nagy felbontással vizsgálva (F), a nyíl a gyengén festődő PPYR1-et mutatja. (G és H) Az RNáz kezelést követően a PPYR1 jól láthatóan festődött a 11. stádiumú petekamra petesejtjében kis és nagy felbontással. A nyíl a dajkasejtekből a petesejtbe áramló sejtplazmát mutatja a (H) képen. Az aktin filamentumok (zöld) FITC-kapcsolt falloidin-nel voltak jelölve. o a petesejt, n a dajkasejt, f a folliculáris sejt a petekamrában. (I és K) A PPY sejtmagi, (J és L) pedig a PPYR1 sejtplazma lokalizációját mutatja a tesztszben. A nyílhegyek az (I) és (J) képen a tesztsz apikális részén lévő csírasejteket, a nyilak pedig az elsődleges spermaticitákat jelölik. A (K) és (L) képeken a nyilak az érett spermaticitákat jelölik. A (K) felvételen a nyílhegy a cisztasejt magját jelöli. A tesztsz immunfestése a petekamrákkal megegyező módon történt. Az ábrán feltüntetett vonalak 50 μm -nek felelnek meg.



6. AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

A PPY és PPN új típusú protein foszfatázok. Elsődleges fehérje szerkezetük a protein foszfatáz 1-hez mutat hasonlóságot (2. ábra), biokémiai tulajdonságaik azonban eltérőek. Az „új” kifejezés evolúciós értelemben is helytálló, hiszen csak a *Drosophila* nemzetségben fordulnak elő és eddig még más rovarokban nem sikerült homológjaikat azonosítani. Génjeik intronmentes szerkezete is arról tanúskodik, hogy korábban kialakult protein foszfatáz gének duplikációjával jöttek létre. Az újonnan kialakult gének termékei új feladatok elvégzésére specializálódnak az élőlényekben, és új regulációs lehetőségeket alakítanak ki. A protein foszfatáz katalitikus alegységek különböző regulátor fehérjékhez kapcsolódnak, így egyetlen foszfatáz eltérő folyamatokban is fontos szerepet tölthet be.

A protein foszfatáz Y és N különlegessége, hogy csak a kifejlett hím muslicák testiszében fordul elő, az itt betöltött szerepüket azonban nem ismerjük. Funkciójuk meghatározása érdekében élesztő két-hibrid módszerrel kerestük a foszfatázok fehérje partnereit. Öt PPY, és egy PPN katalitikus alegységgel kölcsönható fehérjét találtunk. A szintén élesztő két-hibrid módszerrel alapuló, globális fehérje-fehérje kölcsönhatásokat azonosító kutatás [84] a PPN-nel kölcsönhatásban egy további ismeretlen funkciójú CG32365 génterméket azonosított. Ugyanezen szűrés során nem találtak egyetlen PPY-nal kölcsönható fehérjét sem. Az általunk azonosított PPY-hoz kapcsolódó fehérjék eltérő biológiai folyamatokban játszhatnak szerepet (1. táblázat). Az aminosav szekvenciáik összehasonlító vizsgálata alapján nem találtunk olyan közös konzervált régiót, amely felelős lehet az összes kölcsönhatás kialakításáért. A PPY szerepét, tehát az egyes kölcsönható fehérjékkel kapcsolatban külön-külön kell meghatározni. Dolgozatomban a CG15031/PPYR1 fehérje és a PPY kapcsolatát, valamint a PPYR1 szerepét vizsgáltam részletesebben. A PPYR1-ről tudjuk, hogy más fehérjékkel is képes kapcsolatot kialakítani. A PPYR1-et „csaliként” használva Giot és munkatársai [84] a következő kölcsönható partnereket találták (20. ábra): CG15693 nukleinsav-kötő riboszómális fehérje [85], geminin (CG3183), a DNS replikáció negatív szabályozója, és a metallothionein MtnA (CG9470). Más fehérjéket „csaliként” használva a PPYR1 a következőkhöz kapcsolódott: a chaperone aktivitással rendelkező, DnaJ-1 jelű hősokk fehérje (CG10578), a charlatan nevű Zn-ujj tartalmú transzkripciós faktor (CG11798), az ankyrin ismétlődést és PDZ domént tartalmazó CG11250/CG33291 gén termék, CG12470, egy testisz specifikus fehérje, a „wing/hinge” motívumban gazdag DUFZ43 domén fehérje (CG14534) [86], valamint a CG14869 ismeretlen funkciójú gén termék.



20. ábra. A PPYR1 fehérje kölcsönható partnerei Giot és munkatársai [84] és az 1. táblázat alapján összefoglalva. CG15693: nukleinsav-kötő riboszómális fehérje [85], geminin (CG3183): a DNS replikáció negatív szabályozója, MtnA: metallothionein (CG9470). DnaJ-1: chaperone aktivitással rendelkező hősokk fehérje (CG10578), charlatan: Zn-ujj tartalmú transzkripció faktor (CG11798), CG11250/CG33291: ankyrin ismétlődést és PDZ domént tartalmazó gén termék, CG12470: testisz specifikus fehérje, CG14534: „wing/hinge” motívumban gazdag DUFZ43 domén fehérje [86], CG14869: ismeretlen funkciójú gén termék. A nyilak a „csaliként” használt fehérje irányából indulnak a kölcsönható partner felé.

A fehérje-fehérje kölcsönhatásokon alapuló kapcsolatrendszer egy kis szeletét ábrázolja a 20. ábra, ahol a PPYR1 helyezkedik el a központban és különböző funkciójú fehérjékhez képes kapcsolódni. A fehérje-fehérje kölcsönhatások révén feladata lehet a PPY és egyéb fehérjék összekapcsolása illetve a PPY-től független fehérje komplexek kialakítása.

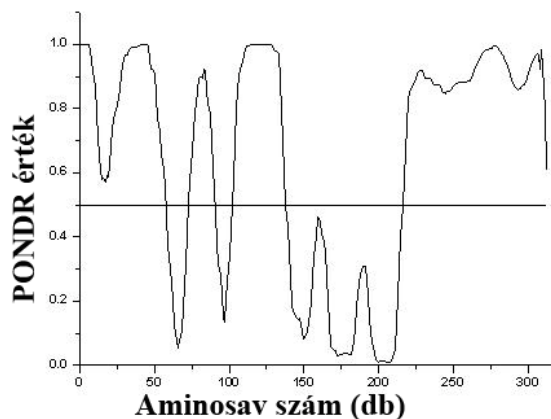
A PPYR1 tehát egy eddig jórészt ismeretlen fehérje. Megismerése érdekében először elvégeztük elsődleges fehérje szerkezetén alapuló összehasonlító vizsgálatát. A PPYR1 szerkezete nagyfokú hasonlóságot mutat más élőlények PAI-1 mRNS-kötő fehérjéihez [76]. Az RNS kötésért felelős régió belül azonosítottunk egy feltételezhető PKA foszforilációs helyet [87]. A fehérje C-terminális részén pedig hat heptapeptid ismétlődést találtunk, ami arra enged következtetni, hogy ez a rész egy rövidebb szekvencia ismétlődésével keletkezett [80]. A szekvencia hasonlóságon túl konzervált RNS-kötő domén nem található a családon

belül, ezért kísérletesen ellenőriztük a PPYR1 RNS-kötő képességét. A CD spektroszkópiás mérések eredményei a His-PPYR1 másodlagos szerkezetének átrendeződésére utaltak az RNS hozzáadását követően. A PPYR1 RNS-kötő képességét támasztja alá az a megfigyelésünk is, hogy a PPYR1 specifikus poliklonális antitest pozitív immunreaktivitást mutatott a *Drosophila*-ból izolált teljes RNS mintával szemben. A petekamra PPYR1 specifikus immunfestése során a fehérje beáramlását a petesejtbe csak RNáz enzimmel való kezelés után tudtuk nyomon követni. Az RNS kapcsolódása a PPYR1-hez valószínűleg lefedi az antitest kötésért felelős epitópot. Ez a megfigyelés egy újabb közvetett bizonyíték a PPYR1 RNS-kötő tulajdonságára. Tehát a PPYR1 nem csak fehérjék közötti kapcsolatok, hanem fehérje-RNS komplexek kialakításában is segédkezhet.

In vitro igazoltuk, hogy a protein kináz A átlagosan közel 1 foszfát csoportot tud beépíteni a PPYR1 molekulába. A foszforiláció nem befolyásolta jelentősen a PPYR1 PPY gátló képességét, így fiziológiás szerepe még felfedezésre vár. Mivel a PPY képes defoszforilálni a PPYR1-et elképzelhető, hogy kapcsolatuk az enzim-szubsztrát viszonyra vezethető vissza.

A PPYR1 aminosav összetétele alapján számított molekulatömegéhez képest (33 kDa) nagyobb méretűnek mutatkozott (47 kDa) SDS-PAGE során. Az eltérés egyik magyarázata a fehérje rendezetlen szerkezete lehet. Az alacsony hidrofób, és magas töltéssel rendelkező aminosav oldalláncok aránya, azt eredményezi, hogy kevesebb SDS molekulához kapcsolódik a fehérje, és lassabban vándorol SDS gélben, mint a rendezett szerkezettel rendelkezők.

Elvégeztük tehát a PPYR1 elsődleges szerkezetének számítógépes analízisét egy rendezetlenséget jósoló program (PONDR; <http://www.pondr.com>) alkalmazásával (21. ábra).



21. ábra. A PPYR1 elsődleges szerkezetének számítógépes elemzése PONDR analízissel. A 0,5 PONDR küszöbérték feletti értékek a fehérje szerkezet rendezetlenségére utalnak.

Azt találtuk, hogy a PPYR1 aminosav maradékainak 76%-ánál hiányzik a rendezett szerkezet. A C-terminális közelében egy közel 100 aminosavból álló összefüggő régiónak a legnagyobb a rendezetlensége, de az N-terminális régió is tartalmaz ilyen szakaszt. A középső rész (150-200 aminosav) központi magja lehet a fehérje ideiglenes rendeződésének [88]. A másodlagos szerkezet kialakulását más fehérjékhez vagy nukleinsavhoz való kapcsolódás indukálhatja [89], ami eredményeink alapján RNS lehet. A feltételezett RNS-kötő szekvencia átmeneti PONDR értékeket mutat, ami lehetőséget biztosít a másodlagos szerkezet átalakulására. Ilyen módon kialakuló kölcsönhatás jellemző a rendezetlen szerkezetű RNS chaperone fehérjékre is [90]. A fehérje szerkezetéből jósolható rendezetlenséget kísérletekkel is igazoltuk. A PPYR1 CD spektruma a rendezetlen szerkezetű fehérjékre jellemző eredményt adott, 200 nm-nél mutat minimum értéket, és 230 nm hullámhossznál közelít a polarizációs szög a nullához [79]. A PPYR1 proteáz enzimekkel szemben sokkal érzékenyebb volt, mint a kontrollként használt BSA, ez is a rendezetlen fehérjék jellemző tulajdonsága [79]. A rekombináns PPYR1-et a 20S proteaszóma ubiquitin módosítás nélkül is hatékonyan bontotta le, hasonlóan az alfa-synuklein [81] és p21^{Cip1} [82] rendezetlen fehérjékhez. Végül a PPYR1 számos rendezetlen fehérjéhez hasonlóan hőstabilnak bizonyult [79].

Eredményeink azt mutatták, hogy a PPYR1 specifikusan kötődik a protein foszfatáz Y-hoz. A Biacore méréssel meghatározott PPY-PPYR1 K_d érték alapján kiszámítottuk, hogy 0,2 μM PPYR1-re van szükség a foszfatáz fél maximális telítéséhez. Ezzel szemben a PPY enzimaktivitás félmaximális gátlásához 5 μM PPYR1 és 2,5 μM foszforilált PPYR1-re volt

szükség. A számítások és a mérések alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a PPYR1 enzimaktivitásra gyakorolt hatását a szubsztrát konformációjának megváltoztatásán keresztül fejt ki. A PPY specifikus aktivitás ($5,8 \pm 1,4$ U/mg) alacsonyabb volt PPYR1 szubsztrát esetében, mint a mielin bázisos fehérje szubsztrát esetében. Azok a megfigyelések, hogy a PPYR1 nem bizonyult hatékony foszfatáz inhibitornak és jó szubsztrátnak, mozgékony szerkezettel rendelkezik és változatos funkciójú fehérjékkel hat kölcsön, arra enged következtetni, hogy elsősorban összekapcsoló szerepe lehet fehérje-fehérje, illetve fehérje-RNS kölcsönhatásokban.

A PPYR1 mRNS expresszióját megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az ováriumban és a tesztiszben egyaránt megtalálható a transzkript, azonban az embrió korai és késői stádiumából is hiányzott. A fehérje viszont a *Drosophila* egyedfejlődésének embrió stádiumában van jelen legnagyobb mennyiségben. A lárva stádiumokban egyáltalán nem, a báb és kifejlett imágóban csak a Western blot érzékenységének fokozásával tudtuk kimutatni. Ezek szerint a PPYR1 fehérje a *Drosophila* egyedfejlődésének korai szakaszában az ováriumban termelődik, és innen jut be a petesejtbe, amelyből később az embrió kialakul. A PPYR1 előfordulása az embrióban és az ováriumban a fehérje eddig még nem ismert, PPY-től független funkciójára hívta fel a figyelmet. Az embrión és ováriumon végzett immunhisztokémiai jelölések azt mutatták, hogy a PPYR1 nagy mennyiségben termelődik az ovárium follikuláris és dajka sejtjeiben. Ez utóbbiból sejt plazma áramlással jut be a petesejtbe és mennyisége magas szinten marad a korai, 2. stádiumú embrióban, a szervi differenciálódás során a kialakuló tápcsatorna területére koncentrálódik a késői 17. stádiumú embrióban.

A szervspecifikus vizsgálatok során a PPYR1 antitest az ováriumban egy 47 kDa méretű, a tesztiszben egy 66 kDa méretű PPYR1 formát azonosított. Az ováriumban egy kisebb (1,4 kb), míg a tesztiszben egy nagyobb (1,7 kb) méretű mRNS-t mutattunk ki, ami lehetővé teszi az ováriumban és a tesztiszben az eltérő méretű fehérjék képződését. Az egyik lehetséges magyarázat, hogy egy génről kétfajta méretű fehérje is képződik, az alternatív promóter használat. A *gonadal* gén esetében is megfigyelték, hogy egy 193 aminosavból álló fehérje található a nőstény csírasejtjeiben és egy rövidebb, mindössze 39 aminosav hosszúságú forma van jelen a tesztiszben [91]. A *cheerio* és *dystrophin* gének is tartalmaznak egy belső promóter szekvenciát, amely lehetővé teszi egy génről két különböző méretű mRNS képződését [92] [93].

A PPYR1 zigótikus formája a kifejlett *Drosophila* hímek tesztiszében képződik. A PPYR1 a tesztisz apikális részén elhelyezkedő csírasejtek és az elsődleges spermatociták plazmájában mutatott erőteljes festődést. A PPY lokalizációjára vonatkozóan Armstrong és

munkatársai [29] megállapították, hogy a PPY fehérje a herében a cisztasejtek sejtmagjában akkumulálódik. Eredményeiket részben megerősítik saját kísérleteink, amelyek szerint a PPY valóban sejtmagi lokalizációt mutat, és a herén belül a cisztasejtekben is előfordul, azonban azt is kimutattuk, hogy a PPY mRNS, ill. fehérje a fejlődés korai stádiumában a spermaticitákban is megtalálható. A két fehérje (PPY és PPYR1) előfordulása az azonos típusú sejtekben lehetőséget biztosít a sejtplazmában a foszfatáz szintézisét követő, *in vivo* kölcsönhatás kialakulására.

Tehát a PPYR1 egymástól különböző anyai és zigotikus formában fejeződik ki a *Drosophila*-ban. Az eltérő lokalizáció és eltérő PPY specifikus kölcsönhatás alapján a két forma különböző funkcióját feltételezhetjük. Az evolúció során később megjelenő PPY a már meglévő PPYR1 fehérjével kölcsönhatásban új regulációs folyamat megvalósítására specializálódhatott a testiszben. A *Saccharomyces cerevisiae* PPZ1 új típusú foszfatázzal kölcsönható HAL3 fehérjéről tudjuk, hogy a foszfatáz katalitikus alegység hatékony inhibitora és az élesztősejtek sóháztartásának szabályozásában vesz részt [59]. Emellett megfigyelték más folyamatokban is a szerepét, a HAL3 fehérje fontos az élesztő sejtciklusának G1-ből az S fázisba történő átmenet szabályozásában, valamint képes fokozni a koenzim A bioszintézisét is [94], az utóbbi feladatot azonban a foszfatáztól független módon hajtja végre. Tehát az általunk megfigyelt jelenség, hogy a PPYR1 több feladat elvégzéséért is felelős lehet nem egyedülálló a protein foszfatáz regulátorok között. Egy adott fehérje egymástól független úgynevezett „moonlighting” aktivitását szélesebb körben is megfigyelték [95]; ez a jelenség különösen gyakori az eredendően rendezetlen szerkezetű fehérjék körében.

7. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

A PPY és PPN *Drosophila* specifikus, új típusú protein foszfatázok. Leírták az őket kódoló géneket és vannak adatok a génről átíródó fehérjékre vonatkozóan is, de biológiai szerepük eddig még ismeretlen. Nem ismerjük ezen új típusú protein foszfatázok kölcsönható fehérjéit sem, amelyek funkciójából következtetni lehetne az enzimek szerepére. Előkísérleteink során élesztő két-hibrid módszerrel azonosítottunk öt, a PPY-nal, és egy, a PPN-nel kölcsönható fehérjét. További vizsgálatainkban az egyik PPY-nal kölcsönható fehérjét, a PPYR1-et vizsgáltuk meg részletesebben. A PPY és a PPYR1 specifikus kapcsolódását több független módszerrel: immunprecipitációval, “pull-down” kísérlettel és felületi plazmon rezonanciával is alátámasztottuk. SDS-PAGE során mutatott anomáliás mozgékonyága, CD-spektruma, proteázok iránti érzékenysége és hőstabilitása arra utal, hogy a rekombináns PPYR1 az eredendően rendezetlen szerkezetű fehérjék közé tartozik. A PPYR1 aminosav sorrendje alapján 40% homológiát mutat a PAI-1 mRNS-kötő fehérjékkel. Kísérleteink igazolták a PPYR1 *in vitro* RNS-kötő képességét. A PPYR1 tartalmaz egy protein kináz A felismerő helyet az RNS-kötő régióban. Igazoltuk, hogy a protein kináz A *in vitro* körülmények között képes foszforilálni a rekombináns PPYR1-et. Azt találtuk, hogy sem a foszforilált, sem a nem foszforilált forma nem tekinthető a PPY foszfatáz hatékony gátlószerének. Biokémiai vizsgálataink alapján a PPYR1 feladata valószínűleg az lehet, hogy a PPY-t összekapcsolja más fehérjékkel, illetve RNS-sel.

A PPYR1 mRNS-t a kifejlett *ecetmuslica* testiszében és ováriumában mutattuk ki. A PPYR1 fehérjét ezen kívül korai embriókban is megtaláltuk. Immunhisztokémiai módszerrel igazoltuk, hogy a PPYR1 az ováriumban a dajkasejtekből jut be a petesejtbe. Valószínűleg ez az anyai eredetű fehérje kerül az embriókba. Feltételezzük, hogy a PPYR1 RNS-hez kapcsolódva fejt ki hatását az embrionális fejlődés korai szakaszában. A *Drosophila* testiszében az anyai géntermékhez képest egy nagyobb méretű zigotikus fehérjét detektáltunk. A PPYR1 fehérjét a PPY-nal együtt megtaláltuk a testisz apikális részén elhelyezkedő csírarsejtekben és az elsődleges spermaticitákban is. A két fehérje együttes előfordulása az azonos típusú sejtekben lehetőséget biztosít az *in vivo* kölcsönhatás kialakulására. Kísérleteink szerint tehát a PPYR1 anyai eredetű és zigotikus formái egymástól különböző szerepet játszhatnak a *Drosophila* sperma, illetve embrió fejlődésében.

8. SUMMARY

PPY and PPN are two novel *Drosophila* specific protein phosphatases. Although the genes and gene products of the two phosphatases have been described their physiological role remained an open question. The lack of information on the interacting partners of the phosphatases, would suggest a physiological role for these enzymes. In our preliminary experiments we identified five proteins that interact with PPY and one interacting protein of PPN. In our subsequent work we selected one of the PPY interacting proteins, termed PPYR1, for more detailed investigation. The specific interaction between PPY and PPYR1 has been confirmed by several independent methods including immunoprecipitation, “pull-down” experiment, and surface plasmon resonance spectroscopy. Based on its abnormal mobility in SDS-PAGE, CD-spectrum, sensitivity to proteases, and heat stability we concluded that PPYR1 was an intrinsically unstructured protein. The primary structure of PPYR1 has 40 % homology with that of PAI-1, an mRNA-binding protein. We demonstrated the RNA-binding capacity of PPYR1 by *in vitro* experiments. We found a protein kinase A recognition site in the RNA-binding region. We confirmed that protein kinase A indeed phosphorylates recombinant PPYR1 under *in vitro* conditions. We found that neither the phosphorylated nor the dephosphorylated form of PPYR1 acted as an efficient inhibitor of the PPY phosphatase. According to its biochemical chemical properties PPYR1 can function as a scaffold for the organization of protein and RNA complexes with PPY.

The mRNA of PPYR1 was detected in the testis and ovarium of the adult fruit flies. In addition, PPYR1 protein was found in the early *Drosophila* embryos. The transport of PPYR1 from the nurse cells to the oocyte in the egg chamber was proven by immunohistochemical methods. It is likely that the protein of maternal origin accumulates in the embryos. We suggest that RNA-bound PPYR1 is important in the early development of the embryo. In the testis of *Drosophila* we observed a zygotic form of PPYR1 that has a larger molecular mass than the maternal gene product. PPYR1 and PPY proteins were localized in the small germ cells and in the early spermatocytes at the apical tip of the testis. The colocalisation of the two proteins in the same cell types makes their *in vivo* interaction possible. According to our experimental results PPYR1 has two different forms; the maternal and zygotic proteins which play different roles in the development of sperm cells or the embryos.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. P.J.Kennelly (2002). Protein kinases and protein phosphatases in prokaryotes: a genomic perspective. *FEMS Microbiol.Lett.* **206**, 1-8.
2. P.J.Kennelly Archaeal protein kinases and protein phosphatases: insights from genomics and biochemistry. *Biochem.J.* %2003.Mar.1;370.(Pt.2):373.-89.
3. G.Manning, G.D.Plowman, T.Hunter, S.Sudarsanam (2002). Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem.Sci.* **27**, 514-520.
4. A.J.Cozzone, M.El-Mansi (2005). Control of isocitrate dehydrogenase catalytic activity by protein phosphorylation in Escherichia coli. *J.Mol.Microbiol.Biotechnol.* **9**, 132-146.
5. D.Barford, S.H.Hu, L.N.Johnson (1991). Structural mechanism for glycogen phosphorylase control by phosphorylation and AMP. *J.Mol.Biol.* **218**, 233-260.
6. T.Hunter (1995). Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **80**, 225-236.
7. P.T.W.Cohen. Overview of protein serine/threonine phosphatases. 5, 1-20. 2004. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
Ref Type: Generic
8. P.T.W.Cohen (1997). Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem.Sci.* **22**, 245-251.
9. E.B.Fauman, M.A.Saper (1996). Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. *Trends Biochem.Sci.* **21**, 413-417.
10. J.M.Denu, J.E.Dixon Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Curr.Opin.Chem.Biol.* %1998.Oct.;2(5):633.-41.
11. T.S.Ingebritsen, P.Cohen (1983). Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science* **221**, 331-338.

12. da Cruz e Silva OB, da Cruz e Silva EF, P.T.Cohen (1988). Identification of a novel protein phosphatase catalytic subunit by cDNA cloning. *FEBS Lett.* **242**, 106-110.
13. K.T.Arndt, C.A.Styles, G.R.Fink (1989). A suppressor of a HIS4 transcriptional defect encodes a protein with homology to the catalytic subunit of protein phosphatases. *Cell* **56**, 527-537.
14. V.Dombradi, J.M.Axton, D.M.Glover, P.T.Cohen (1989). Molecular cloning and chromosomal localization of a novel Drosophila protein phosphatase. *FEBS Lett.* **247**, 391-395.
15. V.Dombradi, P.T.Cohen (1992). Protein phosphorylation is involved in the regulation of chromatin condensation during interphase. *FEBS Lett.* **312**, 21-26.
16. C.G.Armstrong, V.Dombradi, D.J.Mann, P.T.Cohen (1998). Cloning of a novel testis specific protein serine/threonine phosphatase, PPN 58A, from Drosophila melanogaster. *Biochim.Biophys.Acta* **1399**, 234-238.
17. J.Arino (2002). Novel protein phosphatases in yeast. *Eur.J.Biochem.* **269**, 1072-1077.
18. M.X.Chen, Y.H.Chen, P.T.Cohen (1992). Polymerase chain reactions using Saccharomyces, Drosophila and human DNA predict a large family of protein serine/threonine phosphatases. *FEBS Lett.* **306**, 54-58.
19. Kokai E, Gausz J., Dombrádi V., *, Biochemical and genetic characterization of protein phosphatases in *Drosophila melanogaster*. Protein Modules in Cellular Signalling, IOS Press, 2001, pp. 222-231.
20. A.B.Carvalho, B.A.Dobo, M.D.Vibrantovski, A.G.Clark (2001). Identification of five new genes on the Y chromosome of Drosophila melanogaster. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 13225-13230.
21. J.Vinos, K.Jalink, R.W.Hardy, S.G.Britt, C.S.Zuker (1997). A G protein-coupled receptor phosphatase required for rhodopsin function. *Science* **277**, 687-690.
22. J.M.Axton, V.Dombradi, P.T.Cohen, D.M.Glover (1990). One of the protein phosphatase 1 isoenzymes in Drosophila is essential for mitosis. *Cell* **63**, 33-46.

23. V.Dombradi, J.M.Axton, H.M.Barker, P.T.Cohen (1990). Protein phosphatase 1 activity in *Drosophila* mutants with abnormalities in mitosis and chromosome condensation. *FEBS Lett.* **275**, 39-43.
24. K.Baksa, H.Morawietz, V.Dombradi, M.Axton, H.Taubert, G.Szabo, I.Torok, A.Udvardy, H.Gyurkovics, B.Szoor, . (1993). Mutations in the protein phosphatase 1 gene at 87B can differentially affect suppression of position-effect variegation and mitosis in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **135**, 117-125.
25. Z.Asztalos, W.J.von, G.Wustmann, V.Dombradi, J.Gausz, H.C.Spatz, P.Friedrich (1993). Protein phosphatase 1-deficient mutant *Drosophila* is affected in habituation and associative learning. *J.Neurosci.* **13**, 924-930.
26. S.Raghavan, I.Williams, H.Aslam, D.Thomas, B.Szoor, G.Morgan, S.Gross, J.Turner, J.Fernandes, K.VijayRaghavan, L.Alphey (2000). Protein phosphatase 1beta is required for the maintenance of muscle attachments. *Curr.Biol.* **10**, 269-272.
27. N.Vereshchagina, D.Bennett, B.Szoor, J.Kirchner, S.Gross, E.Vissi, H.White-Cooper, L.Alphey (2004). The essential role of PP1beta in *Drosophila* is to regulate nonmuscle myosin. *Mol.Biol.Cell* **15**, 4395-4405.
28. H.A.Snaith, C.G.Armstrong, Y.Guo, K.Kaiser, P.T.Cohen (1996). Deficiency of protein phosphatase 2A uncouples the nuclear and centrosome cycles and prevents attachment of microtubules to the kinetochore in *Drosophila* microtubule star (mts) embryos. *J.Cell Sci.* **109 (Pt 13)**, 3001-3012.
29. C.G.Armstrong, D.J.Mann, N.Berndt, P.T.Cohen (1995). *Drosophila* PPY, a novel male specific protein serine/threonine phosphatase localised in somatic cells of the testis. *J.Cell Sci.* **108 (Pt 11)**, 3367-3375.
30. R.E.Honkanen, T.Golden (2002). Regulators of serine/threonine protein phosphatases at the dawn of a clinical era? *Curr.Med.Chem.* **9**, 2055-2075.
31. P.T.Cohen (2002). Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J.Cell Sci.* **115**, 241-256.

32. D.K.Morrison, M.S.Murakami, V.Cleghon (2000). Protein kinases and phosphatases in the Drosophila genome. *J.Cell Biol.* **150**, F57-F62.
33. V.Dombradi. Protein phosphatase 1. 5, 21-42. 2004. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
Ref Type: Generic
34. M.P.Egloff, D.F.Johnson, G.Moorhead, P.T.Cohen, P.Cohen, D.Barford (1997). Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *EMBO J.* **16**, 1876-1887.
35. V.Janssens, J.Goris (2001). Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem.J.* **353**, 417-439.
36. F.Rusnak, P.Mertz (2000). Calcineurin: form and function. *Physiol Rev.* **80**, 1483-1521.
37. M.J.Hubbard, P.Cohen (1993). On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem.Sci.* **18**, 172-177.
38. M.C.Faux, J.D.Scott (1996). More on target with protein phosphorylation: conferring specificity by location. *Trends Biochem.Sci.* **21**, 312-315.
39. J.Chen, R.T.Peterson, S.L.Schreiber (1998). Alpha 4 associates with protein phosphatases 2A, 4, and 6. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **247**, 827-832.
40. M.Nanahoshi, Y.Tsujishita, C.Tokunaga, S.Inui, N.Sakaguchi, K.Hara, K.Yonezawa (1999). Alpha4 protein as a common regulator of type 2A-related serine/threonine protein phosphatases. *FEBS Lett.* **446**, 108-112.
41. S.Kloeker, B.E.Wadzinski (1999). Purification and identification of a novel subunit of protein serine/threonine phosphatase 4. *J.Biol.Chem.* **274**, 5339-5347.
42. T.Wada, T.Miyata, R.Inagi, M.Nangaku, M.Wagatsuma, D.Suzuki, B.E.Wadzinski, K.Okubo, K.Kurokawa (2001). Cloning and characterization of a novel subunit of protein serine/threonine phosphatase 4 from mesangial cells. *J.Am.Soc.Nephrol.* **12**, 2601-2608.

43. C.J.Hastie, G.K.Carnegie, N.Morrice, P.T.Cohen (2000). A novel 50 kDa protein forms complexes with protein phosphatase 4 and is located at centrosomal microtubule organizing centres. *Biochem.J.* **347 Pt 3**, 845-855.
44. M.C.Hu, Q.Tang-Oxley, W.R.Qiu, Y.P.Wang, K.A.Mihindukulasuriya, R.Afshar, T.H.Tan (1998). Protein phosphatase X interacts with c-Rel and stimulates c-Rel/nuclear factor kappaB activity. *J.Biol.Chem.* **273**, 33561-33565.
45. G.K.Carnegie, J.E.Sleeman, N.Morrice, C.J.Hastie, M.W.Peggie, A.Philp, A.I.Lamond, P.T.Cohen (2003). Protein phosphatase 4 interacts with the Survival of Motor Neurons complex and enhances the temporal localisation of snRNPs. *J.Cell Sci.* **116**, 1905-1913.
46. K.A.Mihindukulasuriya, G.Zhou, J.Qin, T.H.Tan (2004). Protein phosphatase 4 interacts with and down-regulates insulin receptor substrate 4 following tumor necrosis factor-alpha stimulation. *J.Biol.Chem.* **279**, 46588-46594.
47. M.S.Chen, A.M.Silverstein, W.B.Pratt, M.Chinkers (1996). The tetratricopeptide repeat domain of protein phosphatase 5 mediates binding to glucocorticoid receptor heterocomplexes and acts as a dominant negative mutant. *J.Biol.Chem.* **271**, 32315-32320.
48. A.M.Silverstein, M.D.Galigniana, M.S.Chen, J.K.Owens-Grillo, M.Chinkers, W.B.Pratt (1997). Protein phosphatase 5 is a major component of glucocorticoid receptor.hsp90 complexes with properties of an FK506-binding immunophilin. *J.Biol.Chem.* **272**, 16224-16230.
49. J.Shao, S.D.Hartson, R.L.Matts (2002). Evidence that protein phosphatase 5 functions to negatively modulate the maturation of the Hsp90-dependent heme-regulated eIF2alpha kinase. *Biochemistry* **41**, 6770-6779.
50. S.Zhao, A.Sancar (1997). Human blue-light photoreceptor hCRY2 specifically interacts with protein serine/threonine phosphatase 5 and modulates its activity. *Photochem.Photobiol.* **66**, 727-731.

51. V.Ollendorff, D.J.Donoghue (1997). The serine/threonine phosphatase PP5 interacts with CDC16 and CDC27, two tetratricopeptide repeat-containing subunits of the anaphase-promoting complex. *J.Biol.Chem.* **272**, 32011-32018.
52. K.Morita, M.Saitoh, K.Tobiume, H.Matsuura, S.Enomoto, H.Nishitoh, H.Ichijo (2001). Negative feedback regulation of ASK1 by protein phosphatase 5 (PP5) in response to oxidative stress. *EMBO J.* **20**, 6028-6036.
53. G.Zhou, T.Golden, I.V.Aragon, R.E.Honkanen (2004). Ser/Thr protein phosphatase 5 inactivates hypoxia-induced activation of an apoptosis signal-regulating kinase 1/MKK-4/JNK signaling cascade. *J.Biol.Chem.* **279**, 46595-46605.
54. Y.Yamaguchi, H.Katoh, K.Mori, M.Negishi (2002). Galpha(12) and Galpha(13) interact with Ser/Thr protein phosphatase type 5 and stimulate its phosphatase activity. *Curr.Biol.* **12**, 1353-1358.
55. J.L.Tomsig, S.L.Snyder, C.E.Creutz (2003). Identification of targets for calcium signaling through the copine family of proteins. Characterization of a coiled-coil copine-binding motif. *J.Biol.Chem.* **278**, 10048-10054.
56. A.Ali, J.Zhang, S.Bao, I.Liu, D.Ottersness, N.M.Dean, R.T.Abraham, X.F.Wang (2004). Requirement of protein phosphatase 5 in DNA-damage-induced ATM activation. *Genes Dev.* **18**, 249-254.
57. T.Wechsler, B.P.Chen, R.Harper, K.Morotomi-Yano, B.C.Huang, K.Meek, J.E.Cleaver, D.J.Chen, M.Wabl (2004). DNA-PKcs function regulated specifically by protein phosphatase 5. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**, 1247-1252.
58. M.M.Luke, S.F.Della, C.J.Di Como, H.Sugimoto, R.Kobayashi, K.T.Arndt (1996). The SAP, a new family of proteins, associate and function positively with the SIT4 phosphatase. *Mol.Cell Biol.* **16**, 2744-2755.
59. N.E.de, J.Clotet, F.Posas, R.Serrano, N.Gomez, J.Arino (1998). The yeast halotolerance determinant Hal3p is an inhibitory subunit of the Ppz1p Ser/Thr protein phosphatase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 7357-7362.

60. A.Ruiz, I.Munoz, R.Serrano, A.Gonzalez, E.Simon, J.Arino (2004). Functional characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* VHS3 gene: a regulatory subunit of the Ppz1 protein phosphatase with novel, phosphatase-unrelated functions. *J.Biol.Chem.* **279**, 34421-34430.
61. P.Cohen (1991). Classification of protein-serine/threonine phosphatases: identification and quantitation in cell extracts. *Methods Enzymol.* **201**, 389-398.
62. M.Ashburner *Drosophila A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
63. L.A.Goldman, E.C.Cutrone, S.V.Kotenko, C.D.Krause, J.A.Langer (1996). Modifications of vectors pEF-BOS, pcDNA1 and pcDNA3 result in improved convenience and expression. *Biotechniques* **21**, 1013-1015.
64. J.J.Witt, R.Roskoski, Jr. (1975). Rapid protein kinase assay using phosphocellulose-paper absorption. *Anal.Biochem.* **66**, 253-258.
65. Bennett D. Protein phosphatase type 1 binding proteins in *Drosophila melanogaster* . 2000. University of Oxford .
Ref Type: Generic
66. L.Alphey, L.Parker, G.Hawcroft, Y.Guo, K.Kaiser, G.Morgan (1997). KLP38B: a mitotic kinesin-related protein that binds PP1. *J.Cell Biol.* **138**, 395-409.
67. J.Sambrook *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
68. A.Ephrussi, L.K.Dickinson, R.Lehmann (1991). Oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos. *Cell* **66**, 37-50.
69. M.M.Bradford (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**, 248-254.
70. U.K.Laemmli (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

71. M.Sumegi, E.Hunyadi-Gulyas, K.F.Medzihradzsky, A.Udvardy (2003). 26S proteasome subunits are O-linked N-acetylglucosamine-modified in *Drosophila melanogaster*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **312**, 1284-1289.
72. A.Udvardy (1993). Purification and characterization of a multiprotein component of the *Drosophila* 26 S (1500 kDa) proteolytic complex. *J.Biol.Chem.* **268**, 9055-9062.
73. F.Posas, M.Bollen, W.Stalmans, J.Arino (1995). Biochemical characterization of recombinant yeast PPZ1, a protein phosphatase involved in salt tolerance. *FEBS Lett.* **368**, 39-44.
74. N.D.Brewis, A.J.Street, A.R.Prescott, P.T.Cohen (1993). PPX, a novel protein serine/threonine phosphatase localized to centrosomes. *EMBO J.* **12**, 987-996.
75. G.Adam, J.Gausz, S.Noselli, E.Kurucz, I.Ando, A.Udvardy (2004). Tissue- and developmental stage-specific changes in the subcellular localization of the 26S proteasome in the ovary of *Drosophila melanogaster*. *Gene Expr.Patterns.* **4**, 329-333.
76. J.H.Heaton, W.M.Dlakic, M.Dlakic, T.D.Gelehrter Identification and cDNA cloning of a novel RNA-binding protein that interacts with the cyclic nucleotide-responsive sequence in the Type-1 plasminogen activator inhibitor mRNA. *J.Biol.Chem.* 2001.Feb.2;276.(5):3341.-7.Epub.2000.Sep.22. Epub.
77. S.Freilich, E.Oron, Y.Kapp, Y.Nevo-Caspi, S.Orgad, D.Segal, D.A.Chamovitz (1999). The COP9 signalosome is essential for development of *Drosophila melanogaster*. *Curr.Biol.* **9**, 1187-1190.
78. J.Staudinger, J.Zhou, R.Burgess, S.J.Elledge, E.N.Olson (1995). PICK1: a perinuclear binding protein and substrate for protein kinase C isolated by the yeast two-hybrid system. *J.Cell Biol.* **128**, 263-271.
79. P.Tompa (2002). Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem.Sci.* **27**, 527-533.
80. P.Tompa (2003). Intrinsically unstructured proteins evolve by repeat expansion. *Bioessays* **25**, 847-855.

81. G.K.Tofaris, R.Layfield, M.G.Spillantini (2001). alpha-synuclein metabolism and aggregation is linked to ubiquitin-independent degradation by the proteasome. *FEBS Lett.* **509**, 22-26.
82. Y.Jin, H.Lee, S.X.Zeng, M.S.Dai, H.Lu (2003). MDM2 promotes p21waf1/cip1 proteasomal turnover independently of ubiquitylation. *EMBO J.* **22**, 6365-6377.
83. L.Huang, N.Grammatikakis, M.Yoneda, S.D.Banerjee, B.P.Toole (2000). Molecular characterization of a novel intracellular hyaluronan-binding protein. *J.Biol.Chem.* **275**, 29829-29839.
84. L.Giot, J.S.Bader, C.Brouwer, A.Chaudhuri, B.Kuang, Y.Li, Y.L.Hao, C.E.Ooi, B.Godwin, E.Vitols, G.Vijayadamodar, P.Pochart, H.Machineni, M.Welsh, Y.Kong, B.Zerhusen, R.Malcolm, Z.Varrone, A.Collis, M.Minto, S.Burgess, L.McDaniel, E.Stimpson, F.Spriggs, J.Williams, K.Neurath, N.Ioime, M.Agee, E.Voss, K.Furtak, R.Renzulli, N.Aanensen, S.Carrolla, E.Bickelhaupt, Y.Lazovatsky, A.DaSilva, J.Zhong, C.A.Stanyon, R.L.Finley, Jr., K.P.White, M.Braverman, T.Jarvie, S.Gold, M.Leach, J.Knight, R.A.Shimkets, M.P.McKenna, J.Chant, J.M.Rothberg (2003). A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* **302**, 1727-1736.
85. H.Y.Chan, Y.Zhang, C.J.O'Kane (1997). Identification and characterization of the gene for *Drosophila* S20 ribosomal protein. *Gene* **200**, 85-89.
86. M.J.Butler, T.L.Jacobsen, D.M.Cain, M.G.Jarman, M.Hubank, J.R.Whittle, R.Phillips, A.Simcox (2003). Discovery of genes with highly restricted expression patterns in the *Drosophila* wing disc using DNA oligonucleotide microarrays. *Development* **130**, 659-670.
87. D.G.Hardie Protein phosphorylation: A practical approach , Oxford University Press, 1993.
88. M.Fuxreiter, I.Simon, P.Friedrich, P.Tompa (2004). Preformed structural elements feature in partner recognition by intrinsically unstructured proteins. *J.Mol.Biol.* **338**, 1015-1026.

89. C.Bracken, L.M.Iakoucheva, P.R.Romero, A.K.Dunker (2004). Combining prediction, computation and experiment for the characterization of protein disorder. *Curr.Opin.Struct.Biol.* **14**, 570-576.
90. P.Tompa, P.Csermely (2004). The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones. *FASEB J.* **18**, 1169-1175.
91. R.A.Schulz, B.A.Butler (1989). Overlapping genes of *Drosophila melanogaster*: organization of the z600-gonadal-Eip28/29 gene cluster. *Genes Dev.* **3**, 232-242.
92. D.Yaffe, D.S.Greenberg, Y.Schatz, Z.Levy, P.Pizzo, U.Nudel (1996). Reduced levels of dystrophin associated proteins in the brains of mice deficient for Dp71. *Hum.Mol.Genet.* **5**, 1299-1303.
93. N.S.Sokol, L.Cooley (1999). *Drosophila* filamin encoded by the cheerio locus is a component of ovarian ring canals. *Curr.Biol.* **9**, 1221-1230.
94. I.Munoz, A.Ruiz, M.Marquina, A.Barcelo, A.Albert, J.Arino (2004). Functional characterization of the yeast Ppz1 phosphatase inhibitory subunit Hal3: a mutagenesis study. *J.Biol.Chem.* **279**, 42619-42627.
95. P.Tompa, C.Szasz, L.Buday (2005). Structural disorder throws new light on moonlighting. *Trends Biochem.Sci.* **30**, 484-489.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek Dr. Dombrádi Viktor egyetemi tanárnak, aki munkámat mindvégig figyelemmel kísérte és mind elméleti, mind gyakorlati ismereteimet bővítette.

Köszönöm Dr. Gergely Pál egyetemi tanárnak, hogy munkámat támogatta.

Szeretném megköszönni az Orvosi Vegytani Intézet minden dolgozójának a munkámhoz nyújtott segítséget. Külön szeretném megköszönni Dr. Vereb György, Dr. Erdődi Ferenc, Dr. Farkas Iлона és Dr. Csontos Csilla szakmai tanácsait. Köszönöm Bíró Istvánné, Kelemenné Szántó Ágota és Tankáné Farkas Andrea asszisztenseknek a kísérletes munkában nyújtott segítséget.

Köszönöm Dr. Luke Alphey (Department of Zoology, University of Oxford) szakmai irányítását az oxfordi tanulmányútjaim során. Köszönettel tartozom Dr. Vissi Emese és Dr. Szöör Balázs (Department of Zoology, University of Oxford) gyakorlati tanácsaiért.

11. FÜGGELÉK

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

E. Kókai, Á. Tantos, E. Vissi, B. Szöőr, P Tompa, J. Gausz, L. Alphey, P. Friedrich, V. Dombrádi: CG15031/PPYR1 is a gonad specific intrinsically unstructured protein that interacts with protein phosphatase Y.

Arch Biochem Biophys.; 1;451(1):59-67 (2006) IF: 3,152

E. Kókai, M. Szuperák, L. Alphey, J. Gausz, G. Ádám, V. Dombrádi: Germ line specific expression of a protein phosphatase Y interacting protein (PPYR1) in *Drosophila*.

Gene Expr Patterns.; (7):724-9. (2006) IF: 1,794

Egyéb közlemények

T. Zeke, B. Szöőr, **E. Kókai**, E. Yatzkan, O. Yarden, K. Szirák, Z. Fehér, P. Gergely and V. Dombrádi: Analysis of protein phosphatase 1 gene expression in *Neurospora crassa*.

Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 134, 161-170. (2003)

IF: 1,404

B. Csóka, T. Zeke, **E. Kókai**, J. Doonan, H. Fox, Z. Fehér and V. Dombrádi: Expression of the *bimG* gene from *Aspergillus nidulans* in *Neurospora crassa*.

Fungal Genetic Newsletters, No. 49 (2002)

Könyv fejezetek

V. Dombradi, **E. Kókai** and I. Farkas: Protein phosphatase 1.

Topics in Current Genetics Vol. 5, 21-44. Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2004)

E. Kókai, J. Gausz and V. Dombrádi: Biochemical and genetic analysis of the PPP family of protein phosphatases in *Drosophila melanogaster*.

Protein modules in Cellular Signalling, Series A: Life Sciences-Vol. 318, pp.222-231. (2001)

E. Vissi, E. Csordás Tóth, F. Ayaydin, **E. Kókai**, P. Gergely, D. Dudits, V. Dombrádi: The Protein Phosphatases and Their Functions in Plants.

Protein modules in Cellular Signalling, Series A: Life Sciences-Vol. 318, pp.195-201. (2001)

Előadások és poszterek az értekezés témájában:

E. Kókai, L. Mikló, G. Jenei, J. Szabad, V. Dombrádi: Functional Analysis of *Drosophila melanogaster* Protein phosphatases.

NATO/FEBS Advanced Study Institute, Protein Modules in Cellular Signalling, St. Martin de Londres, France, 2000

Kókai E., Zeke T., Csóka B., Dombrádi V: A Ser/Thr specifikus protein foszfatázok összehasonlító analízise.

A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya VI. Munkaértekezlete, Sárospatak, 2001

Kókai E., L. Alphey, Dombrádi V: *Drosophila* új típusú protein foszfatázok katalitikus alegységével kölcsönható fehérjék azonosítása.

A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya VII. Munkaértekezlete, Keszthely, 2002

E. Kókai, L. Alphey, V. Dombrádi: Functional analysis of PPY and PPN testis specific protein phosphatases of *Drosophila melanogaster*.

EMBO Conference/FEBS Advanced Course EuroPhosphatases, Barcelona, Spain, 2003

Kókai E., Fehér L., L. Alphey, Dombrádi V.: *Drosophila* PPN és PPY protein foszfatázok kölcsönható partnereinek azonosítása és jellemzése.
A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya VIII. Munkaértekezlete, Tihany, 2003

Kókai E., L. Alphey, Dombrádi V.: Új típusú protein foszfatázok funkcionális vizsgálata *Drosophila melanogaster*-ben.
A Magyar Biokémiai Egyesület II. Jelátviteli konferencia, Hőgyész, 2003

Kókai E., Tantos Á., Tompa P., Friedrich P., Ádám G., Gausz J., Dombrádi V.: Protein foszfatáz Y-nal kölcsönható DmVig homológ fehérje jellemzése.
A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya IX. Munkaértekezlete, Sopron, Hungary, 2004

E. Kókai, Á. Tantos, G. Ádám, M. Szuperák, E. Vissi, B. Szöör, P Tompa, P. Friedrich, J. Gausz, L. Alphey, V. Dombrádi: CG15031/PPYR1 is a gonad specific intrinsically unstructured protein that interacts with protein phosphatase Y.
30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference, Budapest, Hungary, 2005

Kókai E.: Új típusú *Drosophila* protein foszfatázok és a velük kölcsönható fehérjék vizsgálata
A Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi Vándorgyűlés, Pécs, 2006