

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**Új típusú protein foszfatázok vizsgálata
Drosophila fajokban**

Ádám Csaba

Témavezető: Dr. Dombrádi Viktor



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2011

1. TARTALOMJEGYZÉK

1. TARTALOMJEGYZÉK	2
2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
3. BEVEZETÉS	5
4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
4.1 Fehérje foszforiláció és defoszforiláció	6
4.2 A protein foszfatázok evolúciója	7
4.3 A protein foszfatázok csoportosítása	7
4.4 A PPP enzimcsalád	8
4.5 Az új típusú PPP enzimek jelentősége és előfordulása	9
4.6 A <i>D. melanogaster</i> PPP enzimcsalád	11
4.7 A <i>D. melanogaster</i> PPP család eredete	16
5. CÉLKITŰZÉSEK	18
6. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	19
6.1 Anyagok	19
6.1.1 Vegyszerek	19
6.1.2 Vektorok	19
6.1.3. Oligonukleotid primerek	19
6.1.4 Oldatok, táptalajok	19
6.1.5 Kísérleti organizmusok	20
6.1.5.1 <i>Escherichia coli</i>	20
6.1.5.2 <i>Drosophila</i> törzsek	20
6.2 Módszerek	21
6.2.1 <i>Drosophila</i> törzsek keresztezése	21
6.2.2 Plazmid DNS és genomi DNS izolálás	22
6.2.3 Teljes RNS izolálása és reverz transzkripció	22
6.2.4 A nukleinsavak koncentrációjának és tisztaságának meghatározása	22
6.2.5 Polimeráz láncreakció	23
6.2.6 DNS szekvenálás	23
6.2.7 DNS klónozás	24
6.2.8 <i>In situ</i> hibridizáció	24
6.2.9 Bioinformatikai elemzések	24
6.2.9.1 Adatbázis kutatás	24
6.2.9.2 A génlokalizációk meghatározása és a génátrendeződések vizsgálata	25
6.2.9.3 Szekvencia adatok korrekciója	25
6.2.9.4 Szekvencia összehasonlítás	25
6.2.9.5 Új gének azonosítása	26
6.2.9.6 Evolúciós vizsgálatok	26
7. EREDMÉNYEK	28
7.1 Az új típusú PPP gének expressziója <i>D. melanogaster</i> -ben	28
7.1.1 Az új típusú PPP gének expressziója az egyedfejlődés során	28
7.1.2 Az új típusú PPP gének expressziója a testben	29
7.1.3 A szex-specifitás szerepe az új típusú PPP gének expressziójában	32
7.1.4 A <i>PpY-55A</i> és <i>PpN58A</i> gének csendesítése	33
7.2 A <i>Drosophilidae</i> család PPP génjeinek evolúciója	34
7.2.1 A rovarok PPP készlete	34
7.2.2 A <i>Drosophilidae</i> család PPP génkészlete	38
7.2.3 A <i>Drosophilidae</i> család új PPP génjei	40
7.2.4 Az új típusú PPP gének expressziója <i>Drosophila</i> fajokban	42

7.2.5 Az új típusú PPP gének gyors evolúciója <i>Drosophila</i> fajokban	43
7.2.6 A PPP gének számának és lokalizációjának változásai	45
7.2.7 A PPP gének genomi környezethez való adaptációja	52
8. DISZKUSSZIÓ	54
8.1 Új típusú PPP gének <i>D. melanogaster</i> -ben	54
8.2 A <i>Drosophilidae</i> család foszfoprotein foszfatázai	57
8.2.1 A klasszikus PPP enzimek duplikációja létrehozta a funkcionáló PPP retrogénnek első generációját a <i>Drosophilidae</i> család fajaiban	57
8.2.2 A retrotranszpozíciók és a tandem duplikációk második hulláma új <i>Drosophila</i> -specifikus PPP retrogéneket hozott létre	59
8.2.3 A működőképes PPP retrogénnek második generációja hím-specifikusan expresszálódik	61
8.2.4 Az új PPP retrogénnek átrendeződnek és dinamikusan mozognak a <i>Drosophila</i> genomokban	63
8.2.5 A <i>Pp1-Y1</i> , <i>PpD6+</i> , <i>PpD6</i> , <i>Pp1-Y2</i> géncsoport átrendeződése	64
9. ÖSSZEFOGLALÁS	65
10. SUMMARY	66
11. HIVATKOZÁSOK	67
12. TÁRGYSZAVAK	76
13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	77
14. FÜGGELÉK	78
14.1 Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	78
14.2 Az értekezéshez kapcsolódó poszterek	79
14.3 Az elektronikus függelék (CD melléklet) tartalma	80

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

bp	bázispár
cDNS	komplementer DNS
dn	nem-szinonim szubsztitúciók száma
dNTP	dezoxi-nukleozid-trifoszfát
ds	szinonim szubsztitúciók száma
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E érték	várható érték (Expected Value). Azt a valószínűséget fejezi ki, hogy a kapott eredmény értéke a véletlen következménye
GC - tartalom	guanin-citozin tartalom
gDNS	genomi DNS
kbp	kilobázispár
MDS	Multidimenzionális ábrázolásmód (MultiDimensional Scaling)
NCBI	Nemzeti Biotechnológiai Információs Központ, Bethesda, Maryland, USA (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, USA)
ORF	nyitott olvasási keret (Open Reading Frame)
PCR	polimeráz láncrekció (Polymerase Chain Reaction)
PPP	foszfoprotein foszfatáz (PhosphoProtein Phosphatase)
R	teljes tranzíció/transzverzió arány
RNSi	RNS interferencia
rpm	percenkénti fordulatszám (revolutions per minute)
RT-PCR	reverz transzkripció PCR
St	standard

3. BEVEZETÉS

A protein foszfatázok ősi és létfontosságú szabályozó enzimek, melyek minden eukarióta szervezetben megtalálhatók. A foszfoprotein foszfatáz (PPP) család tagjai a fehérjék Ser és Thr oldalláncáról távolítják el a foszfátcsoportot.

A protein foszfatázok nagyon sokfélék lehetnek, mivel a protein kinázokkal ellentétben konvergens módon alakultak ki az evolúció során (Cohen, 1997). Számuk viszont jelentősen kisebb enzimpárjukhoz, a protein kinázokhoz képest. A klasszikusnak mondható PPP enzimeket (PP1, PP2A, PP2B) hagyományos biokémiai módszerekkel azonosították. Molekuláris biológiai módszerek alkalmazásával lehetővé vált több olyan új típusú nevezett foszfoprotein foszfatázt is kimutatni, amelyek szerkezetileg átmenetet mutatnak a klasszikus PPP-k között (Cohen, 1997). Kiderült, hogy a PPP enzimek katalitikus alegységének szerkezete nagymértékben konzerválódott az evolúció során, ami megkönnyítette a foszfoprotein foszfatázok családjának *in silico* analízisét.

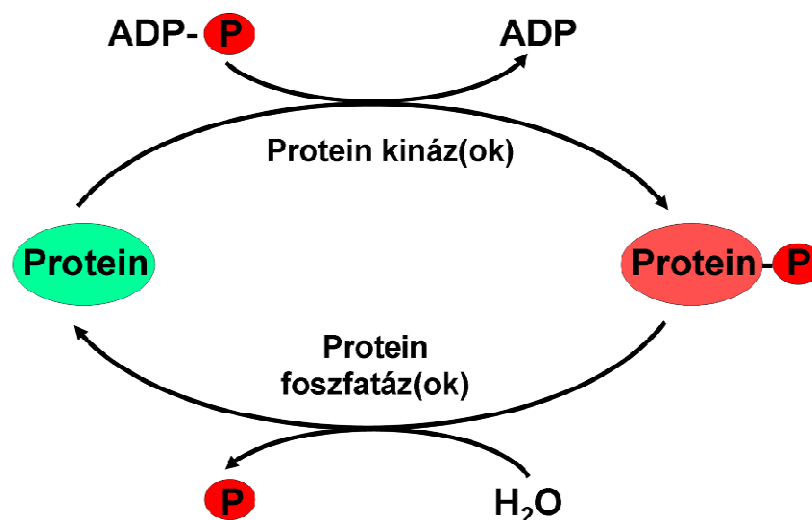
A *Drosophila melanogaster* genomban a Flybase adatbázis alapján 19 PPP katalitikus alegységet kódoló gén található, amelyek a klasszikus PPP enzimeken kívül új típusú foszfatázokat is kódolnak. A PP1-szerű új típusú protein foszfatázok (PpY-55A, PpN-58A, PpD5, PpD6, Pp1-Y1, Pp1-Y2) és a PP2-szerű CG11597 csak a *Drosophilidae* család *melanogaster* csoportjában találhatóak meg. Közülük a *PpN58A*-ról és a *PpY-55A*-ról rendelkezünk a legtöbb irodalmi adattal, amely alapján mindkét gén here-specifikus expressziót mutat (Armstrong és mtsai, 1995; 1998). Megemlítendő, hogy a *Pp1-Y1* és *Pp1-Y2* az Y kromoszóma heterokromatin régiójában található, ahol eddig csak kevés gén kifejeződését mutatták ki. A gének funkcióra vonatkozó információk nem találhatóak az irodalomban és expressziójuk igazolására is csak microarray adatok álltak rendelkezésünkre.

A *D. melanogaster* rendelkezik az egyik legnagyobb számú PPP génnel az állatvilágban, amelynek eredetéről, kialakulásáról csak keveset tudunk. Ez a nagyszámú gén valószínűleg evolúciós tartalékot képezhet az új szabályozó mechanizmusokhoz. A gének keletkezésében alapvető szerepet kapnak a retrotranszpozíciók és a duplikációk. A PPP gének nagy része is ilyen mechanizmusokkal keletkezhetett, mivel nem tartalmaznak intront a kódoló régiójukban. A gének evolúciójának nyomon követése a 12 *Drosophila* faj teljes genomszekvenciájának közzétételével vált lehetővé számunkra (Clark és mtsai, 2007), ami több, mindezidáig ismeretlen új típusú foszfatáz felismerését is lehetővé tette.

4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

4.1 Fehérje foszforiláció és defoszforiláció

A fehérjék reverzibilis foszforilációja az összes eukarióta szervezetekben működő gyakori poszttranszlációs módosítás. A reakciót katalizáló enzimek a protein kinázok, a fehérjék szerin, treonin vagy tirozin oldalláncaihoz kapcsolják az ATP vagy ritkábban a GTP gamma-foszfátját. Ennek következtében megváltozik a fehérjék konformációja, ami befolyásolhatja funkciójukat is. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a fehérjék aktiválódása és gátlása foszforiláció következtében is bekövetkezhet. Ismeretes, hogy a foszforiláció a bakteriális izocitrát-dehidrogenáz aktív helyének közvetlen gátlása révén inaktíválja az enzimet (Dean és Koshland, 1990). Ezzel szemben a foszfátcsoport kapcsolódása után a glikogén foszforiláz enzim mindkét alegységében olyan változás jön létre, amelynek hatására megtörténik a fehérje allosztérikus aktivációja (Barford és mtsai, 1991; Johnson és Lewis, 2001). Ez a poszttranszlációs módosítás azonban csak akkor képes megfelelő szabályozó szerepet betölteni, ha lehetőség nyílik a kinázok által beépített foszfátcsoport lehasítására. A protein kinázok mellett tehát szükség van a foszfátcsoport hidrolitikus eltávolítására képes enzimekre, a protein foszfatázokra is (1. ábra).



1. ábra. A fehérje foszforiláció és defoszforiláció mechanizmusa

4.2 A protein foszfatázok evolúciója

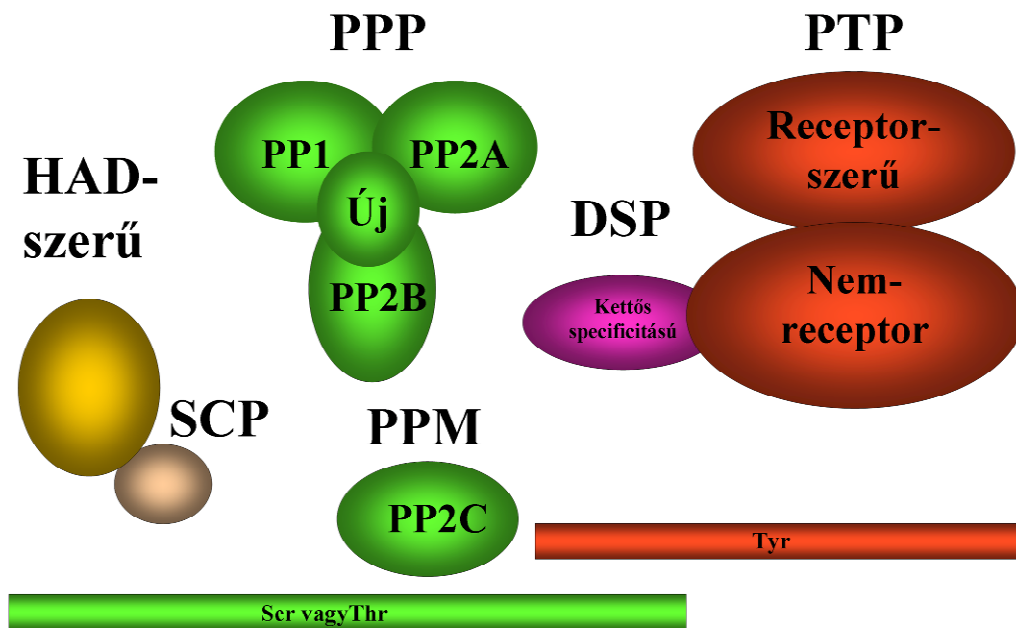
A két kompetáló enzimes család jelentősége egyenértékű a foszforiláció-defoszforiláció alapuló szabályozási folyamatokban, habár a foszfatázok csak a kinázok után alakulhattak ki az alábbi két megfontolás alapján: (1) A reakció mechanizmusa szerint a kinázoknak kell elsőként módosítani a polipeptidek oldalláncait. (2) A foszfatázoknak a kinázok után kellett kialakulniuk, mivel a foszfoprotein szubsztrát nélkül nem lett volna hasznos funkciójuk. Kialakulásuk a már létező hidrolitikus enzimekből történhetett, amelyek katalitikus zsebei fokozatosan alkalmazkodtak az új szubsztráthoz és fokozatosan egyre specifikusabbá váltak. Az úgynevezett foszfoprotein foszfatáz (PPP) enzimek a bakteriális diadenozin-tetrafoszfatázokból fejlődtek ki (Barton és mtsai, 1994). Valószínűleg ezek a legősibb protein foszfatázok, mivel a képviselőik néhány prokariótában is megtalálhatók (Kennelly és mtsai, 2001) és jelen vannak az összes eukariótában (Moorhead és mtsai, 2009).

4.3 A protein foszfatázok csoportosítása

A protein foszfatázok a szubsztrát specifitásuk, a katalizált reakció mechanizmusa és aminosav szekvenciájuk alapján csoportosíthatók (2. ábra). A foszfatázokat szerin és treonin oldallánca defoszforiláló illetve csak tirozin oldallánca defoszforiláló (PTP) két nagy főcsoportba soroljuk (Hunter, 1995). Továbbá léteznek még az úgynevezett kettős specifitású foszfatázok (DSP), amelyek a fehérjék mindhárom említett oldallánca is képesek defoszforilálni (Barford, 1995).

A Tyr-specifikus foszfatázok (PTP) illetve kettős specifitású foszfatázokra (DSP) jellemző, hogy kovalens tiofoszforil-enzim intermedier képződése mellett végzik a defoszforilációt. A katalitikus reakcióban fontos szerepe van az aktív centrumban elhelyezkedő cisztein aminosavnak, amely a PTP családtagokban megtalálható konzervált motívumon belül helyezkedik el (Almo és mtsai, 2007).

A Ser/Thr oldallánca specifikus foszfatázok a következő csoportokra oszthatók: foszfoprotein foszfatázok (PPP), fémion-függő protein foszfatázok (PPM), haloacid dehalogenáz (HAD)-szerű foszfatázok, RNS polimeráz II C-terminális régiójára specifikus foszfatázok (SCP) (Almo és mtsai, 2007). A PPP és PPM csoportok fő jellemvonása, hogy két



2. ábra. Az eukarióta protein foszfatázok csoportosítása

(Dombrádi és mtsai, 2002 alapján)

fémiont tartalmaznak az aktív centrumukban, amelyek segítségével képesek a foszfátcsoportot hidrolizálni a fehérjék szerin vagy treonin oldalláncáról.

A PPM csoportba tartozó PP2C aktivitása Mn^{2+} - vagy Mg^{2+} - függő. A haloacid dehalogénáz szupercsaládkhoz tartoznak a HAD-szerű és az SCP foszfatázok, melyek Mg^{2+} -függő módon, a katalitikus helyen lévő aszpartát oldallánc közreműködésével végzik a defoszforilációt (Almo és mtsai, 2007).

A PPP alcsaládkhoz tartoznak a Zn/Fe tartalmú enzimek, a PP1, PP2A és PP2B foszfatázok. A PPP csoportba sorolhatók azok az új típusúnak nevezett protein foszfatázok, melyek szerkezetük alapján átmenetet mutatnak az említett három alcsoport között (Cohen, 1997).

4.4 A PPP enzimeszalád

A protein foszfatázok szerepének megismerésében kulcsfontosságú szerepe volt a foszfatázok aktivitását gátló specifikus gátlószerek/inhibitorok felfedezésének. A gátlószerek alkalmazásával a célfehérjék foszforiláltsági állapota megnövekedett, ami kóros sejtválaszokhoz, illetve transzformációhoz vezetett. Ezek a megfigyelések támasztották alá a foszfatázok alapvető szerepét a sejten belüli különböző életfolyamatokban, többek között a

sejtciklus, az energia metabolizmus, a sejtnövekedés és sejt differenciáció szabályozásában (1. táblázat).

A PPP enzimek elkülönítése eredetileg specifikus gátlószerek és fehérjeszubsztrátok alkalmazásával történt (Ingebritsen és Cohen, 1983). A PPP enzimeket a régi nomenklatúra alapján 1-es és 2-es típusú foszfatázokra oszthatjuk, az előbbi típushoz a PP1, az utóbbihoz pedig a PP2A, PP2B és a PP2C tartozik (1. táblázat). Az új nevezéktan szerint a foszfatázok a PPP1-3 elnevezést kapták. A PP1 a hőstabil fehérje inhibitor-1 és 2-vel gátolható és specifikusan a foszforiláz kináz β -alegységét defoszforilálja. A PP2 enzimek a foszforiláz kináz α -alegységére specifikusak (Cohen és mtsai, 1990). A PP2A aktivitásához nem szükséges divalens kation, míg a PP2B aktivitásához Ca^{2+} és kalmodulin, a PP2C-hez pedig Mg^{2+} és Mn^{2+} szükséges (Cohen és mtsai, 1990). A PP2A okadainsavval, a PP2C pedig trifluoperazinnal gátolható. A PP2C nem rendelkezik sem természetes, sem mesterséges inhibitorokkal, de mivel a Mg^{2+} és Mn^{2+} ionok az aktivátorai, így EDTA-val gátolható.

1. táblázat. Klasszikus Ser/Thr foszfatázok

Új elnevezés		Régi elnevezés		Funkció	Referencia
Típus	Név	Típus	Név		
PPP	PPP1	1	PP1	sejtciklus, izomösszehúzóadás	Axton 1990 Raghavan 2000
PPP	PPP2	2	PP2A	sejtosztódás, fagocitózis	Snaith 1996 Stroschein 2006
PPP	PPP3	2	PP2B	veleszületett immunitás	Dijkers és O'Farrell 2007

4.5 Az új típusú PPP enzimek jelentősége és előfordulása

Az új típusú enzimek kimutatása klasszikus enzimaktivitási mérésekkel nem volt lehetséges, azonosításuk csak a molekuláris klónozás technikájával vált lehetővé. A hagyományos mérésekkel a kimutatásukat gátolhatta az alacsony szintű jelenlétük a szövetekben, az inhibitor alegységeikkel képzett komplexek vagy a klasszikus enzimekhez képest szűkebb szubsztrátspecifitásuk (Cohen és mtsai, 1990). Az első rekombináns DNS technikával azonosított protein foszfatáz a PP2A katalitikus alegységhez hasonló PPX (újabb nevén PPP4) (da Cruz e Silva és mtsai, 1988) volt. Az első, teljes hosszúságú új típusú protein foszfatázt kódoló cDNS-eket pedig egy évvel később azonosították (Arndt és mtsai, 1989; Dombrádi és mtsai, 1989). Ezután több hasonló foszfatázt is leírtak, amelyek szerkezetük alapján átmenetet mutatnak a klasszikus PP1, PP2A és PP2B protein foszfatázok között

(Dombrádi és mtsai, 1992; Cohen, 1997). Ezek az új foszfatázok az állat- és növényvilág képviselőiben, illetve számos gombafajban is előfordulnak, ahol különböző életfolyamatok szabályozásában vesznek részt. A következőkben a teljesség igénye nélkül ismertetem a humán homológgal rendelkező és humán homológ enzimekkel nem rendelkező új típusú enzimek csoportjait (2.,3. táblázat). A *Drosophila* fajok PPP enzimeit a 4.6 fejezetben ismertetem részletesebben.

2. táblázat. Humán homológgal rendelkező új típusú Ser/Thr foszfatázok előfordulása

Humán gén	Homológ gén	Származás	Funkció	Referencia
PPP4	PPX	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	mikrotubulosok szerveződése a centroszómán	Brewis (1993)
	PPX-1,-2	<i>Arabidopsis thaliana</i>		Pujol (2000)
	PP-Md1	<i>Malus domestica</i>		Watillon (1995)
PPP5	PPT/PPK	<i>Rattus norvegicus</i>	jeltovábbítás, sejtciklus, RNS bioszintézis	Chen (1994)
	PPT1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		Camp (1994)
	PPT	<i>Neurospora crassa</i>		Jeong (2003)
PPP6	SIT4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	sejtciklus, morfológia, embriogenezis	Yatzkan (1997)
	ppe1/esp1	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>		Bastians (1996)
PPP7	PPEF-1,2	<i>Mus musculus</i>	retinafejlődés, fotoreceptor deszenzitizáció	Shimanuki (1993)
	PPEF	<i>Caenorhabditis elegans</i>		

A humán foszfoprotein foszfatázokat PPP1-7 csoportokba soroljuk. A humán homológgal is rendelkező foszfatázok (2. táblázat) közül a PPX néven is ismert PPP4 foszfatázok szerkezetileg a PP2A alegységgel állnak közeli rokonságban. Az emlősökben a mikrotubulosok centroszómán történő szerveződésében játszanak szerepet (Brewis és mtsai, 1993). Az ismert növényi modellszerkezetben, *Arabidopsis thaliana*-ban két PPX gént is azonosítottak, melyek a gyökér plasztidok lumenében helyezkednek el és lehetséges, hogy a plasztid-specifikus kinázok regulációjában vesznek részt (Pujol és mtsai, 2000). *Malus domestica*-ban a PPX enzimet Watillon és munkatársai (1995) azonosították, lokalizációja és szerepe eddig nem ismert.

A PPP5/PPT enzimek a jelátvitel, a RNS bioszintézis és mitózis folyamataiban vesznek részt az emlősökben (Chen és mtsai, 1994; Camp és mtsai, 1994). A *Saccharomyces cerevisiae* PPT1 (Jeong és mtsai, 2003) és a *Neurospora crassa* PPT (Yatzkan és mtsai, 1997) is a mitotikus folyamatokban játszhat fő szerepet. A PPP6 foszfatázoknak emlősökben többek

között szerepe van a sejtciklusban, az embriogenezisben és a jelátvitelben (Bastians és mtsai,1996). A *Saccharomyces cerevisiae* Sit4 foszfatáznak (Bastians és mtsai, 1996) és a *Schizosaccharomyces pombe* ppe1/esp1 enzimnek (Shimanuki és mtsai, 1993) szintén esszenciális szerepe van a sejtciklus folyamataiban.

A PPP7 enzimeknek a retinafejlődésben és fotoreceptor deszenzitizációban van jelentősége emlősökben és fonálférgekben (Sherman és mtsai, 1997).

A *Drosophila* humán homológgal is rendelkező PP4-19C, PpV és rdgc foszfatázait a következő fejezetben ismertetem.

A humán homológgal nem rendelkező (3. táblázat) PPP1-szerű gomba-specifikus foszfatázok a sótoleranciában, a sejtfalintegritás fenntartásában, a sejtciklus szabályozásában (Posas és mtsai, 1993) és a fehérjeszintézisben töltenek be szerepet (Chen és mtsai, 1993). A PPP2-szerű enzimek a glikogén metabolizmus és a morfogenezis folyamataiban működnek közre (Posas és mtsai, 1993; Hoffmann és mtsai, 1994).). *D. melanogaster*-ben több humán homológgal nem rendelkező új típusú foszfatázt is azonosítottak (*PpY-55A*, *PpN-58A*, *PpD5*, *PpD6*, *Pp1-Y1*, *Pp1-Y2*, *CG11597*), amelyekről a 4. 6 fejezetben lesz szó bővebben.

3. táblázat. Humán homológgal nem rendelkező új típusú Ser/Thr foszfatázok előfordulása

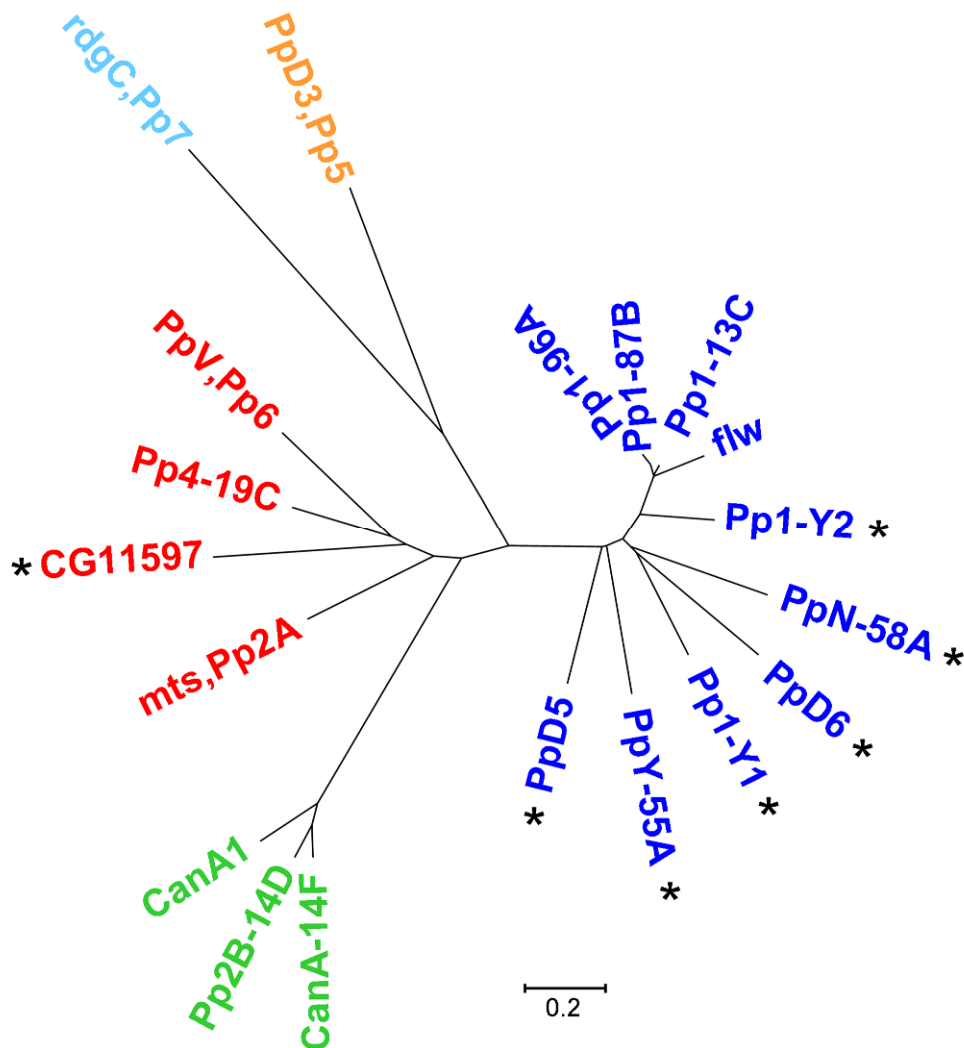
Név	Származás	Funkció	Referencia
PPP1-szerű	Ppz1,2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	sótolerancia,
	Pzh1	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	sejtfalintegritás
	Pzl-1	<i>Neurospora crassa</i>	sejtciklus szabályozás
	PPQ	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	fehérjeszintézis
PPP2-szerű	PPG	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	glikogén metabolizmus
	PPH3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	morfogenezis

4.6 A *D. melanogaster* PPP enzimcsalád

A *D. melanogaster* a molekuláris genetika egy nagyon jól jellemzett modellszervezete. A Flybase adatbázisban (Tweedie és mtsai, 2009; <http://flybase.bio.indiana.edu>) való kutatás eredményeképp, korábban már más szerzők által leírt (Cohen, 2004) 19 PPP katalitikus alegységet kódoló gént azonosítottunk ebben az organizmusban (3., 4. ábra).

A *D. melanogaster* PPP enzimeit az elsődleges szerkezetük alapján 5 alcsaládra oszthatjuk (Cohen, 2004), amelyek a humán PPP1, PPP3, PPP2-4-6, PPP5 és PPP7 foszfatázoknak felelnek meg (4. táblázat). A PPP katalitikus alegységek családfája a 3. ábrán látható. Az ábrán a klasszikusnak mondható foszfatázok között megtaláljuk a PP1, PP2A és PP2B vagy kalcineurin képviselőit is. Ezen kívül több új típusú foszfatázt is láthatunk (*PpY-55A*, *PpN-58A*, *PpD5*, *PpD6*, *Pp1-Y1* és a *Pp1-Y2*, *CG11597*) amelyek a PP1 enzimekhez

hasonlítanak a legjobban, kivéve a CG11597 enzimet, amely a PPP4 foszfatázokkal mutat hasonlóságot.



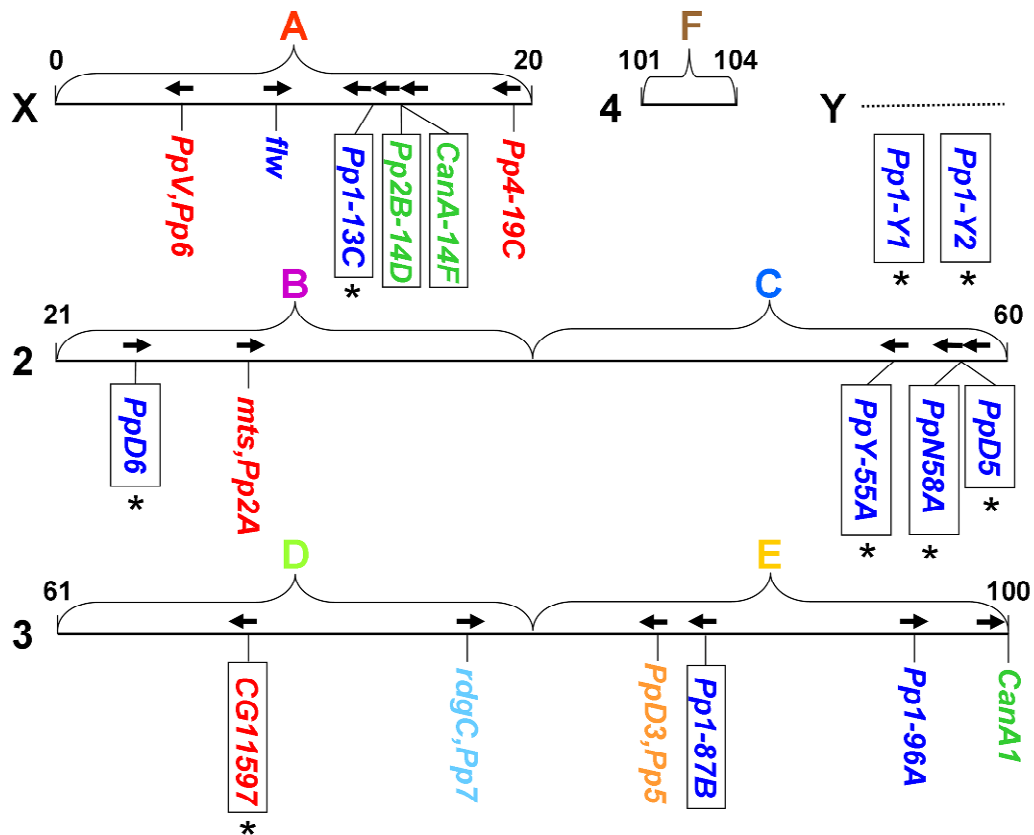
3. ábra. *D. melanogaster* foszfoprotein foszfatáz katalitikus alegységek családfája

A skála 20% aminosav cserét jelöl, * *Drosophila*-specifikus új típusú foszfatáz.

A foszfatázokat a csoportosításuk alapján a következő színekkel jelöltem: 1-es típus (PPP1); 2-es típus/PPP2-4-6; kalcineurin/Pp2B/PPP3; PPP5; PPP7.

A *Drosophila* fajok nagyméretű átrendeződések következtében különböző kromoszómaszámmal rendelkeznek, ezért a genomjukat egymásnak megfelelő szakaszokra, az úgynevezett Müller elemekre (A, B, C, D, E és F jelölés) osztjuk fel (4. ábra). Ez lehetővé teszi a különböző fajok génszakaszainak összehasonlítását. A gének nevei utáni jelölések (pl. 55A a *PpY-55A* génnél) a Müller elemeken való pozíciójukra utal. Az egyes izoformák elnevezése a kromoszómális lokalizációjuk alapján történt (4. ábra).

A *Drosophila* PPP gének nagy része nem tartalmaz intront a kódoló régiójában. Közülük 7 gén új típusúnak bizonyult és csak *Drosophila* fajokban fordul elő (4. ábra).



4. ábra. A PPP gének kromoszómális lokalizációja *D. melanogaster*-ben

Az X, 2, 3 és 4-es kromoszómákat egybefüggő vonallal jelöltük, a kezdeti és a végső szakaszok számozását feltüntettük. Az Y kromoszómát egy nem arányos, szaggatott vonal képviseli. A kromoszómák feletti nagybetűk a Müller elemeket jelölik. Az ORF-ek irányát nyilakkal jelöltük (balról jobbra az 5'-3' iránynak felel meg a felső szálon). A kódoló régiójukban intront nem tartalmazó géneket bekereteztük. * *Drosophila*-specifikus, új típusú foszfatáz. A foszfatázokat a csoportosításuk alapján (4. táblázat) a következő színekkel jelöltem: 1-es típus (PPP1); 2-es típus/PPP2-4-6; kalcineurin/Pp2B/PPP3; PPP5; PPP7.

A *Drosophila* PPP gének csoportosítása és funkciója

(1) Az 1-es típusú vagy PPP1 alcsoport 4 klasszikus PP1 paralógot tartalmaz, melyeket a kromoszómális lokalizációjuk alapján neveztek el. A *Pp1-13C*, *Pp1-87B* és a *Pp1-96A* gének az emlős PPP1 alfa izoforma *Drosophila* ortológjai (4. táblázat), míg az *Pp1-9C* az emlős PPP1 β/δ megfelelője (Dombrádi és mtsai, 1993). Az utóbbi gén hiánya a *flapwing* (*flw*) fenotípust okozza, ami a rendellenes szárnyizomfejlődés eredménye (Raghavan és mtsai, 2000). Az *flw* foszfatáznak ezen kívül a mitózisban is szerepe van (Chen és mtsai, 2007). A *Pp1-87B* foszfatázzal kapcsolatban megállapították, hogy a meghatározó enzim alak (Dombrádi

és mtsai, 1990). A gén mutációja mitotikus blokkot okoz az anafázisban (Axton és mtsai, 1990; Chen és mtsai, 2007). Ugyanennek a génnek szerepe van még az interfázisos kromoszóma kondenzációban (Baksa és mtsai, 1993), a tanulási folyamatokban és a memóriában (Asztalos és mtsai, 1993). A *Pp1-96A* inaktiválása nem eredményezett fenotípusbeli változást. A *Pp1-96A/flw* kettős mutáns tulajdonságai viszont arra utalnak, hogy funkcionális átfedés lehet a két paralóg között (Kirchner és mtsai, 2007). A *Pp1-13C* valószínűleg redundáns génnek tekinthető, mivel a túltermeltetése nem volt hatással sem a *Pp1-87B*, sem az *flw* mutánsokra (Kirchner és mtsai, 2007).

4. táblázat. *Drosophila* PPP enzimek csoportosítása (Cohen, 2004 alapján)

Típus	Humán homológ gén	<i>Drosophila</i> gén név	Funkció	Referencia	
1-es típus vagy PPP1	PPP1	<i>Pp1α-96A</i> , <i>Pp1-96A</i>	nem ismert	Kirchner 2007	
		<i>Pp1-87B</i>	sejtciklus memória	Axton 1990 Asztalos 1993	
		<i>Pp1-13C</i>	nem ismert	Kirchner 2007	
		<i>flw</i> , <i>Pp1-9C</i>	izomfejlődés, sejtciklus	Raghavan, 2000 Chen, 2007	
			<i>Pp1-Y1</i>	nem ismert	Carvalho 2001
			<i>Pp1-Y2</i>		Chintapalli 2007 Vibranovszki 2009
			<i>PpD5</i>		
			<i>PpD6</i>	fertilitás?	Armstrong 1998
			<i>PpN58A</i>		Armstrong 1995 Kókai 2006
			<i>PpY-55A</i>		
Kalcineurin vagy Pp2B	PPP3	<i>CanA1</i>		Guerini 1992	
		<i>Pp2B-14D</i>	veleszületett immunitás	Dijkers és O'Farrell 2007	
		<i>CanA-14F</i>	nem ismert		
2-es típus vagy PPP2-4-6	PPP2	<i>mts</i> , <i>Pp2A</i>	sejtciklus jelátvitel	Snaith 1996 Casso 2008	
	PPP4	<i>Pp4-19C</i>	mikrotubulus szerveződés	Helms 1998	
	PPP6	<i>PpV</i> , <i>Pp6</i>	zigotikus transzkripció	Mann 1993	
		<i>CG11597</i>	nem ismert	Vibranovszki 2009	
PPP5	PPP5	<i>PpD3</i> , <i>Pp5</i>	nem ismert	Brown 2000	
PPP7	PPP7	<i>rdgC</i> , <i>Pp7</i>	fotoreceptor deszenzitizáció	Steele 1992	

A PPP1 alcsaládkhoz tartoznak továbbá még az új típusúnak tekinthető *PpY-55A*, *PpN-58A*, *PpD5*, *PpD6*, *Pp1-Y1* és a *Pp1-Y2* protein foszfatázok is (4. táblázat). A *PpY-55A* és a

PpN-58A foszfatázokat korábban már jellemezték (Armstrong és mtsai, 1995; 1998) és úgy találták, hogy mindegyikük csak a hím egyedek heréjében fejeződik ki. A *PpD5* és *PpD6* foszfatázok expresszióját microarray technikával vizsgálták. Megállapították mindkét gén expressziójának megnövekedését a tesztiszben (<http://www.flyatlas.org>; Chintapalli és mtsai, 2007; Vibranovszki és mtsai, 2009), *PpD5* esetében pedig hím-specifikus expressziót mutattak ki (Arbeitman és mtsai, 2002). A teljes genom szekvencia adatbázis feltérképezetlen területének elemzésével két olyan további PPP gént (*PpI-Y1* és *PpI-Y2*) sikerült azonosítani, amelyek az Y kromoszómán helyezkednek el (Carvalho és mtsai, 2001). A kromoszómális lokalizációjuk alapján a gének hím-specifikusnak tekinthetők.

(2) A calcineurin/*Pp2B*/*PPP3* kalciummal szabályozott foszfatázokat 3 közeli rokon izoformájuk alapján mutatom be (4. táblázat). A *CanA1* (Guerini és mtsai, 1992) egy nagyméretű, 12 intront tartalmazó gén, míg a *Pp2B-14D* (Brown és mtsai, 1994) és a *CanA-14F* gének nem tartalmaznak intront a kódoló régiójukban. A *Pp2B-14D* a túlsúlyban lévő calcineurin izoforma (Brown és mtsai, 1994). Szerepét a veleszületett immunitásban RNAi módszer segítségével igazolták (Dijkers és O'Farrell, 2007). Az aktív *Pp2B-14D* túltermelése letalitást (Sullivan és Rubin, 2002) és nőstény sterilitást okoz (Takeo és mtsai, 2006). A *CanA-14F* P-elem inzerációs mutáns viszont életképes és fertilis.

(3) *D. melanogaster*-ben 4 darab 2-es típusú foszfatáz található (4. táblázat). A *PP2A* jelenléte létfontosságú a sejtosztódás befejezéséhez. A gén hiányában abnormális, csillagszerű mikrotubulus elrendeződés figyelhető meg a sejtekben (*microtubule star*, *mts*), melynek oka a centromerciklus és a sejtmagciklus szétkapcsolódása (Snaith és mtsai, 1996), valamint a kromoszóma szegregáció károsodása (Chen és mtsai, 2007). Az *mts* génnek továbbá szerepe van a vizuális jelátviteli folyamatokban (Wang és mtsai, 2008), a sejtváz szerveződésében (Kiger és mtsai, 2003), a fagocitózisban (Stroschein-Stevenson és mtsai 2006), valamint a Sevenless (Wassarman és mtsai, 1996) és a Hedgehog (Casso és mtsai, 2008) jelátviteli útvonalakban. A *Pp4-19C* gént először PPX néven írták le (4. táblázat) (Brewis és mtsai, 1993), a mikrotubulus szerveződésben való szerepét pedig a „*centrosome minus microtubules*” (*cmm*) mutáns elemzésével igazolták (Helps és mtsai, 1998). A foszfatáz szisztematikus RNAi szűrése alapján úgy találták, hogy a sejtek méretét szabályozza (Chen mtsai, 2007). A *Pp4-19C* génnek ezen kívül a neuroblaszt sejtek osztódásában is fontos szerepe van (Jia és mtsai, 2009; Sousa-Nunes és mtsai, 2009). A *PpV/Pp6* a sarjadzó élesztő *SIT4* és az emlős *Pp6* génnek a *Drosophila* ortológja (4. táblázat) (Mann és mtsai, 1993). A fehérje felhalmozódása a korai embriókban a *PpV/Pp6* zigotikus transzkripcióban és cellularizációban való szerepére utal. A család új tagja az eredetileg *Pp4-like*-nak nevezett

CG1597 (Morrison és mtsai, 2000). Mivel találtunk a *Pp4* génhez hasonlóbb foszfatázt (lásd *Pp4+*, 14. ábra), a *CG1597* elnevezést részesítjük előnyben. A gén *Drosophila*-specifikus új típusú foszfatáznak tekinthető, melynek a funkcióját eddig még nem sikerült meghatározni. A gén tesztszben történő expresszióját Vibranovszki és munkatársai (2009) írták le.

(4) A *PpD3* neve azonos a felfedezéséhez vezető PCR termék elnevezésével (Chen és mtsai, 1992). A gén az emlős PPP5/Pp5 ortológja (4. táblázat) (Brown és mtsai, 2000). Habár a gén regulációja és funkciója emlősökben jól jellemzett (Hinds és Sánchez, 2008), *Drosophila*-ban csak keveset tudunk róla.

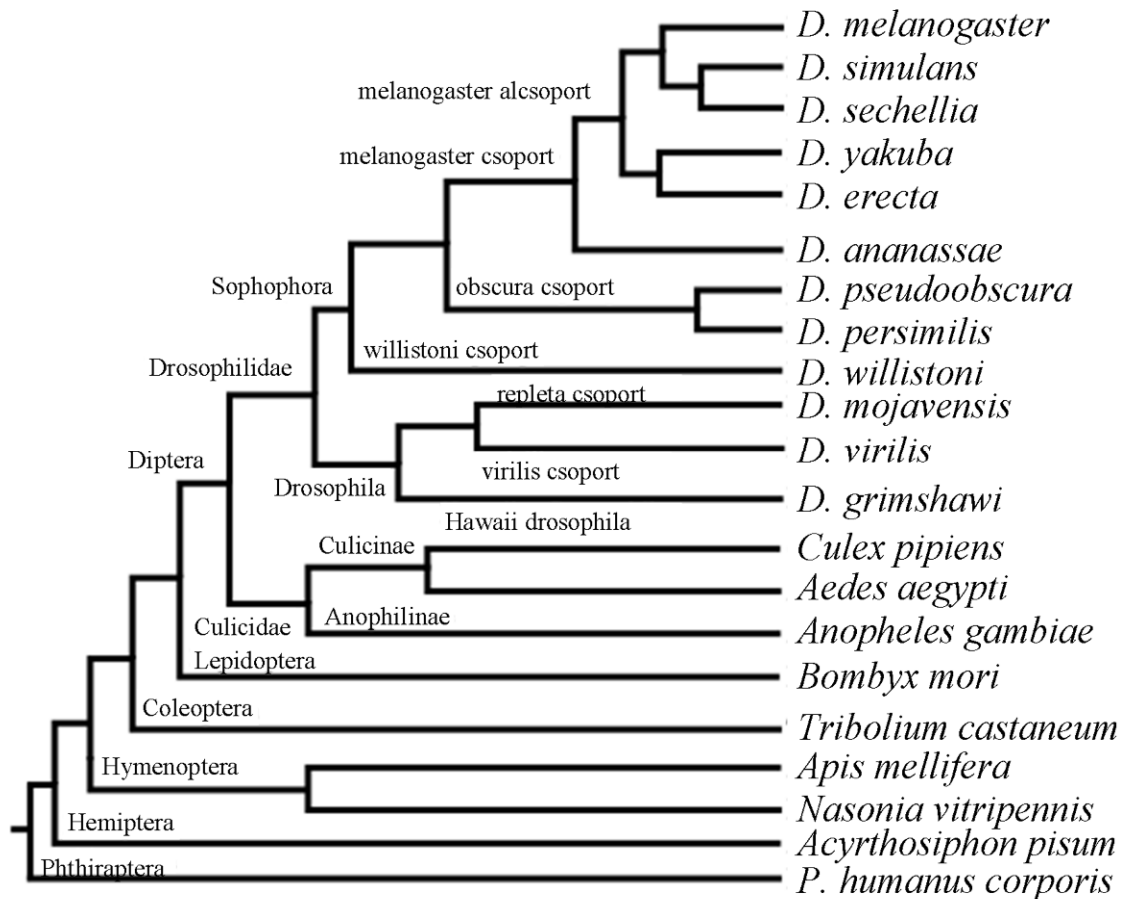
(5) Az *rdgC*-t (retinal degradation C) olyan protein foszfatázként azonosították (4. táblázat), ami képes megvédeni a retinát a fény-aktiválta degenerációtól (Steele és mtsai, 1992). Hasonlóságot mutat a PPEF-1 és PPEF-2 humán PPP7/Pp7 izoenzimekkel, mivel rendelkezik C-terminális EF-kéz motívumot tartalmazó regulátor doménnal (4. táblázat). Az *RdgC* egy Ca-kalmodulinnal szabályozott foszfatáz, ami G-protein közvetített jelátviteli útvonalon keresztül hat (Lee és Montell, 2001). A *Drosophila rdgC* mutánsban a hiperfoszforilált rodopszin indukálja a fotoreceptor sejtek apoptózis általi eliminációját (Vinos és mtsai, 1997; Davidson és Steller, 1998).

4.7 A *D. melanogaster* PPP család eredete

Mivel a *D. melanogaster* rendelkezik az egyik legnagyobb számú PPP génnel az állatvilágban, így érdeklődésünk középpontjába ezen szabályozó enzimek eredetének vizsgálata került. A PPP gének nagy része nem tartalmaz intront a kódoló régiójában, ami arra utal, hogy az evolúció során később jelenhettek meg és más introntartalmú foszfatázokból retrotranszpozícióval származhatnak (4. ábra).

A legutóbbi becslések szerint 1 millió évenként 17 gén duplikálódik a *Drosophilidae* családban (Hahn és mtsai, 2007), amiből 5-11 duplikáció a *D. melanogaster* alcsoportban történik (Zhou és mtsai, 2008). Az evolúció során a gének többsége tandem vagy diszperz duplikációval keletkezik, ezen kívül retrotranszpozíciók, kimérás génképződések és a nemkódoló szekvenciákból történő új génképződések is hozzájárulnak a génkészlet kibővítéséhez (Zhou és mtsai, 2008). Azonban a gének számát az adott fajban a deléciók vagy degradációk is befolyásolják. A gének szerzése és elvesztése közötti dinamikus egyensúly a genom evolúciójának jellegzetes ismertetőjele (Hahn 2007). A 12 *Drosophila* faj genomszekvenciájának közzététele (Clark és mtsai, 2007) lehetőséget kínált számunkra a PPP géncsaládok összehasonlító elemzéséhez (Hahn és mtsai, 2007). A *Drosophilidae* PPP család

nukleotid és fehérje szekvenciáinak összehasonlításával megpróbáltuk feltárni ennek a viszonylag kis konzervatív géncsaládnak az evolúcióját. Annak érdekében, hogy megismerjük az új *Drosophila* specifikus PPP képviselők eredetét, a 12 *Drosophila* fajon kívül még 8 teljesen szekvenált rovar genomot is elemeztünk (5. ábra).



5. ábra. A Flybase adatbázis szekvenált rovarfajai (<http://flybase.org/blast/>)

Az ábrán az általunk vizsgált szekvenált rovarfajok családfája látható. A *Bombyx mori*-t kihagytuk az összehasonlításból.

5. CÉLKITÚZÉSEK

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

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

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

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

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

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

6. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

6.1 Anyagok

6.1.1 Vegyszerek

A kísérletekben felhasznált vegyszerek többségét a *Sigma-Aldrich* cégtől szereztük be. A továbbiakban megadom az ettől eltérő beszerzési forrásokat. *Bio-Rad*: agaróz. *Fermentas*: DNáz, dNTP készlet, Taq polimeráz, 100 bp DNS létra. *Invitrogen*: 1 kbp DNS létra, Trizol reagens. *Millipore*: Microcon YM-100 oszlop. *Promega*: 50 bp DNS létra, M-MLV reverz transzkriptáz, T4 DNS ligáz, oligo(dT), restriktív enzimek; alkalikus foszfatáz. *Roche*: DIG RNA Labeling Mix. *Qiagen*: QIAprep Spin Miniprep plazmid izoláló készlet.

6.1.2 Vektorok

A pWIZ vektort (Lee és Carthew, 2003) Deák Péter (MTA SZBK Biokémiai Intézet, Szeged) biztosította számunkra.

6.1.3. Oligonukleotid primerek

A *PPP* gének vizsgálatára felhasznált oligonukleotid primereket az Integrated DNA Technologies Incorporation-tól szereztük be, amelyek szekvenciáját a Függelék F1. táblázata tartalmazza.

6.1.4 Oldatok, táptalajok

- 1x TE puffer: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
- *Drosophila* homogenizáló puffer (pH 8.2): 10 mM Tris-Cl, 25 mM NaCl, 1 mM EDTA, 200 µg/ml proteinase K
- *Drosophila* táptalaj: 76g/l kukoricaliszt, 41g/l élesztőkivonat, 72 g/l szacharóz, 24 g/l glükóz, 0,5 g/l CaCl₂, 9 g/l agar-agar, 2 g/l Nipagin
- LB (Luria-Bertani-féle) agar: 10 g/l tripton, 5 g/l élesztő kivonat, 10 g/l NaCl, 1,5 % agar, pH 7,0
- LB tápoldat: 10 g/l tripton, 5 g/l élesztő kivonat, 10 g/l NaCl, pH 7,0
- SOC tápoldat: 20 g/l tripton, 2 g/l élesztő kivonat, 0,6 g NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glükóz, pH 7,0

6.1.5 Kísérleti organizmusok

6.1.5.1 *Escherichia coli*

Az *Escherichia coli* DH5 α törzset a Novagen-től szereztük be

6.1.5.2 *Drosophila* törzsek

A munkánk során felhasznált *Drosophila* törzsek a 5. táblázatban találhatóak.

5. táblázat. *Drosophila* törzsek

Név	Genotípus	Származás
<i>D. melanogaster</i> white gén mutáns törzs	w ¹¹¹⁸	Szabad János, Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Biológiai Intézet, Szeged
<i>D. melanogaster</i> Kapcsolt X-Y	C(1) M4, y ² /C(1;Y)6;w ¹¹¹⁸	
<i>D. melanogaster</i> Kapcsolt X-X	C(1)DX, y ¹ f ¹	
<i>D. melanogaster</i> PpY-55A-pWIZ integráns törzs Második kromoszómán	w; PpY-55A/PpY-55A; MKRS/TM6B	Deák Péter, MTA SZBK Biokémiai Intézet, Szeged
<i>D. melanogaster</i> PpN58A-pWIZ integráns törzs Második kromoszómán	w; PpN58A/PpN58A; MKRS/TM6B	
<i>D. melanogaster</i> PpY-55A-pWIZ integráns törzs Harmadik kromoszómán	w; If/CyO, GFP; PpY-55A/PpY-55A	
<i>D. melanogaster</i> PpN58A-pWIZ integráns törzs Harmadik kromoszómán	w; If/CyO, GFP; PpN58A/PpN58A	
<i>D. melanogaster</i> Aktin specifikus meghajtó törzs Második kromoszómán	w; Cyo/actin5c; MKSR/TM6B	
<i>D. melanogaster</i> Aktin specifikus meghajtó törzs Második kromoszómán	w; Cyo/actin5c; MKSR/TM6B	
<i>D. melanogaster</i> Spermatocita specifikus meghajtó törzs. Harmadik kromoszómán	w; Tft/CyO; bamGal4 Vp16	
<i>D. melanogaster</i> Oregon R	Vad típus	Szeged <i>Drosophila</i> Központ (a gyűjtemény Kyoto Stock Center-be költözött át)
<i>D. ananassae</i> (14024-0371.13)	Vad típus	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center (http://flystocks.bio.indiana.edu/News/sequenced.htm)
<i>D. pseudoobscura</i> (14011-0121.94)	Vad típus	
<i>D. willistoni</i> (14030-0811.24)	Vad típus	
<i>D. virilis</i> (15010-1051.87)	Vad típus	

6.2 Módszerek

6.2.1 *Drosophila* törzsek keresztezése

Kapcsolt kromoszómát tartalmazó törzsek keresztezése

A keresztezésekhez az 5. táblázatban található kapcsolt kromoszómát tartalmazó és *white* gén mutáns törzseket használtam fel. Az X/0 hímek előállításához a kapcsolt X és Y kromoszómát tartalmazó hímekeket kereszteztem *white* gén mutáns nőtényekkel. XX/Y nőtények előállításához két kapcsolt X kromoszómát tartalmazó nőtényeket kereszteztem *white* gén mutáns hímekkel (6. táblázat).

6. táblázat. Az általunk létrehozott X/0 és XX/Y *D. melanogaster* törzsek

Név	Genotípus
X/0 hím. Y kromoszómát nem tartalmazó hím	X/0, C(1) M4, y2/C(1;Y)6,w ¹¹¹⁸
XX/Y nőtény. Y kromoszómát tartalmazó nőtény	XX/Y, C(1)DX, y1 f1

Az RNS interferenciához szükséges transzgén egyedek létrehozása

A csendesítő vektorok (lásd 6.2.7 fejezet) *D. melanogaster* w¹¹¹⁸ embriókba injektálása Spradling és Rubin (1982) leírása alapján történt. A genomjukban inzertálódott vektort tartalmazó transzgén egyedeket a *white* szemszín marker (w¹¹¹⁸) különítettük el. A kapott transzgén vonalak kromoszómális lokalizációját keresztezésekkel határoztuk meg (Lee és Carthew, 2003).

Az RNS interferencia aktiválásához az általunk előállított törzseket olyan un. meghajtó törzsekkel kereszteztük, amelyek az UAS szekvenciához kötődő élesztő Gal4 transzkripciósi faktort expresszálják. Ennek segítségével indukáltuk az interferáló kettősszalú RNS szintézisét a driver promóterének megfelelő fejlődési stádiumban és szövetben (5. táblázat). Az RNS interferencia működésének tesztelésére a *PpY-55A* és *PpN58A* integránsok kromoszómális lokalizációjának megfelelő aktin-specifikus meghajtó törzsszel kereszteztük. A gének testisz-specifikus csendesítésére a törzseket spermatocita-specifikus meghajtó törzsszel kereszteztük. Az RNSi meghajtott törzseket a 7. táblázat tartalmazza.

7. táblázat. Az általunk létrehozott meghajtott RNAi *D. melanogaster* törzsek

Név	Genotípus
Aktin driverrel meghajtott PPY-55A-pWIZ integráns törzs. Második kromoszómán	w; PpY-55A/PpY-55A; actin5c/TM6B
Aktin driverrel meghajtott PPN58A-pWIZ integráns törzs. Második kromoszómán	w; PpN58A/PpN58A; actin5c/TM6B
Aktin driverrel meghajtott PPY-55A-pWIZ integráns törzs. Harmadik kromoszómán	w; Cyo/actin5c; PpY-55A/PpY-55A
Aktin driverrel meghajtott PPN58A-pWIZ integráns törzs. Harmadik kromoszómán	w; Cyo/actin5c; PpN58A/PpN58A
Spermatocita driverrel meghajtott PPY-55A-pWIZ integráns törzs. Második kromoszómán	w; PpY-55A/PpY-55A; bamGal4 Vp16
Spermatocita driverrel PPN58A-pWIZ integráns törzs. Második kromoszómán	w; PpN58A/PpN58A; bamGal4 Vp16

6.2.2 Plazmid DNS és genomi DNS izolálás

A plazmid izolálás első lépéseként az *E. coli* telepeket 100 µg/ml ampicillint tartalmazó 5 ml LB folyékony táptalajba oltottuk le és inkubáltuk egy éjszakán át 37 °C-on, 200 rpm fordulatszámú rázatás közben. A plazmidot QIAprep Spin Miniprep plazmid izoláló kit segítségével izoláltuk a cég leírása szerint.

A genomi DNS-t kifejlett egyedekből Gloor és Engels (1992) leírása alapján izoláltuk.

6.2.3 Teljes RNS izolálása és reverz transzkripció

A teljes RNS-t kifejlett egyedekből, illetve hím egyedek testiszéből Trizol reagenssel tisztítottuk az Invitrogen leírása szerint. A teljes RNS mintában fennmaradó DNS-t DNáz kezeléssel távolítottuk el, amit a cég leírása alapján végeztünk el.

A cDNS mintát teljes RNS-ből reverz transzkriptázzal és oligo(dT) primerrel szintén a Promega leírása szerint állítottuk elő.

6.2.4 A nukleinsavak koncentrációjának és tisztaságának meghatározása

A DNS és RNS minták abszorbanciáját 260 nm-en vizsgáltuk 1x TE-pufferrel szemben. A nukleinsavak koncentrációit a 260 nm-en mért fényelnyelés alapján, a tisztaságukat az OD_{260}/OD_{280} arány alapján határoztuk meg.

A DNS fragmenteket 1 %-os agaróz gélben választottuk el. Az agaróz gélelektroforézis során 1 kb, 100 bp és 50 bp DNS létrákat alkalmaztunk.

6.2.5 Polimeráz láncreakció

A primerek szekvenciái, a hibridizációs hőmérsékletek és a számított PCR termékek méretei a Függelék F1 táblázatában találhatóak. A PCR reakciókat Eppendorf Mastercycler PCR készülékben végeztük. A különböző méretű gDNS és cDNS génszakaszokat *Taq* polimeráz enzim felhasználásával szaporítottuk fel a következő reakcióközegben:

PCR puffer (10x cc → 1x cc)*	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM → 3 mM)*	3 µl
dNTP (10 mM → 0,2 mM)*	0,5 µl
Primer 1-2 mix (5µM → 0,25 µM)*	1,25 µl
<i>Taq</i> polimeráz (5 U/µl)	0,2 µl
gDNS, cDNS	2 µl
steril H ₂ O	15,55 µl
végtérfogat	25 µl

* → mutatja a végkoncentrációt

A PPP gének azonosítására és expressziójának vizsgálatára alkalmazott hőmérsékleti profil:

Lépés	hőmérséklet	idő
1.-Denaturálás	94 °C	2 perc
2.-Hibridizáció	*X °C	1 perc
3.-Szintézis	72 °C	**perc
4.-Denaturálás	94 °C	0,5 perc
2-4. ismétlése 30 ciklusban		
5.-Szintézis	72 °C	10 perc

*- az egyes PPP génekhez tartozó hibridizációs hőmérsékletek a Függelék F1. táblázatában találhatóak

**-a szintézis idejét a gyártó cég leírása alapján állapítottuk meg az egyes génekhez, amely szerint 1000 bp szintéziséhez 1 percnyi idő szükséges

6.2.6 DNS szekvenálás

A PCR termékeket közvetlen szekvenáláshoz Microcon YM-100 oszlop segítségével tisztítottuk. A szekvenálás Gödöllőn, a BIOMI Kft-nél, az adott génhez tartozó specifikus primer vagy primerpár (Függelék F1. táblázat) felhasználásával történt.

6.2.7 DNS klónozás

A *PpY-55A* és *PpN58A* géneket második generációs, RNS interferenciára alkalmas pWIZ vektorba klónoztuk. Polimeráz láncreakcióval a *PpY-55A* ill. a *PpN58A* gének kódoló régiójának végére *XbaI* restrikciós helyeket építettünk ki a Függelék F1. táblázatban található primerekkel. A PCR fragmenteket ezt követően *XbaI* enzimmel emésztettük. A pWIZ vektort *AvrII* restrikciós enzimmel hasítottuk, majd alkalikus foszfátazzal kezeltük. A vektorba először a protein foszfátáz *XbaI* enzimmel emésztett fragmentumának egy kópiáját ligáltuk T4 DNS ligázzal, majd *NdeI* emésztés és újabb foszfátáz kezelés után beépítettük ugyanezen fragmentum második kópiáját is. Az így előállított vektor konstrukciókban ellenőriztük az inzert orientációját és kiválasztottunk egy olyan vektort, amelyben a *PpY-55A* kódoló génszakaszai 5'-végükkel egymás felé nézve ellentétes orientációban találhatók. Hasonló eljárással előállítottunk egy olyan konstrukciót is, amelyben a *PpN58A* génszakaszai 3'-végükkel egymás irányába mutatva helyezkednek el, ellentétes orientációban a vektorban. Az így előállított vektor konstrukciókat ezt követően *E. coli* DH5 α törzsbe transzformáltuk.

6.2.8 *In situ* hibridizáció

Az *in situ* hibridizációt kifejezett *D. melanogaster* Oregon R hímek heréjén végeztük el. A hibridizáció digoxigeninnel jelölt RNS próbákkal történt a Flyted *Drosophila* génexpressziós adatbázis alapján (<http://www.fly-ted.org/meth.html#method>; Zhao és mtsai, 2009). A gén-specifikus PCR terméket *Drosophila* gDNS-ből sokszoroztuk fel T7 (szensz próbához) vagy T3 (antiszensz próbához) promóterrel kapcsolt primerekkel (Függelék F1. táblázat). A PCR termékek templatként szolgáltak az egyszálú, digoxigenin-jelölt RNS próba T3 és T7 RNS polimerázok általi szintéziséhez. A jelöléshez a DIG RNA Labeling Mix-et használtuk fel. A szensz próbát negatív kontrollként alkalmaztuk.

6.2.9 Bioinformatikai elemzések

6.2.9.1 Adatbázis kutatás

A PPP szekvenciák adatait a FlyBase (<http://flybase.org/>), az UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu/>) és a NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) adatbázisokból gyűjtöttük össze. Először a 19 ismert *Drosophila* PPP fehérje szekvenciát (Cohen, 2004) használtuk a homológ szekvenciák keresésére, amelyet BLASTp programmal végeztünk el (Altschul és mtsai, 1990). UCSC Genome Bioinformatics adatbázisából származó ORF-eket pDRAW32 (<http://www.acaclone.com/>), FGENESH és FGENESH+

(Salamov és Solovyev, 2000) programokkal jósoltuk meg. Az elsődleges keresési (Blast) eredményeket használtuk a második keresésnél, egyrészt, hogy megerősítsük, másrészt, hogy kibővítsük a PPP szekvencia gyűjteményünket. Mindkét keresésben az E érték küszöbe 1×10^{-40} volt, tehát ennél nagyobb E érték találatokat nem vettünk figyelembe (Miskei és mtsai, 2009). Az új hipotetikus fehérjeszekvenciák doménszerkezetének meghatározását SMART program segítségével végeztük. Az előzetes fehérje jóslásunkat csak abban az esetben fogadtuk el, ha a SMART egy jellegzetes PPP katalitikus alegységet ismert fel.

6.2.9.2 A génlokalizációk meghatározása és a génátrendeződések vizsgálata

A gének Müller elemeken való lokalizációját a Flybase adatbázis (Tweedie és mtsai, 2009) alapján adtuk meg. A *D. ananassae Pp1-Y2* és *PpD6* gének kromoszómális lokalizációját a genomi környezetük alapján korrigáltuk (9. táblázat). A genomi átrendeződéseket *dot plot*-tal vizsgáltuk, amelyet pDRAW32 programmal készítettünk el.

6.2.9.3 Szekvencia adatok korrekciója

Az adatbázis egyértelmű hibáit (kereteltolódások, korai stopkodonok, inszerciók és deléciók), melyek rendellenes fehérjét eredményeztek, és nem voltak összeegyeztethetőek a közeli rokon PPP enzimek konzervált elsődleges szerkezetével, manuálisan, a pDRAW32 program segítségével javítottuk ki (Függelék F2. táblázat).

Amennyiben egy PPP szekvencia hiányzott az adatbázisból, akkor PCR reakció és szekvenálás segítségével próbáltuk azonosítani, amihez a legközelebbi rokon fajok homológ génszakaszai alapján terveztük meg a primereket. A PPP-specifikus oligonukleotid primereket tervezését és a kódoló régiók G-C százalékanak számítását a Teemu Kuulasmaa által kifejlesztett Oligo Explorer 1.1.0 (<http://oligoexplorer.software.informer.com>) primer tervező programmal végeztük. Mivel nagyon hasonló szekvenciákat szeretnénk volna kimutatni, a lehetséges keresztreakciók elkerülése érdekében a primertervezés során a szekvenciák egyedi, nagyrészt csak a 3' végén található variábilis szakaszait vettük figyelembe. Továbbá a keresztreakciókat a reakciók hibridizációs lépésének nagyfokú szigorúságával igyekeztünk visszaszorítani. A kísérleti körülményeink helyességét alátámasztotta több PCR termék szekvenálása is.

6.2.9.4 Szekvencia összehasonlítás

A fehérjeszekvenciákat a pDRAW32, ClustalW (Chenna és mtsai, 2003) és a BioEdit (Hall, 1999) programokkal hasonlítottuk össze. A filogenetikai és molekuláris evolúciós

elemzést a MEGA 4.0 szoftver (Tamura és mtsai, 2007; Kumar és mtsai, 2008) segítségével készítettük ahol a *Neighbor Joining* algoritmust alkalmaztuk a Dayhoff matrix helyettesítési modellben (Schwarz és Dayhoff, 1979; Nei és Kumar, 2000). A „bootstrap” tesztet 500 ismétléssel végeztük (Felsenstein, 1981). Az ortológ kapcsolatokat a családfák topológiája alapján valószínűsítettük és mikroszintén elemzéssel erősítettük meg. A teljes PPP1 alcsaládot multidimenzionális ábrázolási módszerrel (MDS) (Farnum, 2003; Bronstein és mtsai, 2006) is elemeztük a ”SAS for Windows 8.2, PROC MDS” (Cary NC, USA, SAS Institute Inc.) szoftver segítségével.

6.2.9.5 Új gének azonosítása

Az új retrogének azonosítása és elkülönítése a szülői génektől különböző módszerekkel történt. A első módszer a génszerkezeti elemzés volt, amely során az intron megléte vagy hiánya volt a szétválasztás alapja. A közeli rokonságban álló retrogéneket a kromoszómális lokalizáció alapján különítettük el, azaz ha az új gén replikatív transzpozícióval keletkezett, akkor a szülői retrogén vagy annak degradálódott formája az eredeti lokalizációban maradt, az új retrogén pedig másik pozícióba került át. A DNS alapú konzervatív transzpozíció esetében, amikor a gén teljesen új helyre került, az eredeti lokalizáció helyét a genomi környezete alapján, az úgynevezett „landmark” gének segítségével térképeztük fel. Ha a gének egymás után helyezkedtek el és géncsoportot alkottak, akkor arra a következtetésre jutottunk, hogy lokális duplikációval egymásból keletkezettek. Ha a fenti megközelítésekkel nem volt lehetséges a retrogének és a szülői gének elkülönítése, akkor csak a szekvenciák összehasonlítására támaszkodhattunk és azt feltételeztük, hogy a közelebbi rokon szekvenciák egymásból származhattak.

Az ismert PPP-k jelölése a faj nevének rövidítésével a Flybase adatbázisban található név alapján történt (lásd 9. táblázat). Az általunk felfedezett új foszfatázokat a *D. melanogaster* ortológok alapján neveztük el és + jellel láttuk el. Ha egy foszfatáz gén több mint egy izoformát kódolt, akkor mindig a leghosszabb fehérje szekvenciát használtuk az elemzés során.

6.2.9.6 Evolúciós vizsgálatok

A klasszikus és az új típusú foszfatázok evolúciójának tanulmányozásához az R, dn és ds értékeit a MEGA 4.0 szoftver segítségével számoltuk ki, ahol a módosított Nei-Gojobori módszert alkalmaztuk (Zhang és mtsai, 1998). Az elemzés során 265-279 triplet kodont használtunk, amelyek az enzim konzervatív doménjét kódolják a második α -helixről (αA) az

utolsó β -redőig ($\beta 14$). A konzervatív katalitikus domént Goldberg és munkatársainak (1995) Pp1 szerkezetéről írt cikke alapján állapítottuk meg. Az eredmények átlagának, szórásának és szignifikanciájának meghatározásához az Excel szoftvert (Microsoft Corporation) használtuk.

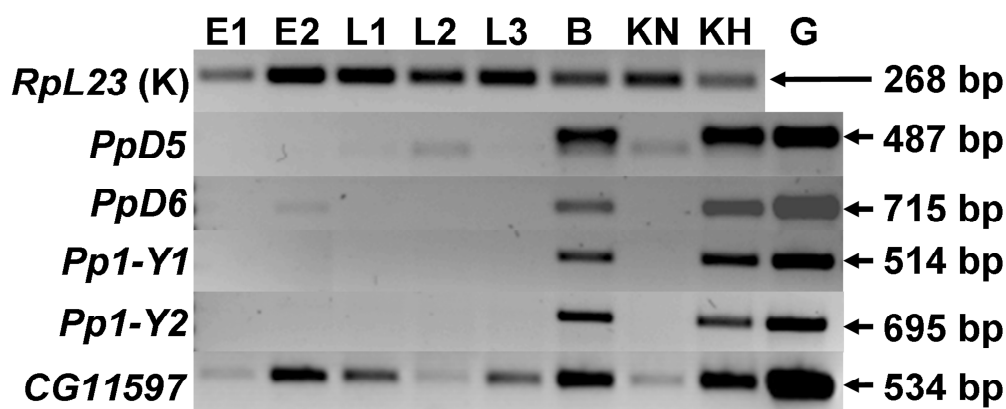
7. EREDMÉNYEK

7.1 Az új típusú PPP-ok jellemzése *D. melanogaster*-ben

A *D. melanogaster* intronmentes új típusú PPP retrogénjei (*PpD5*, *PpD6*, *Pp1-Y1*, *Pp1-Y2*, *PpY-55A*, *PpN58A*) a *CG11597* kivételével a microarray adatok alapján hím-specifikus expressziót mutatnak. Közülük a tesztisz-specifikusan kifejeződő *PpY-55A* és *PpN58A* géneket már jól jellemezték (Armstrong és mtsai, 1995; 1998), így figyelmünk a többi, feltehetőleg hím-specifikusan expresszálandó foszfatáz vizsgálata felé fordult. A gének expressziós mintázatának tanulmányozásával és csendesítésével akartuk megismerni a funkciójukat.

7.1.1 Az új típusú PPP gének expressziója az egyedfejlődés során

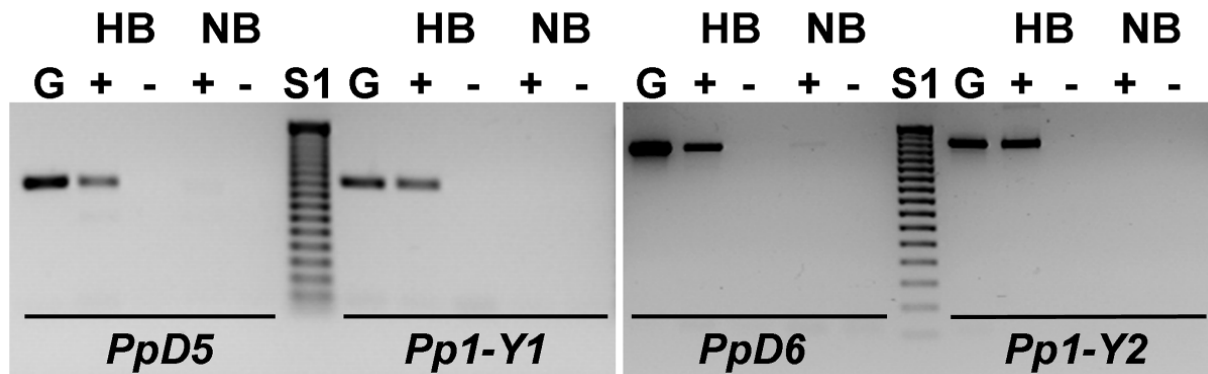
Munkánk során először RT-PCR módszerrel megvizsgáltuk az említett gének expresszióját *D. melanogaster* életciklusa során (6. ábra). A PCR és az RT-PCR reakciók termékei azonos méretűek, mivel a gének nem tartalmazznak intront. A *CG11597* gén különböző mértékben minden fejlődési stádiumban expresszálandó. Ezzel ellentétben a *PpD5*, *PpD6*, *Pp1-Y1* és *Pp1-Y2* gének csak bábokban és kifejlett hím egyedekben fejeződnek ki. A *PpD6* ezen kívül még késői embriókban is kifejeződik. A *PpD5* génnél az L2 lárvában és nőtény egyedben látható sávok PCR műterméknek tekinthetők, mivel kisebb méretűek.



6. ábra. Az új típusú PPP gének expressziója *D. melanogaster* életciklusa során

Az új típusú PPP gének expresszióját *D. melanogaster* egyedfejlődése során RT-PCR módszerrel vizsgáltuk. E1, E2: korai (2h) illetve késői (16h) embriók; L1, L2, L3: első, második illetve harmadik fejlődési stádiumú lárvák; B: báb; KN: kifejlett nőstény; KH: kifejlett hím; G: genomi DNS kontroll. A riboszómális *RpL23* fehérjét kódoló gént belső kontrollként használtuk. A nyilak a PCR termékek számított méreteit mutatják.

A bábokat nem szerint is vizsgáltuk (7. ábra), ami igazolta, hogy a gének a bábokban is hím-specifikus expressziót mutatnak.



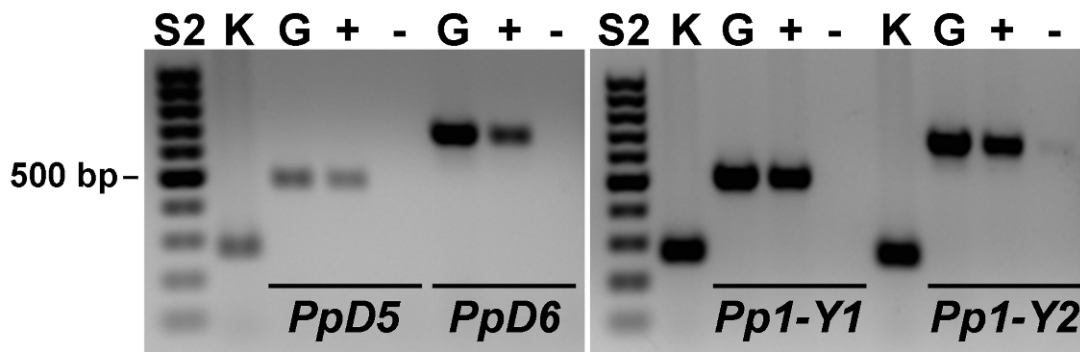
7. ábra. Az új típusú PPP gének expressziója *D. melanogaster* bábjaiban

Az új típusú PPP gének expresszióját *D. melanogaster* hím és nőstény bábjaiban RT-PCR módszerrel vizsgáltuk. HB: hím báb; NB: nőstény báb; G: genomi DNS kontroll; +: pozitív kontroll, PCR reakció cDNS templáttal; -: negatív kontroll, PCR reakció RNS templáttal; S1: 50 bp-os DNS létra.

Mivel a *CG11597* kivételével a vizsgált PPP gének hím-specifikusan fejeződtek ki, felmerült a kérdés, hogy vajon a *PpY-55A* és *PpN58A* génekhez hasonlóan tesztisz-specifikusan expresszálódnak-e.

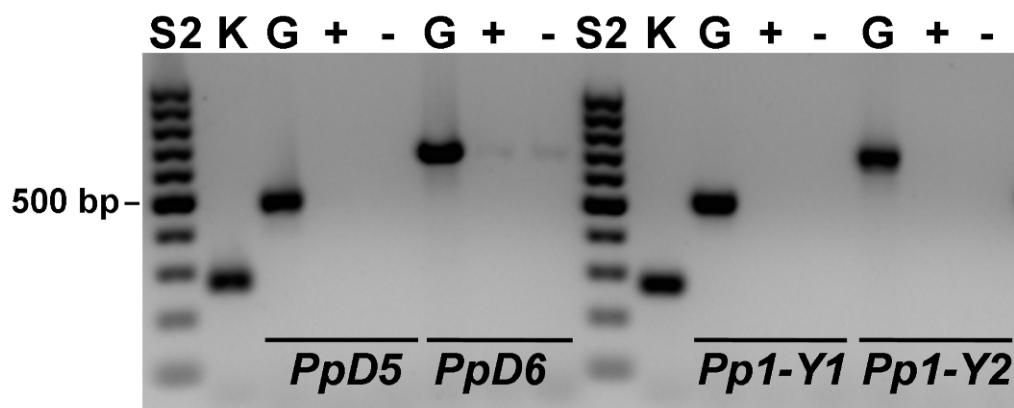
7.1.2 Az új típusú PPP gének expressziója a tesztiszben

RT-PCR módszerrel vizsgáltuk meg az új típusú PPP gének expresszióját *D. melanogaster* kifejlett hím egyedek tesztiszében (8. ábra) és tesztisz nélküli teljes test preparátumban is (9. ábra).



8. ábra. Az új típusú PPP gének expressziója *D. melanogaster* tesztiszében

Az új típusú PPP gének expresszióját *D. melanogaster* tesztiszében RT-PCR módszerrel vizsgáltuk. K: belső kontroll, riboszómális *RpL23* fehérjét kódoló gén; G: genomi DNS kontroll; +: pozitív kontroll, PCR reakció cDNS templáttal; -: negatív kontroll, PCR reakció RNS templáttal; S2: 100 bp-os DNS létra.

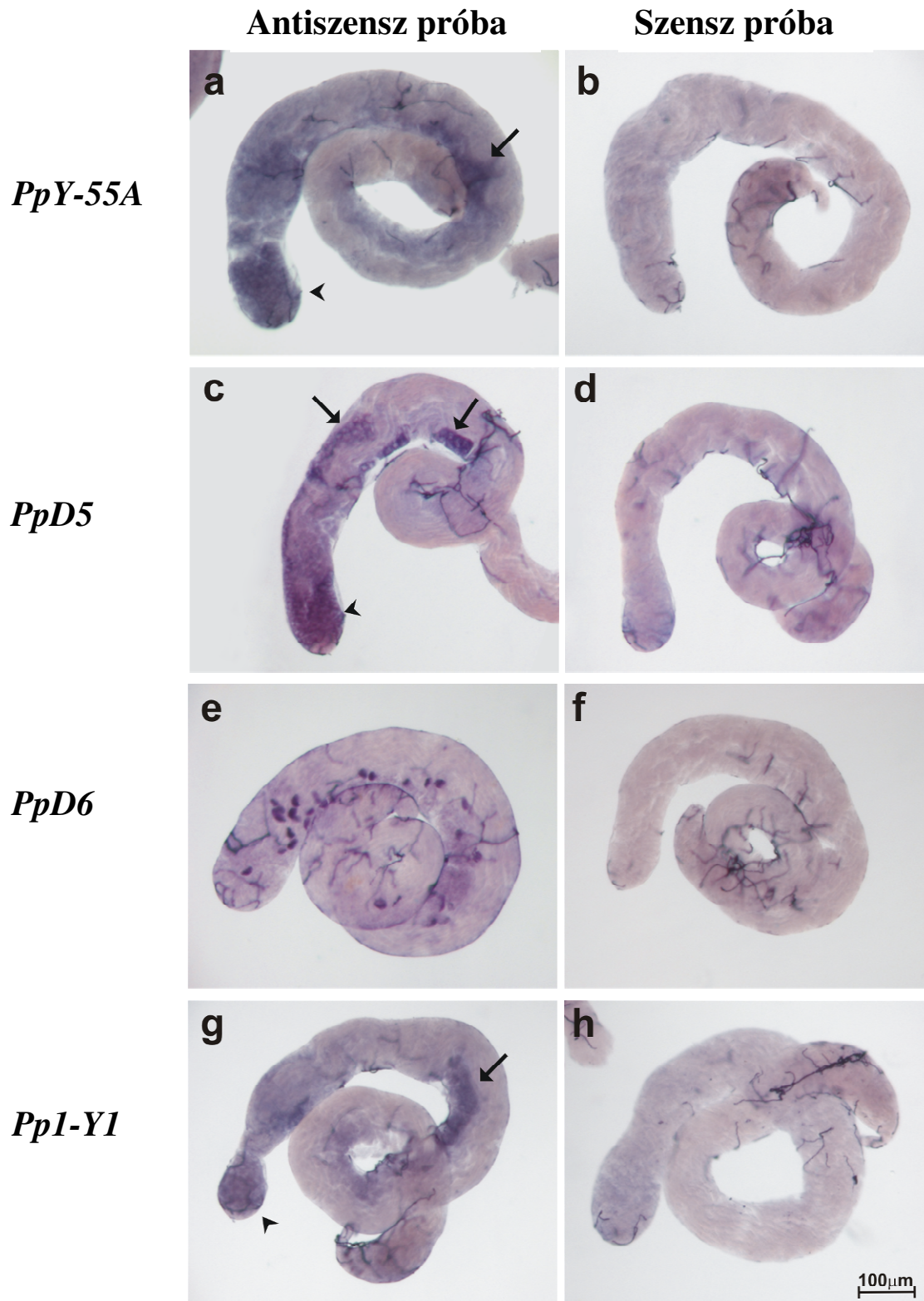


9. ábra. Az új típusú PPP gének expressziója *D. melanogaster* testisz nélküli testében

Az új típusú PPP gének expresszióját *D. melanogaster* testisz nélküli testében RT-PCR módszerrel vizsgáltuk. K: belső kontroll, riboszómális *RpL23* fehérjét kódoló gén; G: genomi DNS kontroll; +: pozitív kontroll, PCR reakció cDNS templáttal; -: negatív kontroll, PCR reakció RNS templáttal; S2: 100 bp-os DNS létra.

A kísérletek alapján megállapítható, hogy a vizsgált gének testisz-specifikus expressziót mutatnak, mivel a test más részeiben nem, csak a testiszben fejeződnek ki.

Ezt követően megvizsgáltuk a gének testiszben belüli expressziójának helyét is, amelyhez *in situ* hibridizáció technikát alkalmaztunk. A *PpN58A*, *Pp1-Y2* és *CG11597* gének esetében nem kaptunk detektálható jelet (nem bemutatott eredmények). Valószínűleg azért, mert e gének alacsonyabb szinten expresszálódnak és kimutatásukhoz az alkalmazott módszer nem volt eléggé érzékeny. Kontrollként az irodalmilag már jellemzett *PpY-55A* gént (Armstrong és mtsai, 1995; Kókai és mtsai, 2006) használtuk. Habár a képek alacsony felbontása miatt a sejtípusok azonosítása nem sikerült az irodalmi adatok és a Flyted *Drosophila* génextpressziós adatbázis (<http://www.fly-ted.org/meth.html#method>; Zhao és mtsai, 2009) alapján következtethetünk a sejt szintű lokalizációjukra. A *PpY-55A* gén termékét disztális régiókban (nyílfej- 10/a. ábra) és a testisz első fél fordulatanak homorú oldalán azonosítottuk (nyíl-10/a. ábra), ami összhangban van az irodalmi adatokkal (Armstrong és mtsai, 1995; Kókai és mtsai, 2006). A szerzők azonosították a sejtípust is, azaz a *PpY-55A* a here disztális régiójában az elsődleges spermaticitákban és a cisztasejtek sejtmagjában, a homorú oldalán pedig a kerek spermaticitákban fejeződik ki. A *PpD5* (10/c. ábra) és a *Pp1-Y1* (10/g. ábra) gének esetében is hasonló mintázatot kaptunk, tehát valószínűleg ezen gének is hasonló sejtípusokban expresszálódhatnak. A *PpD6* gén esetében a here disztális régiójában pontszerű expressziós mintázatot figyeltünk meg (10/e. ábra), ami a Flyted adatbázis alapján a hosszabbodó spermaticida köteg disztális részének felel meg.

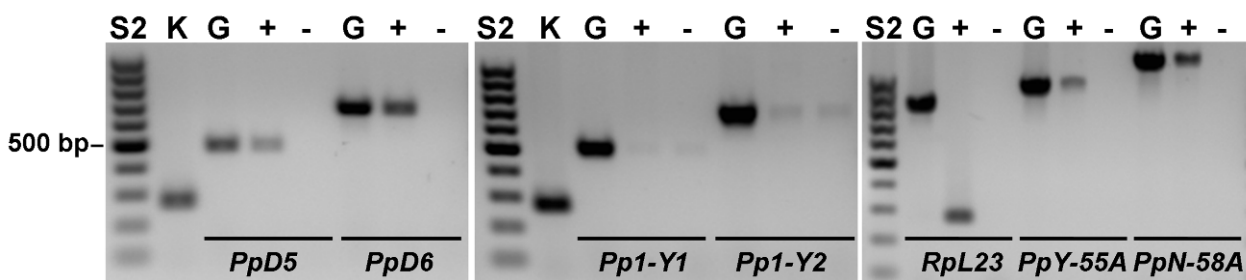


10. ábra. Az új típusú PPP gének expressziójának vizsgálata *in situ* hibridizációval *D. melanogaster* testiszében

Az *in situ* hibridizációt digoxigenin-jelölt antiszensz (a, c, e, g) és szensz (b, d, f, h, j) RNS próbákkal végeztük el. Az utóbbit negatív kontrollként használtuk. A skála (h) 100 μm -nek felel meg. Az összes kép azonos nagyítással készült. A specifikus hibridizációs próbák elkészítéséhez használt primerek a Függelék F1. táblázatában találhatóak.

7.1.3 A szex-specifitás szerepe az új típusú PPP gének expressziójában

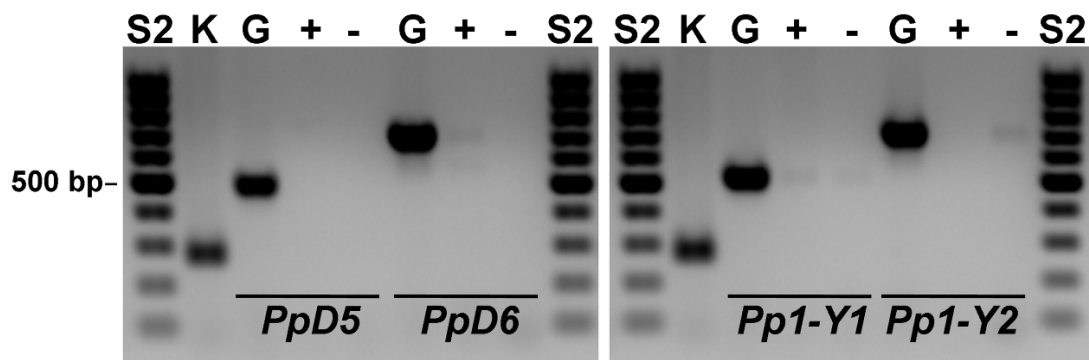
A gének hím-specifikus expressziójának megerősítése érdekében Y kromoszóma nélküli X/O steril hímeket és Y kromoszómát tartalmazó XX/Y nőtényeket állítottunk elő és RT-PCR módszerrel ezekben az egyedekben is megvizsgáltuk a gének kifejeződését. Az autoszómáisan lokalizált *PpD5*, *PpD6*, *PpY-55A* és *PpN58A* gének termékei megtalálhatók voltak X/O hímeekben (11. ábra). Az Y kromoszóma hiánya miatt értelemszerűen az Y kromoszómán lokalizálódó *Pp1-Y1* és *Pp1-Y2* gének nem fejeződtek ki ezekben az egyedekben (11. ábra).



11. ábra. Az új típusú PPP gének expressziója *D. melanogaster* X/O hím egyedekben

Az új típusú PPP gének expresszióját *D. melanogaster* X/O hím egyedeiben RT-PCR módszerrel vizsgáltuk. K: belső kontroll, riboszómális *RpL23* fehérjét kódoló gén; G: genomi DNS kontroll; +: pozitív kontroll, PCR reakció cDNS templáttal; -: negatív kontroll, PCR reakció RNS templáttal; S2: 100 bp-os DNS létra.

Az XX/Y nőtények egyedekben a kísérleti eredményeink alapján pedig egyetlen vizsgált foszfatáz sem fejeződött ki (12. ábra).



12. ábra. Az új típusú PPP gének expressziója *D. melanogaster* XX/Y nőtény egyedekben

Az új típusú PPP gének expresszióját *D. melanogaster* XX/Y nőtény egyedeiben RT-PCR módszerrel vizsgáltuk. K: belső kontroll, riboszómális *RpL23* fehérjét kódoló gén; G: genomi DNS kontroll; +: pozitív kontroll, PCR reakció cDNS templáttal; -: negatív kontroll, PCR reakció RNS templáttal; S2: 100 bp-os DNS létra.

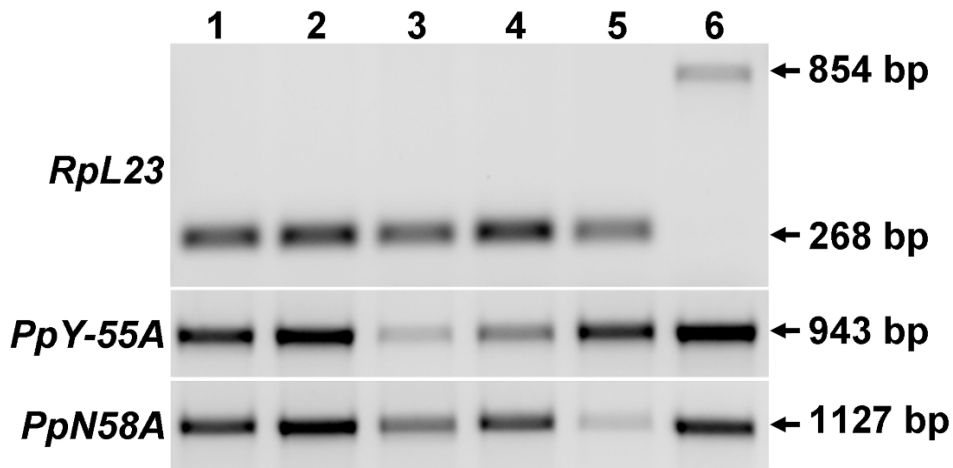
Kísérleteinkkel tehát megerősítettük, hogy az általunk vizsgált gének valóban csak hím egyedekben fejeződnek ki.

7.1.4 A *PpY-55A* és *PpN58A* gének csendesítése

Irodalmi adatokból ismert, hogy mindkét foszfatáz csak a hímek heréjében fejeződik ki. A *PpY-55A* mRNS-éről és fehérjéjéről igazolták, hogy a cisztasejtek sejtmagjában és a fejlődés korai stádiumában a spermaticitákban is kifejeződik (Armstrong és mtsai, 1995; Kókai és mtsai, 2006). A *PpN58A* herén belüli lokalizációjáról nincsenek irodalmi adatok. Korábbi kísérleteinkben P-elem kiugratás segítségével megpróbáltunk olyan *PpN58A* mutánsokat előállítani, amelyek a P-elem pontatlan kivágása következtében sérült *PpN58A* gént tartalmaznak. Ez a próbálkozás azonban nem járt sikerrel illetve a *PpY-55A* génre sem állítottak elő hasonló mutánsokat. Mivel mindezidáig nem sikerült a klasszikus genetikai módszerekkel a génekre nézve mutánsokat előállítani, ezért e gének funkcióját RNS interferencia (RNSi) módszerével kívántuk meghatározni. Ennek megvalósítása érdekében a Lee és Carthew (2003) által létrehozott második generációs RNS interferenciára alkalmas vektor rendszert használtuk fel.

Első lépésben az RNS interferenciával történő géncsengesítésre alkalmas törzseket hoztunk létre. Az interferencia tesztelésére először aktin-specifikus driverrel indukáltuk a géncsengesítést, aminek hatékonyságát RT-PCR módszerrel bizonyítottuk be (nem bemutatott adat). Mivel a gének testiszben, a *PpY-55A* pedig igazoltan cisztasejteken kívül spermaticitákban is kifejeződik, az RNSi törzseket spermaticita-specifikus driver törzsszel kereszteztük és homozigóta törzseket hoztunk létre belőlük. Az RNS interferencia hatékonyságát RT-PCR módszerrel igazoltuk (13. ábra).

Mivel irodalmi adatok alapján a két gén csak testiszben fejeződik ki (Armstrong és mtsai, 1995; 1998), így elsősorban az egyedek szaporodóképességét vizsgáltuk meg. Ehhez először a csengesített törzsek nőstény egyedeit vad típusú hímekkel, hím egyedeit pedig vad típusú nőstényekkel kereszteztük. Ezt követően megszámloltuk a kikelt egyedeket és meghatároztuk a hímek és a nőstények arányát is. Ezenkívül a nem kikelt peték és az elhalt lárvák elemzését is elvégeztük. Az adatokat vad típusú egyedek keresztezésénél tapasztaltakhoz hasonlítottuk és megállapítottuk, hogy a gének expressziójának csökkenése nem okozott változást a csengesített *PpY-55A* és *PpN58A* RNSi törzsek szaporodóképességében.



13. ábra. A *PpY-55A* és *PpN58A* gének csendesítésének igazolása

Az *RNS* interferencia hatékonyságát RT-PCR módszerrel vizsgáltuk. 1: Kiindulási, *white* gén mutáns törzs (w^{1118}); 2: Nem meghajtott *PpY-55A*-*pWIZ* integráns törzs; 3: Meghajtott *PpY-55A*-*pWIZ* integráns törzs; 4: Nem meghajtott *PpN58A*-*pWIZ* integráns törzs; 5: Meghajtott *PpN58A* integráns törzs; 6: genomi DNS kontroll.

A *Drosophila* PPP gének és ezen belül az új típusú foszfatázok eredete, kialakulása még kevésbé tanulmányozott területe volt az irodalomnak. Ezért a következőkben a *Drosophila* PPP gének evolúcióját vizsgáltuk meg.

7.2 A *Drosophilidae* család PPP génjeinek evolúciója

7.2.1 A rovarok PPP készlete

A PPP gének katalitikus alegységeinek evolúciójának vizsgálatához a *D. melanogaster*-t használtuk összehasonlítási alapként. Első lépésként adatbázis kutatással megállapítottuk a minimális, 7-8 enzimet magában foglaló PPP készletet, amely jelen van a szekvenált rovarfajok többségében (5. ábra, 8. táblázat). Úgy találtuk, hogy a gének többsége intront tartalmaz a kódoló régiójában, kivéve a *Pp2B* gént, ami arra utal, hogy retropozícióval keletkezett, még a *Drosophila* fajok kialakulása előtt. A következő lépésben megvizsgáltuk a *D. melanogaster*-ben azonosított gének előfordulását a további 11 szekvenált, a *Drosophilidae* családhoz tartozó *Drosophila* fajban is. Megállapítottuk, hogy valamennyi más rovarfajokban azonosított PPP gén megtalálható a *Drosophilidae* család tagjaiban, ahol az összes PPP-k száma 18 és 22 között változik (9. táblázat).

8. táblázat. A PPP gének azonosítása a szekvenált rovar genomokban

Gén, osztály ^a	<i>Culex pipiens</i>	<i>Aedes aegypti</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	<i>Tribolium castaneum</i>	<i>Apis mellifera</i>	<i>Nasonia vitripennis</i> ^d	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	<i>Pediculus humanus corporis</i> ^d
Rövidítés	<i>Cpip</i> ●	<i>Aaeg</i> ●	<i>Agam</i> ●	<i>Tcas</i> ●	<i>Amel</i> ●	<i>Nvit</i> ●	<i>Apis</i> ●	<i>Phum</i> ●
<i>flw</i> , PPP1	XP_001843526	XP_001663366	XP_312797	XP_966417	XP_623273	XP_001604472	XP_001944422	EEB19394
<i>Pp1a-96A</i> , PPP1	XP_001849462	XP_001653770	XP_309483	XP_001813974	XM_392943	XP_001602738	XM_001945867	
<i>mts</i> , PPP2	XP_001863301	XP_001663281	XP_319345	XP_973546	XP_623105	XP_001602506	NP_001119644	EEB13988
<i>Pp4-19C</i> , PPP4	XP_001843269	XP_001648308	XP_310323	XR_043119	XM_624666	XP_001606225	XP_001950610	EEB16959
<i>PpV</i> , PPP6	XP_001866724	XP_001648846	XP_311859	XP_967314	XP_394400	XP_001603727	XP_001951846	EEB14281
<i>CanA1</i> , PPP3				XP_968705	XP_394519	XP_001602102 (A) ^b XP_001603722 (B) ^b	XP_001945831	EEB19897
<i>Pp2B</i> , PPP3	<u>XP_001868819</u>	<u>XP_001653535</u>	javitott szekvencia ^c					
<i>PpD3</i> , PPP5	XP_001850926	XP_001650298	XP_313034	XP_971407	XP_624242	XP_001603324	XP_001948640	EEB13025
<i>rdgC</i> , PPP7	XP_001844975	XP_001663541	XP_317894					EEB16582
Teljes PPP	8	8	8	7	7	8	7	7

^a A géneket a *Drosophila* ortológok alapján neveztük el. A PPP-k osztályozása Cohen munkája (2004) alapján történt.

^b A két *Nvit CanA1* szekvenciát önkényesen A-nak és B-nek neveztük el.

^c A javított fehérje szekvencia a függelék F2. táblázatában található.

^d A *Nasonia vitripennis*-ben talált két paralóg *CanA1* és a *Pediculus humanus corporis* genomjából hiányzó *Pp1-96A* valószínűleg a szekvenálási projekt hibájával magyarázható.

A kódoló régiójukban intront nem tartalmazó PPP géneket aláhúzással jelöltük.

A PPP3 két típusát szaggatott vonallal választottuk el.

Az üresen hagyott hely a hiányzó géneket jelöli.

A rovar PPP fehérje szekvenciák közötti szerkezeti rokonság a 14. ábrán és a Függelék F1. ábráján látható, ahol a családfa „bootstrap” értékei is fel vannak tüntetve. A 14. ábrából kitűnik, hogy a *Drosophila* foszfatázok több csoportjának nincs ortológja más rovarfajokban. Továbbá az is jól látható, hogy a 8 közös foszfatáz típus 7 jól elkülönült csoportra oszlik, amely a fehérjék konzervatív szerkezetére és funkciójára utal *Drosophila* és más rovar fajokban. A rovarfajok foszfatázai alcsoportokat képeznek, amelyek jól elkülönülnek a *Drosophila* fehérjéktől. Ez közös eredetüket és független evolúcióval történő keletkezésüket támasztja alá.

Az egyetlen kivétel a PPP3/calcineurin (*CanA1/Pp2B*) foszfatázok csoportjában található. A *N. vitripennis* *CanA1* B variánsa távol esik az alcsalád többi tagjától (14. ábra). Feltételezzük, hogy a gén sokkal konzerváltabb A variánsából duplikációval származik, a közöttük lévő jelentős szekvencia eltérés pedig a funkcionális redundanciából adódó mutációknak tulajdonítható. A 14. ábrából látható, hogy a nem *Drosophila* PPP3 enzimből 5 (*T. castaneum*, *A. mellifera*, *N. vitripennis*, *A. pisum*, *P. h. corporis*) hasonlít a *Drosophila* *CanA1* géntermékekhez, amelyek intront tartalmaznak a kódoló régiójukban (8., 9. táblázat). Ezzel ellentétben a *C. quinquefasciatus*, az *A. egypty* és az *A. gambiae* PPP3 foszfatázok fehérje (14. ábra) és génszerkezetük (8., 9. táblázat) alapján közelebb állnak azon *Drosophila* *Pp2B-14D* enzimekhez, amelyek génjeiben nincs intron. Az előbb említett intronmentes gének alapján feltételezzük, hogy a *CanA1* gén duplikálódott a *Diptera* rendben és így az őse lehetett az összes rovar calcineurin foszfatáznak, ami fennmaradt a *Drosophilidae* családban, de elveszett több *Diptera*-ból (vö. 8.2.1 fejezet) (5. ábra).

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

Osztályozás ^a	Gén név, szinonima ^b /Fajok ⁱ	Dmel	Dsim	Dsec	Dyak	Dere	Dana	Dpse	Dper	Dwil	Dmoj	Dvir	Dgri
1-es típus vagy PPP1	<i>Pp1a-96A, Pp1-96A</i>	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
	<i>Pp1-87B</i>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>
	<i>Pp1-13C</i>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>
	<i>flw, Pp1-9C</i>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	<i>Pp1-Y1</i>	<u>Y^h</u>	<u>Y^g</u>	<u>Y^e</u>	<u>Y^g</u>	<u>Y^h</u>	<u>Y</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>		<u>C</u>	<u>C</u>
	<i>Pp1-Y2</i>	<u>Y^f</u>	<u>Y^g</u>	<u>Y^h</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>Y^d</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>
	<i>PpD5</i>	<u>C</u>	<u>C^g</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C^h</u>		<u>C</u>	<u>C</u>	
	<i>PpD5+</i>							D	D		<u>D</u>	<u>D</u>	<u>D</u>
	<i>PpD6</i>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B</u>	<u>B^h</u>	<u>Y^{d,f}</u>	<u>C^h</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>
	<i>PpD6+</i>							<u>C</u>	<u>C^h</u>	<u>C</u>		<u>C</u>	
	<i>PpN58A</i>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>
	<i>PpY-55A</i>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>A^h</u>	C	C	C	
	<i>PpY+</i>							<u>A</u>	<u>A</u>				
Calcineurin vagy Pp2B vagy PPP3	<i>CanA1</i>	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
	<i>Pp2B-14D (14E)^c</i>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>
	<i>CanA-14F</i>	<u>A^h</u>	<u>A^e</u>	<u>A^h</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A^h</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>A</u>
2-es típus vagy PPP2-4-6	<i>mts, Pp2A</i>	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
	<i>Pp4-19C (19D)^c</i>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	<i>Pp4+</i>							B	B				
	<i>PpV, Pp6</i>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	<i>Pp6+</i>										<u>E</u>	<u>E</u>	<u>E</u>
<i>CG11597</i>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>D</u>							
PPP5	<i>PpD3, Pp5</i>	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
PPP7	<i>rdgC, Pp7</i>	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
PPP	Teljes szám	19	19	19	19	19	19	22	22	18	19	21	18

^a Cohen (2004) alapján.

^b A gének neveit a Flybase alapján adtuk meg (<http://flybase.org/>), melyeket a gyakran használt szinonimájuk követ. Külön kiemeltük azokat a géneket, melyek a rovar PPP készlethez tartoznak.

^c A helyes kromoszómális lokalizációt zárójelben adtuk meg, ha ez különbözött attól, amire a gén neve utalt.

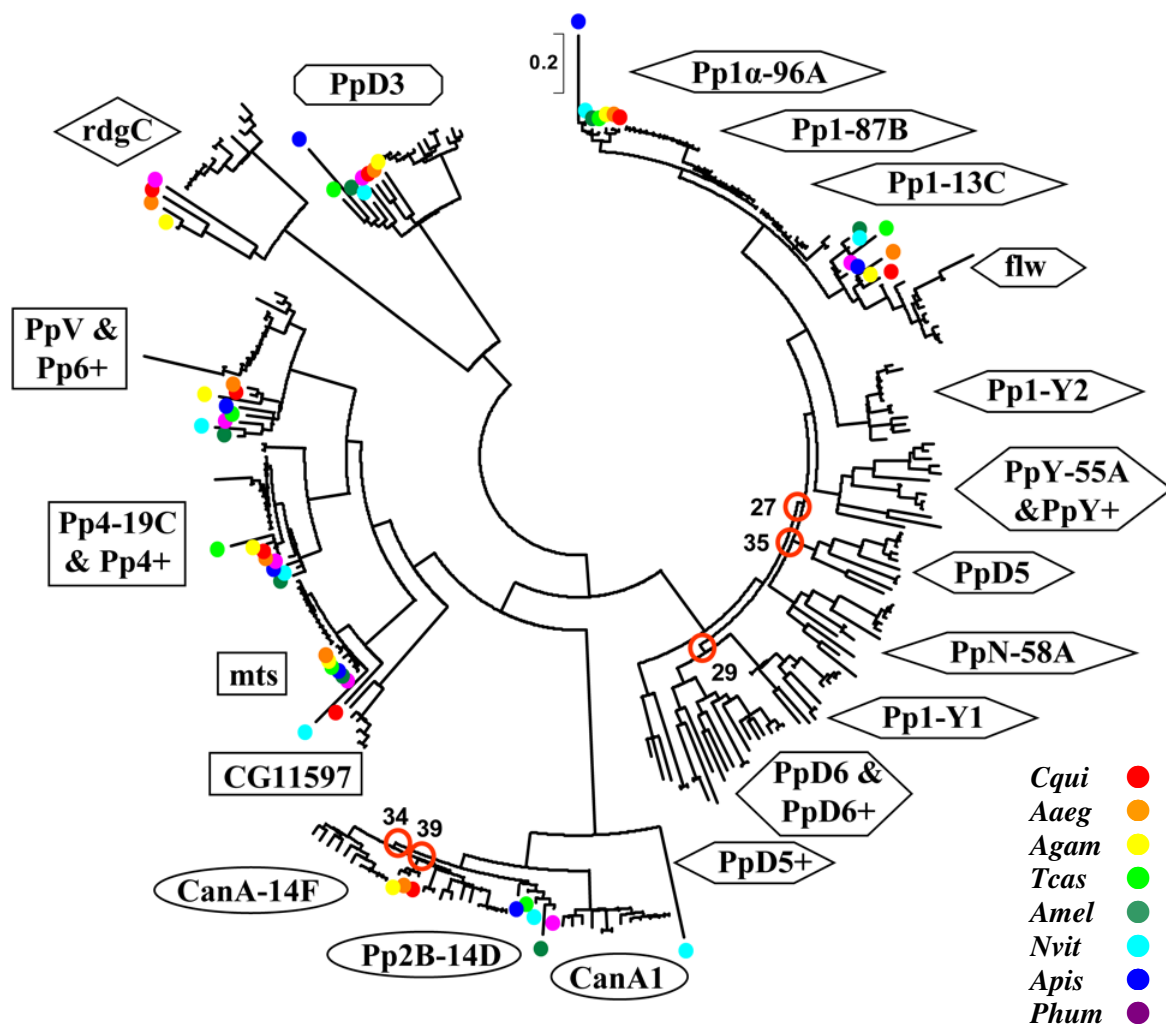
^d A gének lokalizációját a genomi környezet alapján javítottuk. Ezeket a gén szekvenciákat PCR-al és DNS szekvenálással ^eazonosítottuk, ^fjavítottuk és ^gerősítettük meg.

^h A gén méretét PCR-al erősítettük meg.

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

Az intronmentes gének lokalizációját aláhúzott dőlt betűvel jelöltük.

Az üresen hagyott hely a hiányzó géneket jelöli.



14. ábra. A PPP katalitikus alegységek családfája rovarokban

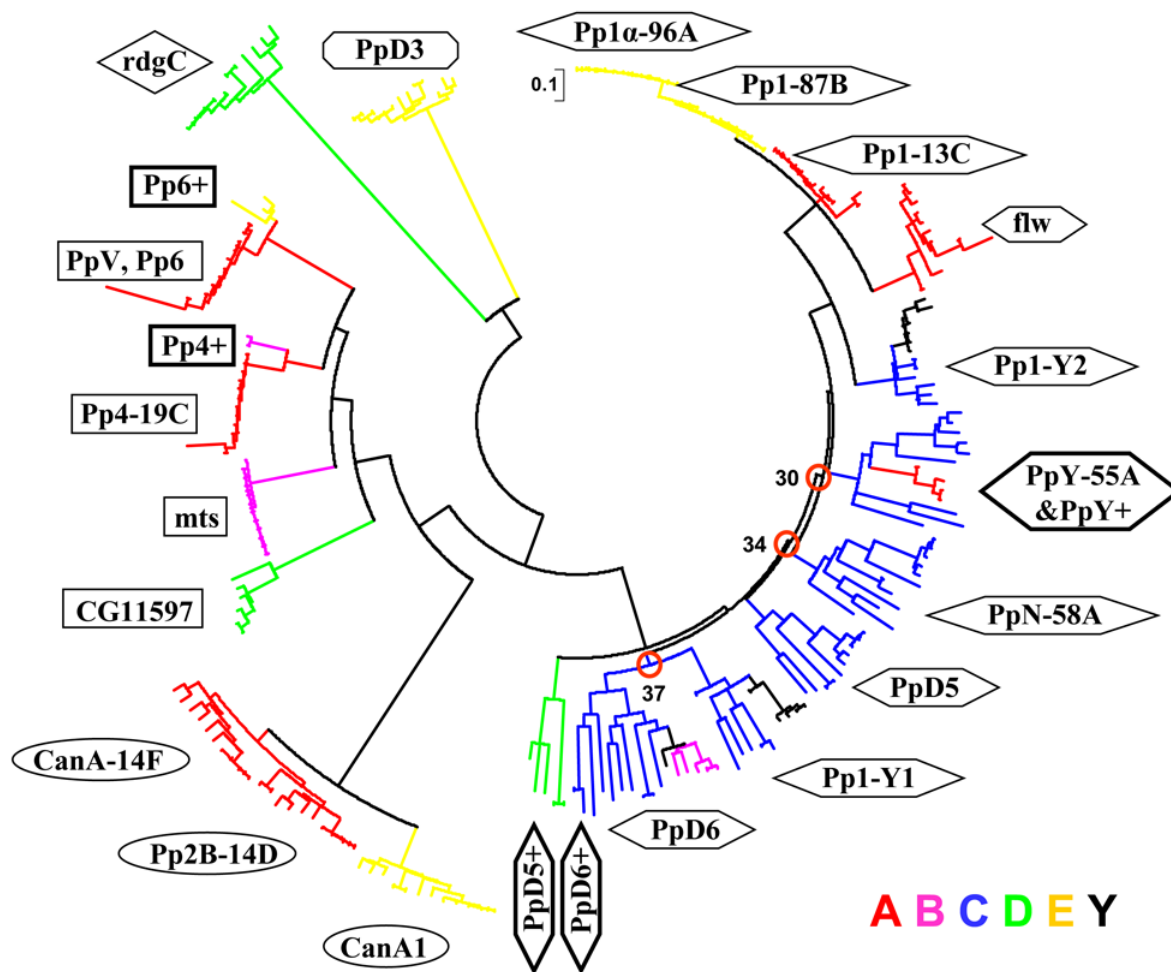
A családfán 287 rovar PPP katalitikus alegység van ábrázolva. Az enzim alcsaládok jelölése a *D. melanogaster* nevezéktan alapján történt (9. táblázat). A nem *Drosophila* fajok jelölése a jobb alsó sarokban található. A skála 0.2 aminosav cserét jelöl az elsődleges szerkezetben. A bizonytalan elágazási pontokat körrel és a megfelelő „bootstrap” értékekkel jelöltük. A következő 8 rövid, részleges fehérje szekvenciát kihagytuk az összehasonlításból: *Dsim flw*, *Dana Pp1-Y1*, *Dsec Pp1-Y2*, *Dwil PpN58A*, *Dyak Pp2B-14D*, *Dvir Pp2B-14D*, *Dsim CanA-14F*, *Dsim rdgC*. A fajnevek rövidítése a következő: *Cqui*: *Culex quinquefasciatus*, *Aaeg*: *Aedes aegypti*, *Agam*: *Anopheles gambiae*, *Tcas*: *Tribolium castaneum*, *Amel*: *Apis mellifera*, *Nvit*: *Nasonia vitripennis*, *Apis*: *Acyrtosiphon pisum*, *Phum*: *Pediculus humanus corporis*.

7.2.2 A *Drosophilidae* család PPP génkészlete

A foszfatáz készlet a rovarfajok minimális PPP készletéhez képest a *Drosophilidae* család tagjaiban nem kevesebb, mint 15, dinamikusan változó, új taggal bővült (9. táblázat; 14. ábra). A 12 *Drosophila* faj PPP katalitikus alegységeinek részletes családfája a 15. ábrán és a Függelék F2. ábráján található. Feltehetően a génduplikációk a leghatékonyabb eszközei a génkészlet kibővítésének. Az eredményeink is ezt a feltevést támasztják alá a *Pp2B-14D* és

a *CanA-14F* gének esetében, melyek intronmentes leszármazottai az ősi *CanA1* génnek az összes *Drosophila* fajban (15. ábra; 9. táblázat).

A rovar (14. ábra) és a 12 *Drosophila* faj foszfatázainak (15. ábra) összehasonlítása alapján feltételezhetjük, hogy a *Pp1-96A* gén ősi, intront tartalmazó alakjából származnak az 1-es típusú foszfatázok (vö. 8.2.2 fejezet). A *Pp1-87B* közvetlenül a *Pp1-96A* génből alakult ki retrotranszpozícióval. A rendelkezésre álló adatok alapján nehéz megmondani, hogy a *Pp1-13C* közvetlenül a *Pp1-96A* génből, vagy közvetve a *Pp1-87B* génből származott. Az viszont biztos, hogy a másik intront tartalmazó 1-es típusú foszfatáz, az *flw* nem lehet a közös ő, mivel sokkal variábilisabb és nem áll olyan közeli kapcsolatban a *Pp1-13C* génnel (14. ábra).



15. ábra. A PPP katalitikus alegységek családfája *Drosophilidae* családban

A 227 *Drosophila* PPP katalitikus alegység filogenetikai elemzése a 14. ábrához hasonlóan mutatjuk be. Az elágazások színei a gének kromoszómális elhelyezkedésére utalnak, melyhez a színkód a jobb alsó sarokban található. Az általunk azonosított 5 új PPP enzimet + jellel jelöltük és vastagított keretézéssel láttuk el. A skála 0.1 aminosavcserejét jelöl az elsődleges szerkezetben.

A klasszikus foszfatáz gének duplikációján kívül a PPP készlet több retrogén megjelenésével is bővült (9. táblázat). Az eredetileg *D. melanogaster*-ben felfedezett új, 1-es típusú foszfatázok (*Pp1-Y1*, *Pp1-Y2*, *PpD5*, *PpD6*, *PpN58A*, *PpY-55A*) (4., 5. ábra) jelen vannak mind a 12 *Drosophila* fajban (9. táblázat; 15. ábra) de hiányoznak más rovarfajokból (8. táblázat; 14. ábra). Mivel nem találtuk meg az ortológjaikat más élő szervezetben, így ezeket *Drosophila*-specifikus foszfatázoknak nevezhetjük.

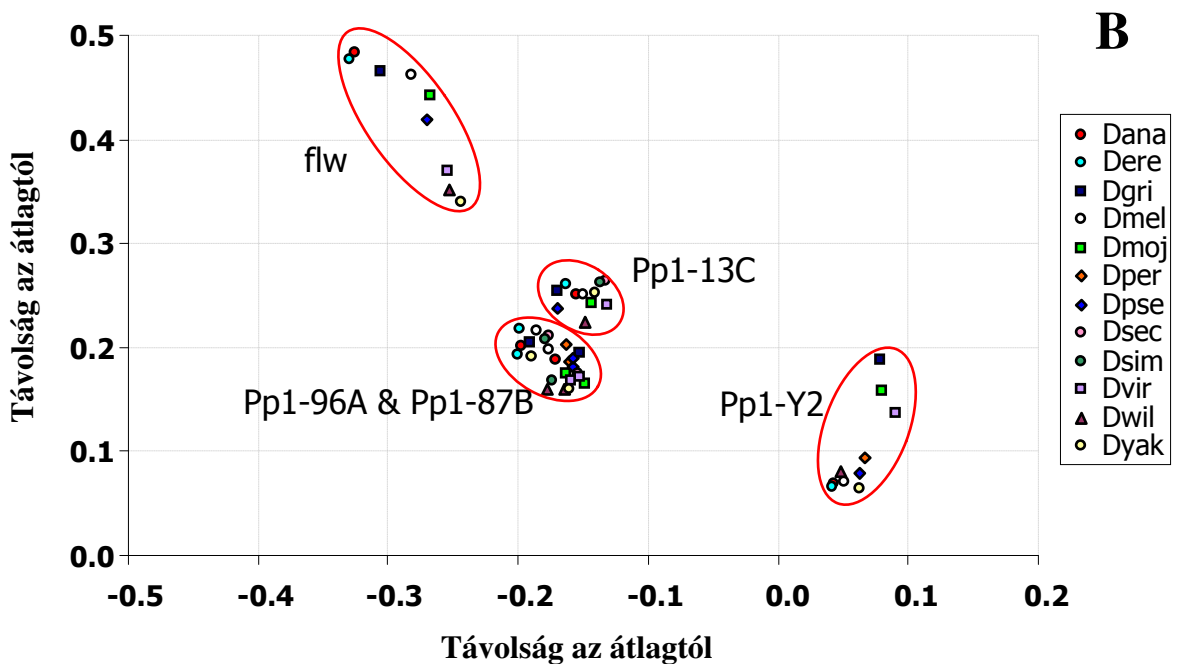
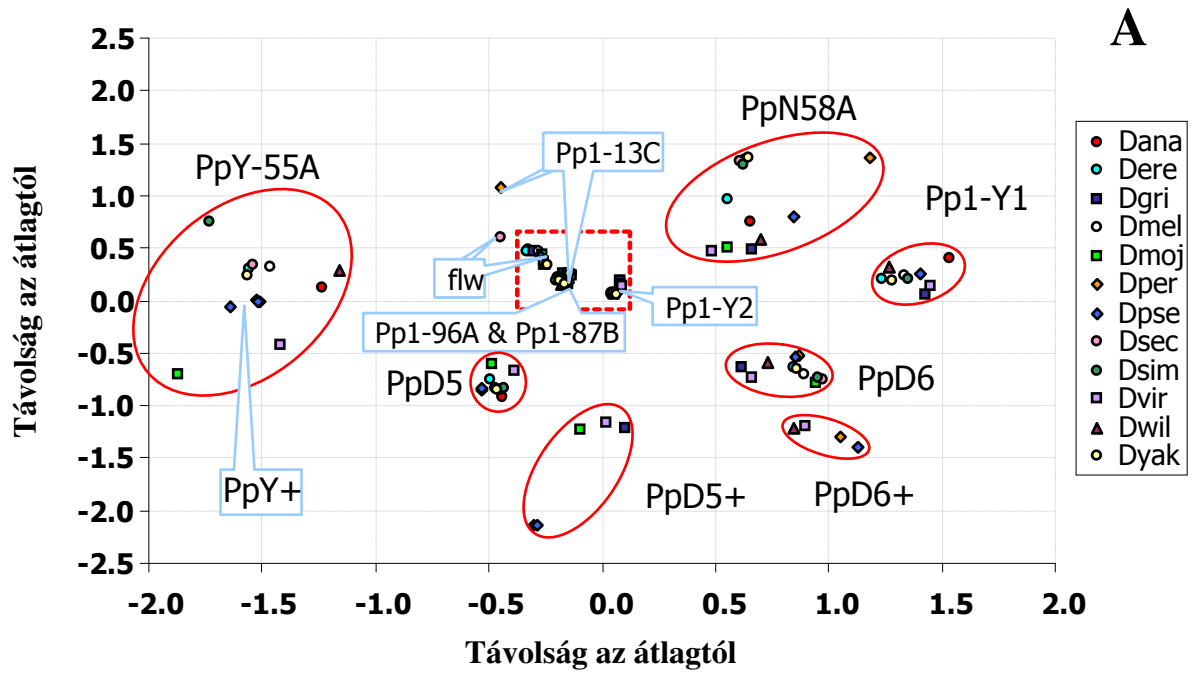
7.2.3 A *Drosophilidae* család új PPP génjei

A retrotranszpozíciók olyan új PPP enzimeket is eredményeztek (*PpD5+*, *PpD6+*, *PpY+*, *Pp4+*, *Pp6+*), amelyek nincsenek meg *D. melanogaster*-ben. Korábban Koerich és munkatársai (2008) leírták, hogy *D. willistoni* és a *D. virilis*, a *PpD6*-hoz hasonló gént tartalmaz, azaz 2 *PpD6* paralóg gén keletkezett duplikációval egyazon fajban. Munkánk során 4 további, eddig még nem jellemzett gént sikerült azonosítanunk (9. táblázat; 15. ábra), melyeket a *D. melanogaster* ortológja alapján neveztük el és + jellel egészítettünk ki. Az új gének más kromoszómális lokalizációba épültek be, az ősbibb paralógjuk pedig megmaradt az eredeti pozíciójában (Függelék F3. ábra).

A PPP1 alcsalád evolúciójának nyomon követése nehéznek bizonyult, mivel a hagyományos filogenetikai elemzés bizonytalan elágazási pontokat (alacsony „bootstrap” értékeket) eredményezett a családfákban (14., 15. ábra). Az 1-es típusú PPP fehérjeszekvenciák számának csökkentése nem oldotta meg a problémát (nem bemutatott eredmények), ezért a szekvenciákat multidimenzionális ábrázolási technikával is elemeztük (16A; 16B ábra). Az összehasonlítás kétdimenziós ábrázolásában két pont (ami egy-egy fehérjének felelnek meg) közötti távolság arányos a szekvenciák hasonlóságával.

A szekvencia analízis alapján (16A. ábra) sikerült megállapítanunk, hogy a *PpD5+* és a *PpD6+* gének a *PpD5* és *PpD6* paralógjaiból keletkeztek, amelyek két kivételtől eltekintve (9. táblázat) jelen vannak az összes vizsgált *Drosophila* fajban.

A *PpY+* és *Pp4+* retrogéneket az *obscura* csoport két közeli rokon fajában, a *D. pseudoobscura*-ban és a *D. persimilis*-ben azonosítottuk (9. táblázat). A *PpY-55A* és *PpY+* szekvenciák közötti hasonlóság (15., 16A. ábra) és a Müller A elemén való közeli elhelyezkedésük (Függelék F3. ábra) azt sugallja, hogy a *PpY+* a *PpY-55A*-ból keletkezett replikatív transzpozícióval. Az előző esethez hasonlóan, a *Pp4-19C* és a *Pp4+* génszekvenciák elemzése feltárta (15. ábra, függelék F2. ábra) hogy az intront tartalmazó *Pp4-19C* gén retrotranszpozíciójával keletkezett az intronmentes *Pp4+* gén.



16. ábra. Az 1-es típusú PPP katalitikus alegységek összehasonlítása

Az ábrán 127 1-es típusú PPP katalitikus alegységet ábrázoltunk. Minden egyes pont egy PPP-t jelöl. Az ortológ géneket piros vonallal kereteltük be. Kivételt a PpY-55A, PpY+ elkülönített területe képez, amely 2 paralóg gént tartalmaz. 7 szekvencia (Dana PpD6_R, Dper flw_R, Dper Pp1-Y1_R, Dsec Pp1-Y1_S, Dsec Pp1-Y2_R, Dsim Pp1-Y2_R) kívül esett a +/- 2.5 tartományon, ezért nem ábrázoltuk.

Az ábra B részén az A panelen található látható, piros szaggatott vonallal bekeretezett terület kinagyítva látható.

7.2.4 Az új típusú PPP gének expressziója *Drosophila* fajokban

Habár az új PPP gének teljes hosszúságú fehérjét kódolnak, amely tartalmazza a foszfatáz aktivitásához szükséges kritikus szakaszokat, kísérletek nélkül nehéz volt megjósolni, hogy vajon átíródnak vagy inkább inaktív pszeudogénekké degradálódnak. Annak érdekében, hogy erről meggyőződjünk, megvizsgáltuk a már ismert új típusú és az általunk felfedezett PPP gének, illetve paralógjaik expresszióját a *Drosophila* fajok evolúciója során. Ehhez 4 egymástól távoli rokon fajt használtunk fel. A *D. ananassae*-t a melanogaster csoportból, a *D. pseudoobscura*-t az obscura csoportból, a *D. willistoni*-t a willistoni csoportból, a *D. virilis*-t pedig a virilis csoportból választottuk ki. Kontrollként minden esetben a *D. melanogaster*-t alkalmaztuk.

Kísérleteink során kimutattuk, hogy a vizsgált PPP gének nagy része hím-specifikusan fejeződik ki a vizsgált fajokban (10. táblázat; Függelék F4. ábra). Kivételt a *CG11597* gén

10. táblázat. Az új PPP gének expressziója *Drosophila* fajokban

Gén/Fajok ^a	Dmel		Dana		Dpse		Dwil		Dvir	
	H	N	H	N	H	N	H	N	H	N
Nem ^b										
<i>Pp1-Y1</i>	+ !	-	+ !	-	+	-	+	-	+	-
<i>Pp1-Y2</i>	+ !	-	+ !	-	+	-	+	-	+	-
<i>PpD5</i>	+	-	+	-	+	-			+	-
<i>PpD5+</i>					+	-			+	-
<i>PpD6</i>	+	-	+ !	-	+	-	+	-	+	-
<i>PpD6+</i>					+	-	+	-	+	-
<i>PpN58A</i>	+	-	+	-	+	+/-	+	+/-	+	-
<i>PpY-55A</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>PpY+</i>					+	-				
<i>Pp4-19C</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pp4+</i>					+	(+)/-				
<i>PpV, Pp6</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pp6+</i>									+	-
<i>CG11597</i>	+	+	+	+						
<i>Pp1-13C</i>	+	-	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+/-

^a A gének elnevezésének magyarázata és a fajnevek rövidítéseinek leírása a 9. táblázatban található. Az új PPP géneket kiemeltük.

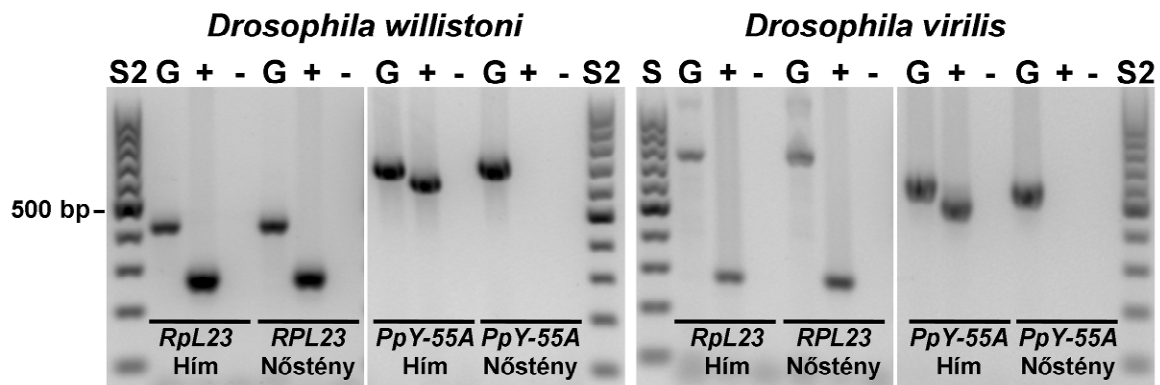
^b a nemek jelölése N: nőstény; H: hím.

Az üresen hagyott hely a hiányzó vagy a nem azonosított géneket jelöli

! A gén az Y kromoszómán helyezkedik el

képez, ami mindkét nemben kifejeződik. A *PpN58A* gén *D. pseudoobscura* és *D. willistoni* fajokban, a *Pp4+* gén pedig *D. pseudoobscura*-ban kis mértékben nőstényekben is expresszáldott. A *PpD5*, *PpD6* és *PpY-55A* gének hím-specifikus expressziója a *PpD5+*, *PpD6+* és *PpY+* paralógjaikban is megőrződött. Másrészt a nem nem-specifikus *Pp4-19C* és *PpV*, *Pp6* gének paralógjai is hím-specifikussá váltak (10. táblázat). A kontrollként használt *Pp1-13C* klasszikusnak mondható foszfatáz az irodalmi adatoknak megfelelően (Chintapalli és mtsai, 2007) *D. melanogaster*-ben hím-specifikus expresszáldott, viszont ez a többi fajra már kevésbé volt jellemző.

Az intronmentes gének miatt az mRNS-ről képződött RT-PCR termék és a gDNS-ről képződött PCR termék a legtöbb esetben egyforma méretű. Kivételt képez a *PpY-55A* gén, amely *D. willistoni* és *D. virilis* fajokban kisméretű intront tartalmaz (17. ábra).



17. ábra. A *PpY-55A* expressziója *D. willistoni* és *D. virilis* kifejlett egyedekben

A *PpY-55A* gén expresszióját RT-PCR módszerrel vizsgáltuk. A riboszómális *RpL23* fehérjét kódoló gént belső kontrollként használtuk. G: genomi DNS kontroll; +: pozitív kontroll, PCR reakció cDNS templáttal; -: negatív kontroll, PCR reakció RNS templáttal; S2: 100 bp-os DNS létra.

7.2.5 Az új típusú PPP gének gyors evolúciója *Drosophila* fajokban

Irodalomból ismert, hogy a hím-specifikus funkcióval rendelkező géneknek gyorsabb az evolúciója (magasabb a nem-szinonim és a szinonim szubsztitúciók aránya), mint a nem specializáltaknak (Muster és mtsai, 2006).

Szerettünk volna meggyőződni róla, hogy az általunk tanulmányozott hím-specifikusan kifejeződő gének is követik-e ezt a szabályt. Ennek érdekében elemeztük a 12 vizsgált *Drosophila* faj klasszikus és a nagyrészt hím-specifikus expressziót mutató új típusú protein foszfatázok (a már ismert és az általunk felfedezettek) katalitikus régióit kódoló

11. táblázat. A PPP gének evolúciója a *Drosophilidae* család 12 fájában

	Foszfataáz gén	Szekvenciák	Kodonok	R ¹	ds ²	dn ³	dn/ds ⁴
Klasszikus PPP	<i>Pp1a-96A</i>	11	265	2.706	0.643	0.003	0.0047
	<i>Pp1-87B</i>	12	265	2.416	0.645	0.013	0.0202
	<i>Pp1-13C</i>	11	265	2.687	0.642	0.024	0.0374
	<i>flw, Pp1-9C</i>	9	265	2.612	0.540	0.003	0.0056
	<i>CanA1</i>	12	277	1.531	0.634	0.020	0.0315
	<i>Pp2B-14D</i>	11	277	1.711	0.413	0.011	0.0266
	<i>CanA-14F</i>	9	277	2.111	0.420	0.005	0.0119
	<i>mts, Pp2A</i>	12	265	1.724	0.580	0.006	0.0103
	<i>Pp4-19C</i>	11	265	2.331	0.779	0.006	0.0077
	<i>PpV, Pp6</i>	10	265	1.680	0.721	0.022	0.0305
	<i>PpD3, Pp5</i>	12	279	1.759	1.071	0.031	0.0289
	<i>rdgC, Pp7</i>	11	276	1.428	1.289	0.058	0.0450
	Átlag						0.0217
	± SD						0.0135
Új típusú PPP	<i>Pp1-Y1</i>	10	265	1.236	1.497	0.143	0.0955
	<i>Pp1-Y2</i>	10	265	1.527	1.659	0.057	0.0344
	<i>PpD5</i>	10	265	1.058	0.872	0.141	0.1617
	<i>PpD5+*</i>	5	265	2.998	0.633	0.218	0.3444
	<i>PpD6</i>	11	265	1.270	1.063	0.133	0.1251
	<i>PpD6+*</i>	4	262	1.408	1.106	0.197	0.1781
	<i>PpN58A</i>	11	265	1.194	0.935	0.168	0.1797
	<i>PpY-55A</i>	10	265	1.057	1.071	0.213	0.1989
	<i>PpY+</i>	2	265	1.036	0.043	0.023	0.5349
	<i>Pp4+</i>	2	229	1.122	0.028	0.012	0.4286
	<i>Pp6+</i>	3	228	2.278	0.798	0.061	0.0764
	<i>CG11597</i>	6	237	1.373	0.503	0.086	0.1710
	Átlag						0.2107
	± SD						0.1496

¹ A teljes tranzíció/transzverzió arány; ² A szinonim szubsztitúciók száma; ³ A nem-szinonim szubsztitúciók száma; ⁴ A nem-szinonim és a szinonim szubsztitúciók aránya

*A *Dpse PpD5+*, *Dper PpD5+* és *Dvir PpD6+* fehérjék deléció miatt egy aminosavval rövidebbek.

A *Dsec Pp4-19C*, *Dper Pp1-96A*, *Dper Pp1-13C*, *Dsim flw*, *Dsec flw*, *Dper flw*, *Dsec Pp1-Y1*, *Dmoj Pp1-Y1*, *Dsim Pp1-Y2*, *Dsec Pp1-Y2*, *Dwil PpD5*, *Dgri PpD5*, *Dana PpD6*, *Dper PpN58A*, *Dvir PpY-55A*, *Dgri PpY-55A*, *Dvir Pp2B-14D*, *Dmoj CanA-14F*, *Dsim PpV*, *Dsec PpV*, *Dsim rdgC* gének részleges szekvenciáit kizártuk az összehasonlításból. A fajnevek rövidítései a 9. táblázatban találhatóak.

nukleotid szekvenciákat (11. táblázat). A klasszikus foszfatázok közé a rovar PPP készlet 8 tagján kívül a *Pp1-87B* és *Pp1-13C*, illetve a *Pp2B-14D* és *CanA-14F* retrogéneket is besoroltuk, mivel a génduplikációk első hullámában keletkeztek a klasszikus foszfatázokból (7.2.1 , 8.2.1 fejezet). Az elemzés során meghatároztuk a teljes tranzíció/transzverzió arányt (R), a szinonim (ds) a nem-szinonim (dn) szubsztitúciók számát, illetve az előbbi két adatból a dn/ds arányt is (11. táblázat). A táblázatból jól látható, hogy az új típusú foszfatázok szignifikánsan magasabb dn/ds szubsztitúciós arányokat mutatnak a nem specifikus foszfatázokhoz képest. Ezzel igazoltuk a hím-specifikus gének gyorsabb evolúciójának elméletét az általunk vizsgált foszfatázok esetében is.

7.2.6 A PPP gének számának és lokalizációjának változásai

A PPP gének keletkezése mellett a gének elvesztése és a kromoszómális lokalizációbeli, illetve génszerkezeti változások szintén hozzájárultak a PPP család evolúciójához a *Drosophilidae* családban.

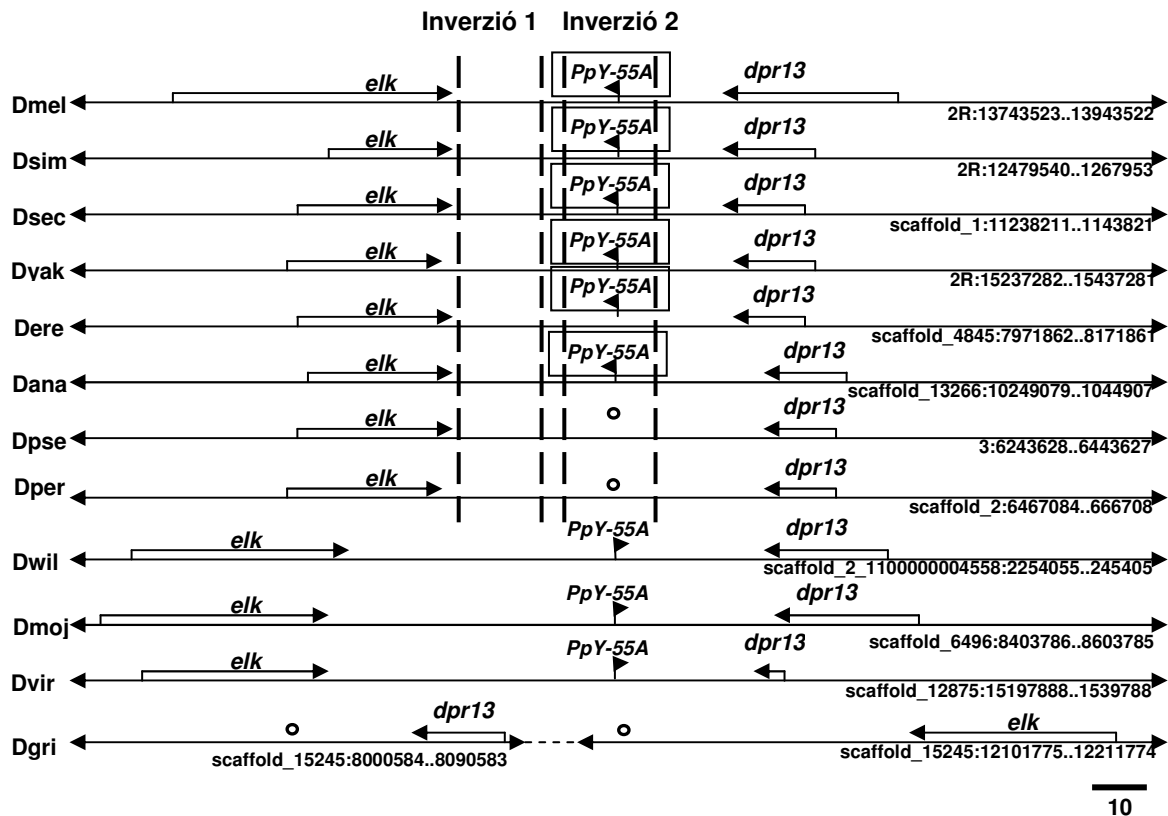
A hiányzó gének egy részét valószínűleg a random szekvenálási stratégia hibája miatt nem találtuk meg az adatbázisban. Ennek a kiküszöbölése érdekében PCR technikát használtunk a gének sokszorozására és azonosítására (9. táblázat). A módszerrel két PPP gént azonosítottunk, kettőnek a szekvenciáját korrigáltuk, négynek pedig megerősítettük a jelenlétét (9. táblázat). Néhány PPP gént azonban továbbra sem sikerült azonosítanunk. Ennek egyik valószínű oka az lehetett, hogy a primer tervezéséhez csak távoli rokon fajok szekvenciái álltak rendelkezésünkre.

A génmozgások nyomon követéséhez összehasonlítási alapként a *D. melanogaster* PPP gének Müller elemeken való lokalizációját használtuk (4. ábra). A Müller elemeken történt génmozgások a 9. táblázatban és a 15. ábrán láthatók. A PPP gének részletes lokalizációjának összesítése a Függelék F3. ábráján található. Az adatok alapján a PPP gének jól konzervált helyvel és irányultsággal rendelkeznek a *melanogaster* alcsoport tagjaiban. Másrészt pedig sok PPP gén, elsősorban az 1-es típusúak, gyakran változtatják a helyzetüket a távoli rokon *Sophophora* és *Drosophila* alfajokban.

A *Pp1-Y1* és a *PpD6+* hiányát *D. mojavensis*-ben és a *PpD6+* elvesztését *D. grimshawi*-ban korábban már Koerich és mtsai (2008) is leírták. A génátrendeződések PPP gének evolúciójában betöltött szerepét a következő példákon keresztül mutatom be.

A *PpY-55A* gén átrendeződései

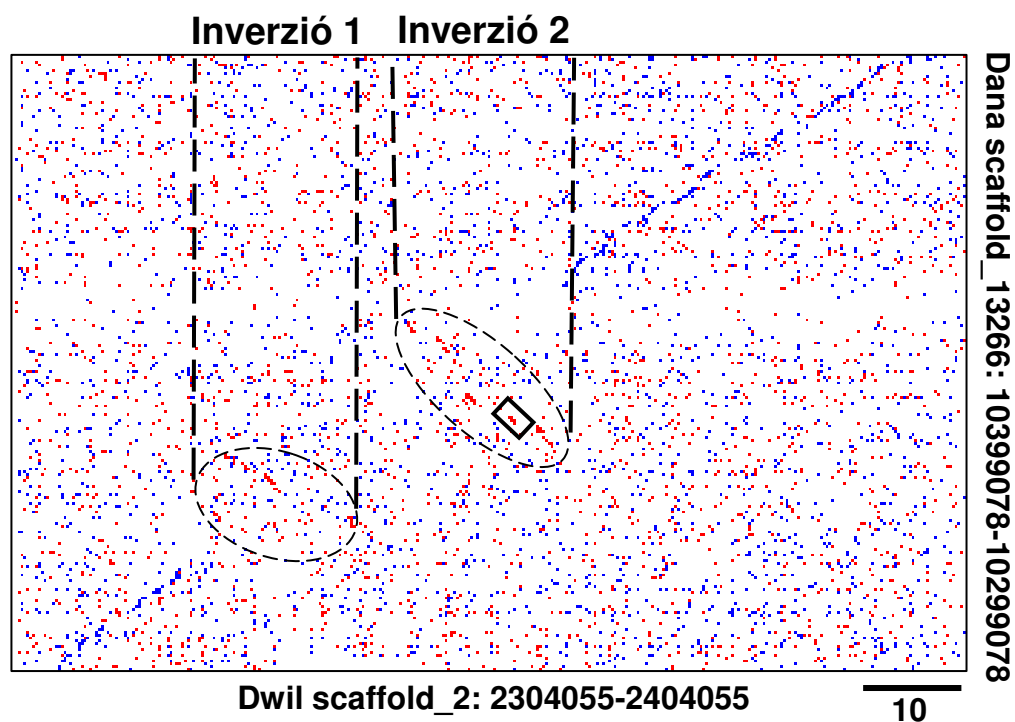
A *PpY-55A* gén egy intront tartalmazó ősből alakult ki, ami a repleta, virilis és willistoni csoportok tagjaiban meg is őrződött (18. ábra, 9. táblázat). Az intron tartalmú *PpY-55A* eltűnt a *D. grimshawi* fajból (18. ábra, 9. táblázat). A *PpY-55A* a C Müller elem az *elk* és *dpr13* „landmark” gének közötti szakaszon található az azt tartalmazó fajokban. Ez a régió *D. grimshawi*-ban nagymértékű átrendeződésen esett át, miközben a *PpY-55A* eltűnt az említett gének által határolt régióból (18. ábra).



18. ábra. A *PpY-55A* gén szinténiája különböző *Drosophila* fajokban

A körülbelül 200 kbp hosszúságú kromoszómális szakaszok kettős nyíllal ellátott vonalakkal jelöltük. A fajnevek rövidítései a bal oldalon, a kromoszómák, „scaffold-ok” és a megfelelő tartományok a jobb oldalon találhatóak. A szaggatott vonal nagy DNS darabokra utal, ami a nyíllal jelölt szakaszok között található. A nyilak az *elk* és *dpr13* gének irányát és méretét, az **o** pedig hiányzó gének valószínűsített helyzetét jelölik. Az intront nem tartalmazó gének nevét bekereteztük.

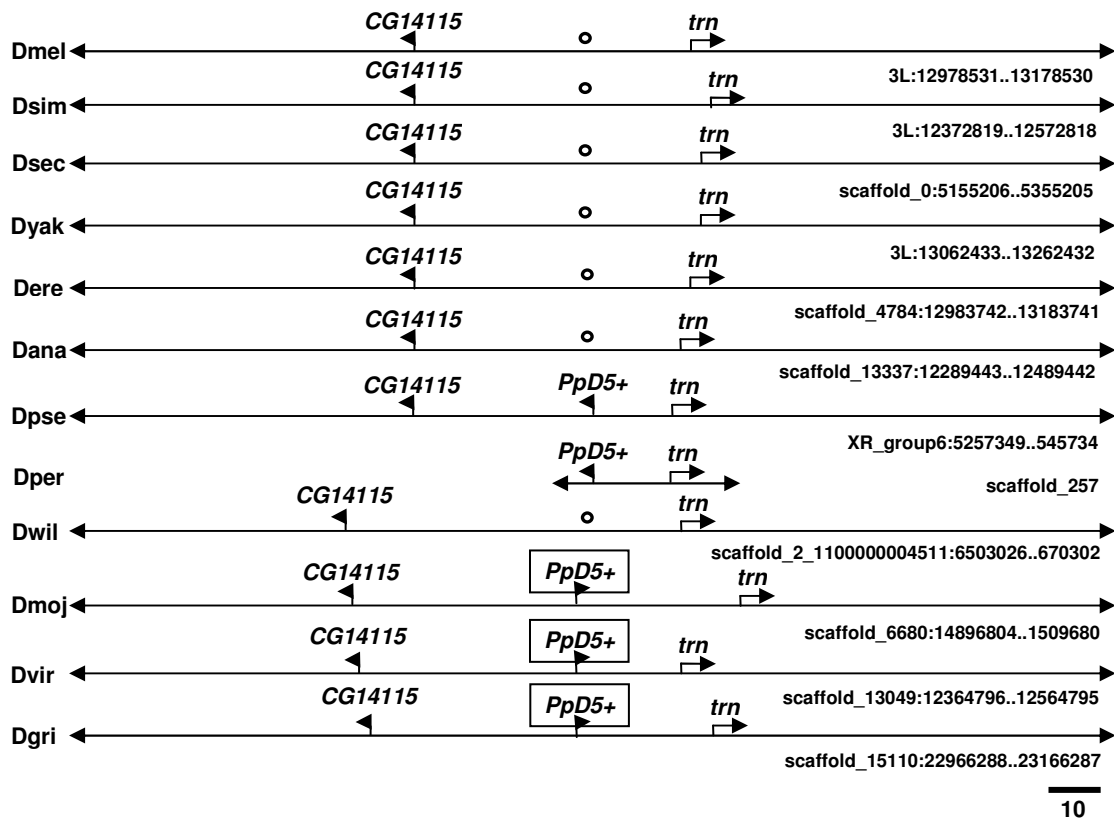
Az obscura csoportban a *PpY-55A* intronmentes változata áthelyeződött az A elemre (X kromoszóma), ahol duplikálódott (7.2.3 fejezet; Függelék F3. ábra). A transzlokálódott gén helye még mindig felismerhető a C elemen (18. ábra), de a szekvenciája már degradálódott. Másrészt a melanogaster csoportban az új, intronmentes *PpY-55A* gén lecserélte a régi, intront tartalmazó változatot a C elemen, és a kódoló szál iránya is megfordult egy nagyobb kromoszómális szakasz inverziójának következményeként (18., 19. ábra) (vö. 8.2.4 fejezet).



19. ábra. A *PpY-55A* gént tartalmazó homológ kromoszómális régiók dot plot elemzése
 Az ábrán *D. willistoni* (*Dwil*) és *D. ananassae* (*Dana*) scaffold-ját hasonlítottuk össze. A két nagy inverziót szaggatott vonallal vettük körbe. Az invertált *PpY-55A* gént bekereteztük.

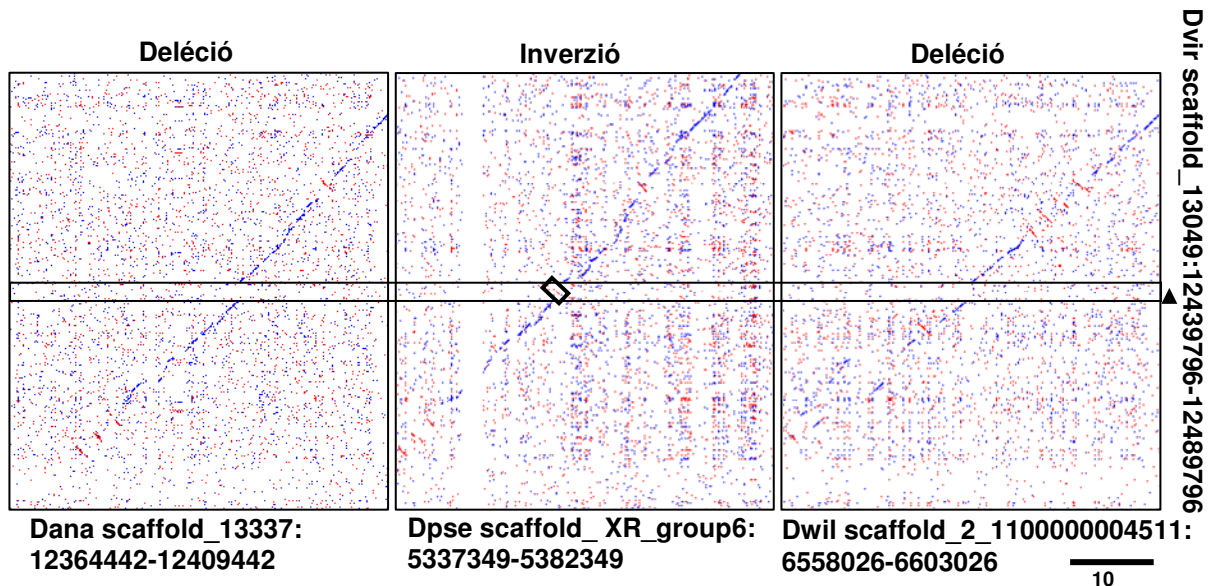
A *PpD5+* gén átrendeződései

A *D. pseudoobscura* és *D. persimilis* *PpD5+* génje egy egyedi 60 bp-os intront tartalmaz a kódoló régióban (9. táblázat; Függelék F1. táblázat). Az intron szekvenciáját és pozícióját sem találtuk meg egyetlen PPP génben sem. A gén eltűnt a melanogaster és willistoni csoportok tagjaiból, viszont az intronmentes változata kimutatható az összes ősi *Drosophila* alfajban (9. táblázat; 20., 21. ábra). Érdekes módon az intron megszerzése vagy elvesztése a gén inverzióval járt együtt. A *PpD5+* elvesztését *D. willistoni*-ban szintén vizsgálattal (20. ábra) és a genomi környezetének dot plot elemzésével (21. ábra) is igazoltuk (vö. 8.2.4 fejezet).



20. ábra. A *PpD5+* gén szinténiája különböző *Drosophila* fajokban

A körülbelül 200 kbp hosszúságú kromoszómális szakaszok kettős nyíllal ellátott vonalakkal jelöltük. A fajnevek rövidítései a bal oldalon, a kromoszómák, „scaffold-ok” és a megfelelő tartományok a jobb oldalon találhatóak. A nyilak a *CG14115* és *trn* irányát és méretét, az \circ pedig hiányzó gén valószínűsített helyzetét jelöli. Az intronmentes gének nevét bekereteztük.

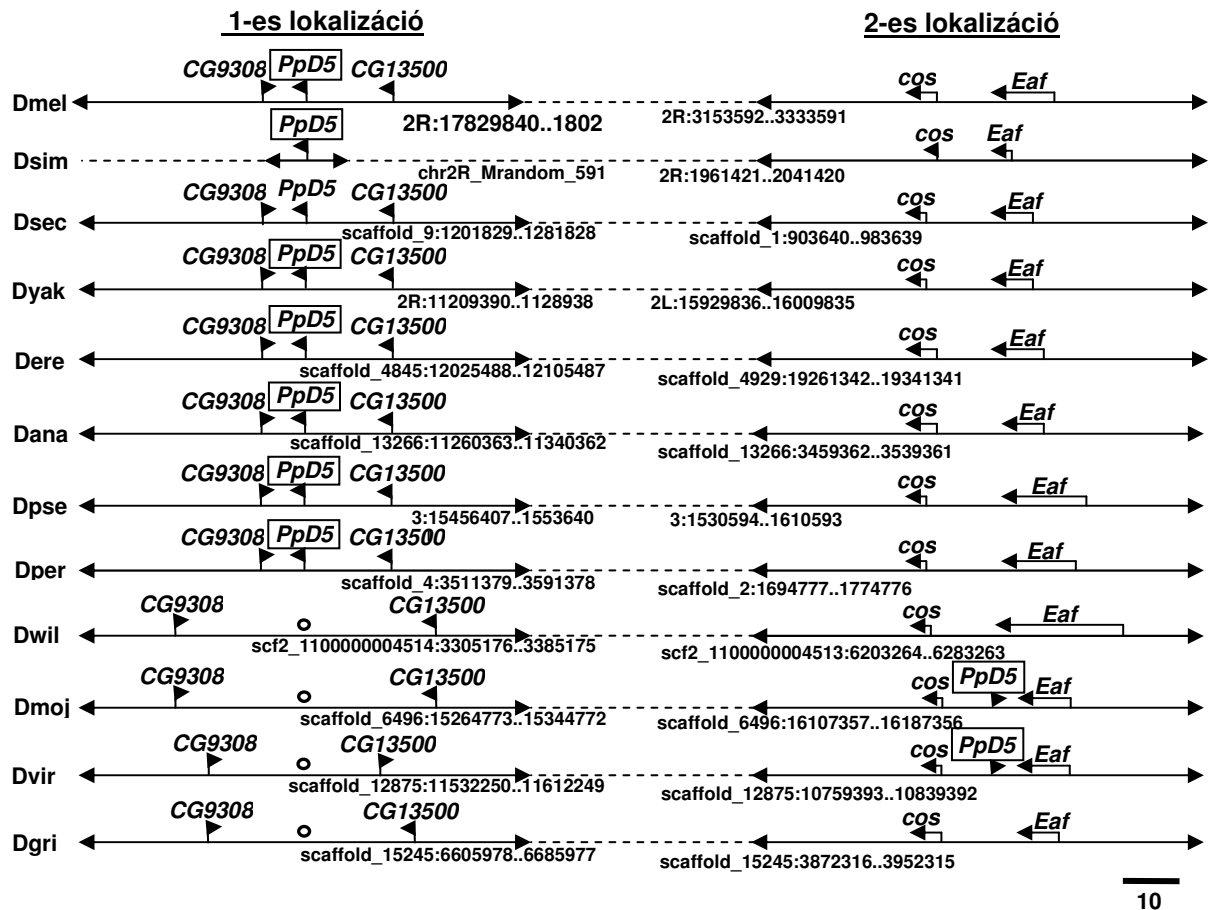


21. ábra. A *PpD5+* gént tartalmazó homológ kromoszómális régiók dot plot elemzése

Az ábrán a *D. ananassae* (*Dan*), *D. pseudoobscura* (*Dwil*) és *D. willistoni* (*Dwil*) scaffold-ját hasonlítottuk össze a *D. virilis* (*Dvir*) fajével. A jobb oldal található kis nyíl a *PpD5+* gén méretét és irányultságát mutatja *D. virilis*-ben. A gén jelenléte a két vízszintes vonal közötti térrészen valószínűsíthető. Az invertált *PpD5+* gént bekereteztük *D. pseudoobscura* esetében. A gén eltűnt a *D. ananassae* és *D. willistoni* fajokból.

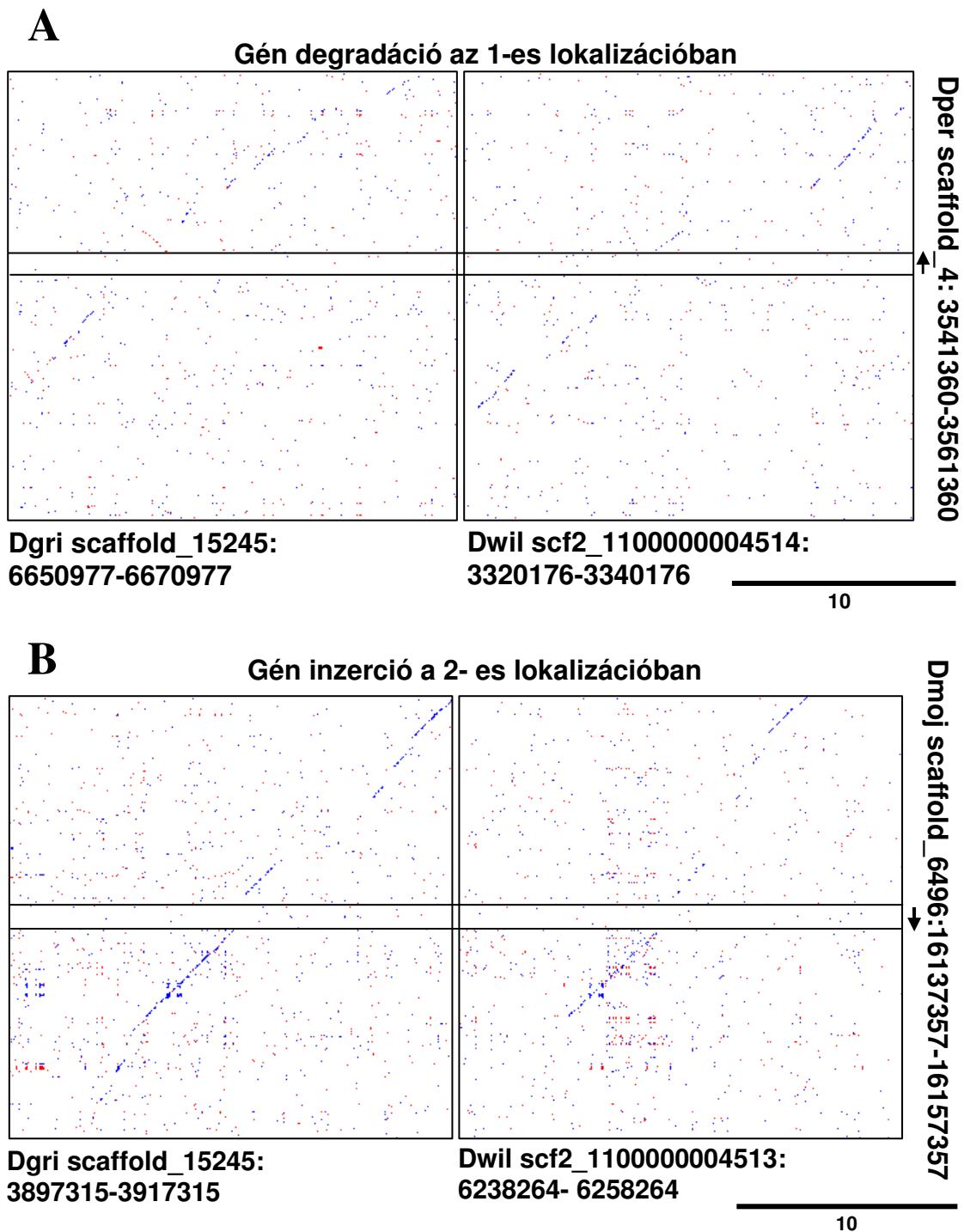
A *PpD5* gén átrendeződései

A *melanogaster* és *obscura* csoport szinténia elemzése feltárta, hogy *PpD5* génnek jól konzervált lokalizációja van a C elemen a *CG9308* és a *CG13500* „landmark” gének között (22. ábra, 1-es lokalizáció). A *Drosophilidae* család más tagjaiban, úgymint a *D. willistoni* és *D. grimshawi* fajokban a gén helye még fellelhető, viszont a szekvenciája már degradálódott (23A. ábra). Tehát *D. willistoni* és *D. grimshawi* fajokban a *PpD5* eltűnt az 1-es lokalizációból, míg *D. mojavensis* és *D. virilis* fajokban új pozícióba helyeződött át a szintén C elemen található *cos* és *Eaf* gének közé (22. ábra, 2-es lokalizáció). A *PpD5* gén hiánya pedig *D. grimshawi* és *D. willistoni* fajokban azt jelzi, hogy a *PpD5* gén *D. mojavensis*-ben inzertálódott be ebbe a pozícióba. (23B., 27. ábra) (vö. 8.2.4 fejezet).



22. ábra. A *PpD5* gén szinténiája különböző *Drosophila* fajokban

A körülbelül 200 kbp hosszúságú kromoszómális szakaszok kettős nyíllal ellátott vonalakkal jelöltük. A fajnevek rövidítései a bal oldalon, a kromoszómák, „scaffold-ok” és a megfelelő tartományok szintén fel vannak tüntetve. A nyilak a „landmark gének” gének irányát és méretét, az **o** pedig hiányzó gén valószínűsített helyzetét jelöli. Az intront nem tartalmazó gének nevét bekereteztük.



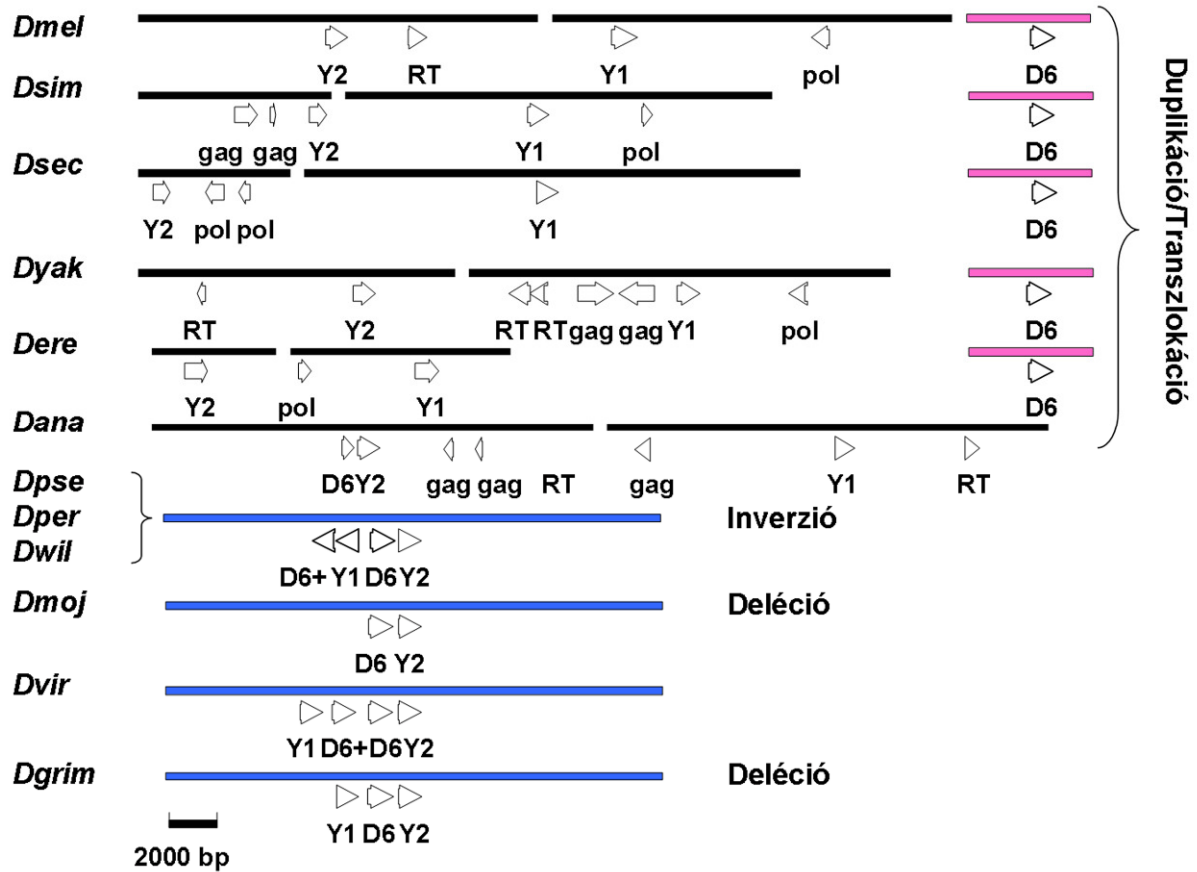
23. ábra. A PpD5 gént tartalmazó homológ kromoszómális régiók dot plot elemzése

Az ábra „A” részén *D. grimshawi* (*Dgri*) és *D. willistoni* (*Dwil*) scaffold-ját hasonlítottuk össze *D. persimilis* (*Dper*) fajéval. A jobb oldal található kis nyíl a PpD5 gén méretét és irányultságát mutatja *D. persimilis*-ben. A gén jelenléte a két vízszintes vonal közötti térrészen valószínűsíthető, de nem lehetett azonosítani *D. grimshawi* és *D. willistoni* fajokban, mivel a szekvenciája degradálódott.

Az ábra „B” részén *D. grimshawi* (*Dgri*) és *D. willistoni* (*Dwil*) scaffold-ját hasonlítottuk össze *D. mojavensis* (*Dmoj*) fajéval. A jobb oldal található kis nyíl a PpD5 gén méretét és irányultságát mutatja *D. mojavensis*-ben. A gén jelenléte a két vízszintes vonal közötti térrészen valószínűsíthető.

A *PpD6*, *PpD6+*, *Pp1-Y1*, *Pp1-Y2* géncsoport átrendeződései

Koerich és munkatársaival (2008) egyetértésben úgy találtuk, hogy számos olyan PPP gén, amely jól elkülönül *D. melanogaster*-ben, több ősi *Drosophila* fajban egy géncsoportot alkot (24. ábra).



24. ábra. A *PpD6*, *PpD6+*, *Pp1-Y1*, *Pp1-Y2* géncsoport átrendeződései

Az ábrán a *PpD6* (*D6*), *PpD6+* (*D6+*), *Pp1-Y1* (*Y1*) és a *Pp1-Y2* (*Y2*) gének kromoszómális elhelyezkedése látható különböző *Drosophila* fajokban. A kromoszómákat vízszintes vonalakkal jelöltük. A Müller elemeket (C-kék; B-rózsaszín) és az Y kromoszómát (fekete) színekkel jelöltük. A kódoló régiók irányát nyilak jelzik, amelyek az 5'-3' irányt mutatják a szensz szálon. Az Y kromoszómán az inaktív virális reverz transzkriptáz (RT), a pol és gag gének elhelyezkedését és irányát is feltüntettük; itt a nyilak csak a relatív irányokat jelölik a rövid DNS darabon.

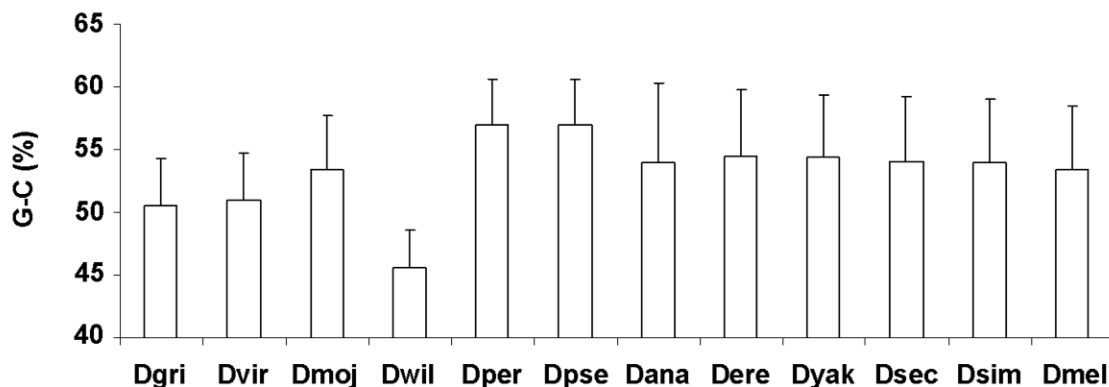
A *D. virilis* fajban található géncsoporton teljes génátrendeződést figyelhetünk meg. A *Pp1-Y1*, *PpD6+*, *PpD6* és *Pp1-Y2* gének ugyanabban az orientációban, egymás után találhatóak a C elemen. A redundáns *PpD6+* a *D. grimshawi*-ből, a szintén redundáns *Pp1-Y1* és *PpD6+* pedig a *D. mojavensis* fajból tűnt el. A willistoni és obscura csoportok *Pp1-Y1* és *PpD6+* géneket magában foglaló DNS szakasza megfordult, ami új génsorrendet (*PpD6+*, *Pp1-Y1*, *PpD6*, *Pp1-Y2*) eredményezett. Ez a géncsoport a melanogaster csoportban felbomlott. A

PpD6+ a csoport összes tagjából eltűnt. *D. ananassae*-ben pedig a csoport egyik fele (*Pp1-Y2*, *PpD6*) az Y kromoszómába épült be (Koerich és mtsai, 2008). A csoport tagjainak elkülönülése is végbement a melanogaster alcsoport közös ősében. A *PpD6* a B elemre vándorolt (Függelék F3. ábra), míg a *Pp1-Y1* és a *Pp1-Y2* az Y kromoszóma heterokromatikus régiójába került (Koerich és mtsai, 2008).

7.2.7 A PPP gének genomi környezethez való adaptációja

Korábban már leírták, hogy a heterokromatikus környezetben tartózkodó géneknek alacsonyabb a G-C tartalma, mint paralógaiknak az eukromatikus régiókban (Diaz-Castillo és mtsai, 2007). A génadaptációs elméletet továbbfejlesztve megvizsgáltuk, hogy a PPP gének autoszómális kromoszómák és a heterokromatinban gazdag Y kromoszóma közötti mozgása hatással van-e a bázisösszetételükre.

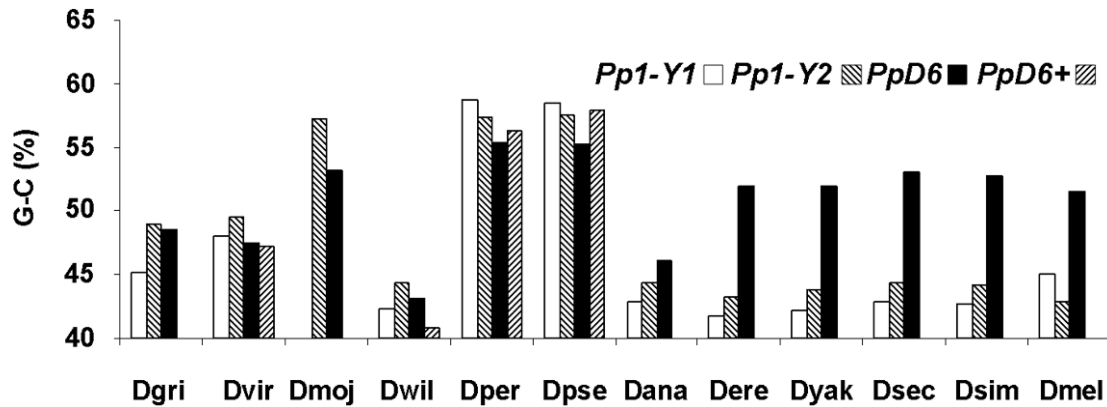
A 25. ábra szerint a PPP gének kódoló régiójának átlagos G-C tartalma 50% és 60% között változik, kivéve a *D. willistoni*-t, amely alacsonyabb arányban tartalmazza ezeket a nukleotidokat. A *D. willistoni* esetében megfigyelt alacsonyabb G-C tartalom azzal magyarázható, hogy bizonyos aminosavak kodonjaiban a T-t részesíti előnyben a C-vel szemben (Vicario és mtsai, 2007).



25. ábra. A PPP gének G-C tartalma

Az ábrán a PPP gének átlagos G-C tartalma látható a szórásértékekkel együtt.

Megvizsgáltuk a 24. ábrán található géncsoport G-C tartalmának változását is az átrendeződéseik során. Az elvárásoknak megfelelően a foszfatáz csoporttagok G-C tartalma az átlaghoz közelít, amikor a C vagy a B elemen találhatóak, viszont az arány szignifikánsan csökken, amikor az Y kromoszómára kerülnek (26. ábra).



26. ábra. A Pp1-Y1, Pp1-Y2, PpD6, PpD6+ géncsoport G-C tartalma

A következőkben összehasonlítottuk a *Drosophila* fajokban található összes, Y kromoszóma és más kromoszómák között áthelyeződő gének G-C tartalmát (12. táblázat). Megállapítottuk, hogy más gének esetében is megfigyelhető a G-C tartalom csökkenése, amikor azok az Y kromoszómára helyeződnek át.

12. táblázat. Az Y és más kromoszómák között helyzetüket változtató *Drosophila* gének kódoló régióinak G-C tartalma

Fajok/Gén ^a	PPr-Y	PRY	kl-5	ARY	CCY	WDY	Pp1-Y1	Pp1-Y2	PpD6
<i>Dmel</i>	34.9	36.2	40.3	35.4	39.4	43.8	45.0	42.9	51.5
<i>Dyak</i>	34.6	37.4	40.9	36.1	39.1	43.1	42.2	43.8	52.0
<i>Dere</i>	34.7	35.2	40.9	36.2	39.6	43.2	41.7	43.3	52.0
<i>Dana</i>	32.9	35.2	38.4	38.1	38.0	40.8	42.9	44.3	46.1
<i>Dpse</i>	35.3	50.2 ^b	53.1 ^c	38.4	54.0	53.9	58.5	57.5	55.2
<i>Dwil</i>	34.8	36.3	42.0	37.8	39.1	43.7	42.3	44.4	43.1
<i>Dmoj</i>	35.2	37.8	37.2	50.5	47.6	50.9		57.2	53.2
<i>Dvir</i>	34.9	39.2	38.9	46.8	50.0	53.0	48.0	49.5	47.5
<i>Dgri</i>		37.6 ^b	38.8	44.5	49.0	51.2	45.2	49.0	48.5

^a Az Y kromoszómán elhelyezkedő géneket sárga háttérrel ábrázoltuk. A gének kromoszómális lokalizációját Koerich és mtsai (2008) írták le. Három gén lokalizációját kijavítottuk (b és c).

^b A PRY gén az XL kromoszómán található (A Müller elem), *D. pseudoobscura*-ban, *D. grimshawi*-ban viszont az Y kromoszómán

^c A kl-5 gén a 2-es kromoszómán (E Müller elem) található *D. pseudoobscura*-ban.

Az üresen hagyott hely az elvesztett vagy a hiányzó géneket jelöli.

8. DISZKUSSZIÓ

8.1 Új típusú PPP gének *D. melanogaster* -ben

A *D. melanogaster* PPP gének expressziójára vonatkozó irodalmi adatok részben hiányosak voltak a meglévők pedig microarray technikán alapultak (13. táblázat). Az új típusú *PpD5*, *PpD6*, *Pp1-Y1*, *Pp1-Y2* és *CG11597* gének funkciójáról nem állt rendelkezésünkre irodalmi adat. Ennek vizsgálata érdekében először megvizsgáltuk a gén kifejeződését a *D. melanogaster* egyedfejlődése során. Kiderült, hogy az összes fejlődési stádiumban kifejeződő *CG11597* kivételével a vizsgált gének csak hím egyedekben expresszálódtak. A *D. melanogaster* klasszikus foszfatázai közül egyedül a *Pp1-13C* gén mutat hím-specifikus expressziót, a többi gén nagy része pedig a legtöbb fejlődési stádiumban kifejeződik (12. táblázat). További vizsgálataink során azt is megállapítottuk, hogy a gének a *CG11597* kivételével más testrészekben nem, csak a testtiszben fejeződtek ki. Hasonló expressziós mintázatot írtak le korábban az új típusú foszfatázok másik két tagjánál, a *PpY-55A* és *PpN58A* géneknél is (Armstrong és mtsai, 1995; 1998). Szerkezeti jóslások alapján a *PpY-55A*, *PpN58A*, *PpD5*, *PpD6*, *Pp1-Y1* és *Pp1-Y2* gének hasonló fehérjét kódolnak, melyek az 1-es típusú foszfatázok közé tartoznak (Cohen 1997; Carvalho és mtsai, 2001). Eredményeink összhangban vannak a korábbi irodalmi adatokkal, illetve kiegészítik azokat (12. táblázat; Armstrong és mtsai, 1995, 1998; Carvalho és mtsai, 2001; Chintapalli és mtsai, 2007), amelyek szerint ez a hat szerkezetileg rokon, új típusú foszfatáz hasonló expressziós tulajdonságokkal rendelkezik. A *CG11597* eltérő expressziója valószínűleg a szerkezetére vezethető vissza, mivel a 2-es típusú foszfatázokhoz tartozik (Morrison és mtsai, 2000).

A gének expressziójának szabályozása is fontos kérdés. Irodalomból ismert, hogy a testtisz-specifikus gének kifejeződést két testtisz-specifikus transzkripciós komplex biztosítja, amelyek kötőhelyei a gének rövid promóter szekvenciáin találhatóak (White-Cooper H, 2010). Annak érdekében, hogy jobban megismerjük a regulációjukat, az tervezzük, hogy megvizsgáljuk ezen rövid DNS szakaszoknak a jelenlétét az általunk tanulmányozott hím- és testtisz-specifikusan kifejeződő gének esetében is.

13. táblázat. A *D. melanogaster* PPP gén expressziója

Gén	Embrió		Lárva			Báb	Kifejlett egyed		Here	Referenciák
	korai	késői	L1	L2	L3		Nóstény	Hím		
<i>Pp1a-96A, Pp1-96A</i>	+		-			-	+		+	Dombrádi <i>et al.</i> , 1990, Andrews <i>et al.</i> , 2000, Pilot <i>et al.</i> , 2006, Terry <i>et al.</i> , 2006
<i>Pp1-87B</i>	+		+			+	+		+	Dombrádi <i>et al.</i> , 1989, Andrews <i>et al.</i> , 2000, Terry <i>et al.</i> , 2006
<i>Pp1-13C</i>	+		(+)			+	-	+	+	Dombrádi <i>et al.</i> , 1993, Andrews <i>et al.</i> , 2000, Terry <i>et al.</i> , 2006, Adam <i>et al.</i> , 2010
<i>flw, Pp1-9C</i>	+	+	+			+	+		+	Dombrádi <i>et al.</i> , 1990, Andrews <i>et al.</i> , 2000, Raghawan <i>et al.</i> , 2000
<i>Pp1-Y1</i>	-	-	-	-	-	+	-	+	+	Adam <i>et al.</i> , 2010
<i>Pp1-Y2</i>	-	-	-	-	-	+	-	+	+	Chintapalli <i>et al.</i> , 2007, Adam <i>et al.</i> , 2010
<i>PpD5</i>	(+)	-	-	-	-	+	-	+	+	Arbeitman <i>et al.</i> 2002, Chintapalli <i>et al.</i> , 2007, Adam <i>et al.</i> , 2010
<i>PpD6</i>	-	(+)	-	-	-	+	-	+	+	Chintapalli <i>et al.</i> , 2007, Adam <i>et al.</i> , 2010
<i>PpN58A</i>	-	-	+			+	-	+	+	Armstrong <i>et al.</i> , 1998, TERRY <i>et al.</i> , 2006, Chintapalli <i>et al.</i> , 2007, Adam <i>et al.</i> , 2010
<i>PpY-55A</i>	-	-	+			+	-	+	+	Armstrong <i>et al.</i> , 1995, Terry <i>et al.</i> , 2006, Adam <i>et al.</i> , 2010
<i>CanA1</i>	-		-/(+)			-	-/(+)		-	Guerini <i>et al.</i> , 1992, Chintapalli <i>et al.</i> , 2007
<i>Pp2B-14D (14E)</i>	+	-	-	-	-	(+)	+		-	Hong aés Ganetzky 1996, Andrews <i>et al.</i> , 2000, Beckstead <i>et al.</i> , 2005, Pilot <i>et al.</i> , 2006
<i>CanA-14F</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	Andrews <i>et al.</i> , 2000, Arbeitman <i>et al.</i> 2002
<i>mts, Pp2A</i>	+	+	+			+	+		+	Orgad <i>et al.</i> , 1990, Mayer-Jaekel <i>et al.</i> , 1992, Andrews <i>et al.</i> , 2000, Terry <i>et al.</i> , 2006
<i>Pp4-19C (19D)</i>	+	(+)	-			-	-		?	Helps <i>et al.</i> , 1998, Arbeitman <i>et al.</i> 2002, Miskei <i>et al.</i> , 2011
<i>PpV, Pp6</i>	+	+	-			-	-		-	Mann <i>et al.</i> , 1993, Andrews <i>et al.</i> , 2000, Chintapalli <i>et al.</i> , 2007, Miskei <i>et al.</i> , 2011
<i>CG11597</i>	(+)	+	+	(+)	+	+	(+)	+	+	Andrews <i>et al.</i> , 2000, Chintapalli <i>et al.</i> , 2007, Adam <i>et al.</i> , 2010
<i>PpD3, Pp5</i>	+	+	-/(+)			+	+	+	-/(+)	Brown <i>et al.</i> , 2000, Arbeitman <i>et al.</i> 2002, Chintapalli <i>et al.</i> , 2007
<i>rdgC, Pp7</i>	-		+			-	(+)	+	-	Steele <i>et al.</i> , 1992, Arbeitman <i>et al.</i> 2002, Chintapalli <i>et al.</i> , 2007

- = nincs expresszió -/(+) = csekély expresszió (+) = alacsony expresszió + = erős expresszió ? = ellentmondásos eredmény

Korábban már immunhisztokémiával kimutatták, hogy a PpY-55A fehérje a ciszta sejtek magjában halmozódik fel (Armstrong és mtsai, 1995). Ezzel a módszerrel állapították meg a jelenlétét a testisz apikális végénél az elsődleges spermatocitákban (Kókai és mtsai, 2006) illetve a testisz konkáv részén, az érett spermatocitákban is. Kísérleteink során mi is detektáltuk a *PpY-55A* mRNS-t a várt helyeken, habár a sejtípus azonosítása nem sikerült a képek alacsony felbontása miatt. A *PpD5* és a *Pp1-Y1* mRNS-ét főként a fejlődő cisztasejtekben azonosítottuk a pozitív kontrollként használt *PpY-55A*-éhoz hasonlóan. Ez a három új típusú foszfatáz hasonló expressziós képet mutat, mint más testisz-specifikus foszfatázok (Zhao és mtsai, 2009), azaz a korai spermatocitákban fejeződnek ki, tárolódnak a spermiogenezis későbbi szakaszaira, majd pedig eltűnnek a spermatidákban. A *PpD6* viszont jól kivehető, pontoszerű expressziós mintázatot mutatott és az mRNS-e a hosszabbodó spermatid köteg disztális végén volt detektálható. Ez az eloszlás emlékeztet a Berreau és munkatársai (2008) által leírt úgynevezett „comet és cup” géntermékekre. A szerzők leírták, hogy az említett géntermékek a meotikus sejtosztódás befejeződése után a spermatidákban termelődnek. Az mRNS lokalizációjából arra következtethetünk, hogy a *PpD6* az egyike lehet a *D. melanogaster* kevés posztmeotikusan átíródó génjeinek. Az RNS *in situ* képek a testisz-specifikus foszfatáz transzkriptumok különböző térbeli elhelyezkedését mutatják, ami feltehetőleg az expresszió időbeli elkülönülésével is társul.

A testisz-specifikusan expresszálódó *PpY-55A* és a *PpN-58A* funkciójának meghatározására a két génre nézve RNS interferenciával csendesített *D. melanogaster* törzseket hoztunk létre. A módszer működését kísérletesen igazoltuk, azonban a gének alacsonyabb szintű expressziója nem okozott hím-sterilitást vagy más egyéb észlelhető fenotípusbeli változást az egyedekben. A fenotípusbeli változás hiánya egyrészt azzal magyarázható, hogy a géncsendesítés nem szünteti meg teljesen a gén kifejeződését és a megmaradt géntermék is elegendő lehet a vad típus fenntartásához. Másrészt pedig a hasonló szerkezettel rendelkező új típusú PPP gének átfedő funkciókkal rendelkezhetnek, amelyek így képesek egymás hiányát ellensúlyozni. Továbbá fontos megemlítenem, hogy a használt pWIZ vektor nem alkalmas nőstény csírvonalbeli kifejeztetésre (Rørth, 1998), erre a célra a P-transzpozáz promóter és a K10 3' UTR szekvenciákkal rendelkező pUASP vektort ajánlották (Zhu és Stein, 2004). Ez alapján feltehető, hogy a vektor a hím csírvonalban sem működik megfelelően.

A Flybase adatbázisból hozzáférhető *D. melanogaster* gyűjteményekben több inszerciós mutáns is található a *PpN58A*, *PpD5*, *PpD6* és *CG1597* génekre nézve, amelyek a gének kódoló régiójában és annak közelében helyezkednek el. Az említett egyedek

életképesek, a fenotípusukat eddig még nem írták le. A gének funkciójának feltárása érdekében ezeket az egyedeket közvetlenül illetve a P-elem kiugratásával vizsgálni lehetne. Viszont a munkaigényes mutagenézis eredménye kétséges lenne, mert a gének említett átfedő funkciói miatt nem biztos, hogy tapasztalnánk fenotípusbeli változást.

Összességében elmondható, hogy a *D. melanogaster* tesztisz-specifikus foszfatázok élettani szerepe mindeztáig ismeretlen, habár az elhelyezkedésük, az átíródásuk időzítése és a hím-specifikus expressziójuk a szaporodásbeli szerepükre utal.

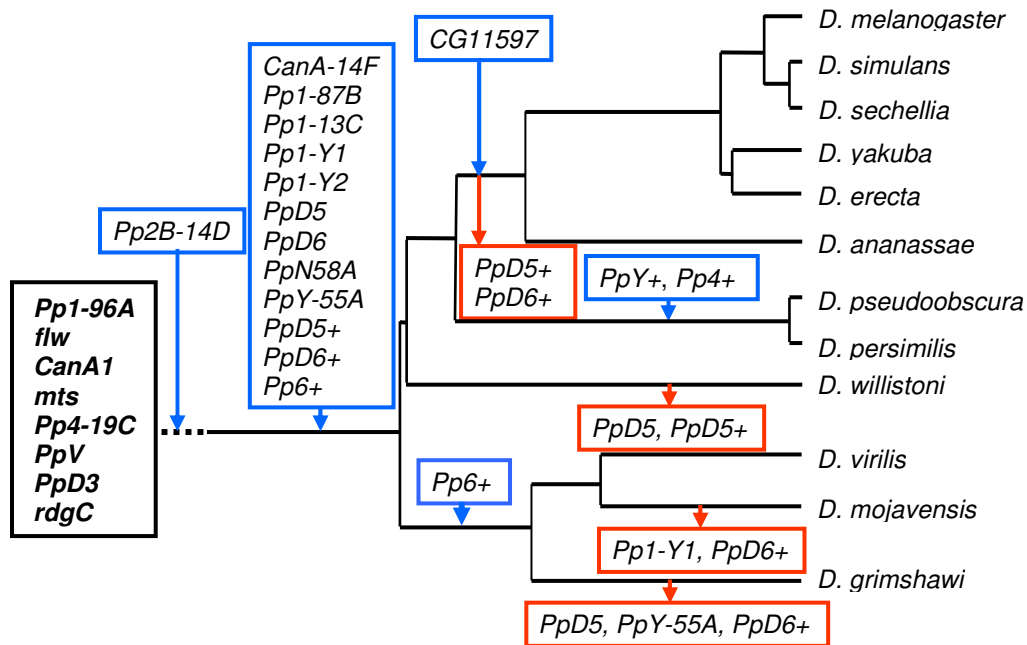
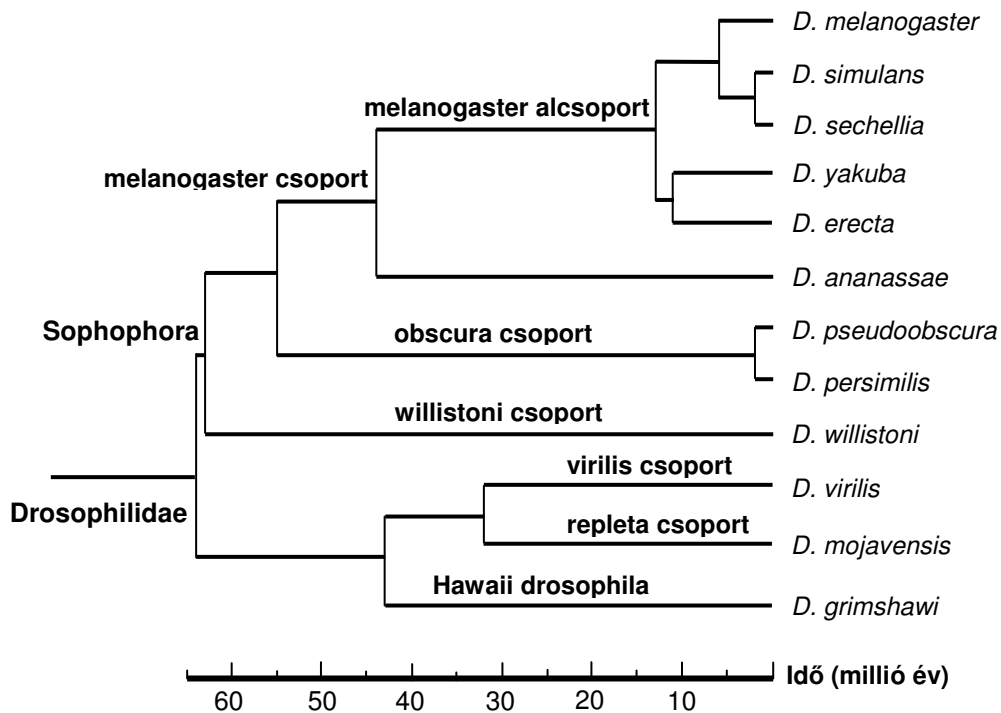
Miután a gének funkciójának további vizsgálata a gének említett átfedő funkciói miatt nem volt ígéretes, a továbbiakban a PPP gének eddig még kevésbé jellemzett evolúcióját próbáltuk meg feltárni.

8.2 A *Drosophilidae* család foszfoprotein foszfatázai

A *Drosophila* PPP gének eredetének elemzése során kiderült, hogy létezik egy nem több mint 8 enzimből álló alapkészlet, ami minden rovarban megtalálható (8. táblázat). Kettő közülük PPP1 izoformák, a többi gén pedig egy-egy PPP típust képvisel, amely rendelkezik humán ortológgal (PPP2-7). A két PPP1 jelenléte nem rendkívüli, mivel az állatokban legalább két PPP1 izoforma található. Ezek egyike az izomfunkciókra specializált β/δ , a másik pedig az α izoforma, ami a sejtciklus szabályozásában vesz részt. A 8 alapgénből retrotranszpozíciók és az azt követő egymás utáni duplikációk által bővült ki a *Drosophilidae* PPP enzimesalád (9. táblázat).

8.2.1 A klasszikus PPP enzimek duplikációja létrehozta a funkcionáló PPP retrogénnek első generációját a *Drosophilidae* család fajaiban

A fent említett PPP készlet először a klasszikus calcineurin és az 1-es típusú foszfatázok duplikációjával bővült ki (9. táblázat; 27., 28. ábra). Az első retrotranszpozíció a *Diptera* rendben (a *Culex pipiens*, *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae*) történt és létrehozta a *Pp2B-14D* gént, ami később a *Drosophilidae* családban duplikálódott (27., 28. ábra).



27. ábra. A PPP gének keletkezése és elvesztése a Drosophilidae családban

Az ábra felső részén a 12 *Drosophila* faj evolúciója látható, amit a Tamura és mtsai (2004), Koerich és mtsai (2008) által meghatározott mutációs óra alapján szerkesztettük meg. A fő alfajokat, csoportokat és alcsoportokat megjelöltük.

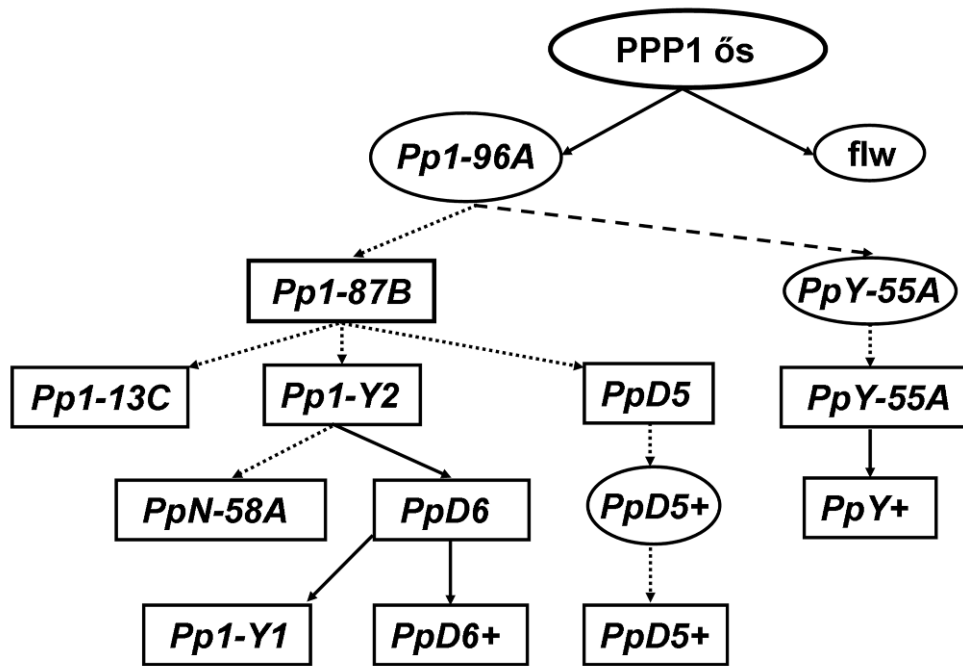
Az ábra alsó részén a PPP gének evolúciója látható. A rovarok alap PPP készlete fekete keretézéssel van ellátva. Az újonnan keletkezett géneket késsel, az elvesztett géneket pedig pirossal kereteltük be. A szaggatott vonal azt jelöli, hogy a Pp2B-14D gén a Diptera-ban keletkezett.

Betrán és munkatársai (2002) írták le, hogy *D. melanogaster*-ben a *CanA-14F* retrotranszpozícióval keletkezett a *CanA1* génből. Egy későbbi publikációból pedig az derül ki, hogy *Pp2B-14D* szintén retrogén és a *CanA1* génből származik (Bai és mtsai, 2007). Az adatbázis alapos átvizsgálása (<http://flybase.org/>) feltárta, hogy a *Pp2B-14D* az eredeti megjelöléssel ellentétben a 14E1-14E3 kromoszómális régióban van. Mivel a *CanA-14F* a 14E3-14F1 régióban található, így a két gén közeli szomszédságban található az X kromoszómán (4. ábra). Tehát a javított kromoszómális lokalizáció azt sugallja, a gének lokális génduplikációval egymásból származhatnak. Mivel a *Pp2B-14D* először a *Diptera* rendben jelent meg, a *CanA-14F* pedig csak a *Drosophilidae* (27. ábra) családban található, így feltételezhetően az ősből *Pp2B-14D* tandem duplikációjából származott a *CanA-14F* gén. Ezt igazolja az a tény, hogy a *D. melanogaster* *Pp2B-14D* fehérje a túlsúlyban lévő kalcineurin izoforma (Brown és mtsai, 1994), aminek fontos funkciói vannak (Sullivan és mtsai, 2002; Takeo és mtsai, 2006). A *CanA-14F* foszfatáz P-elem inszerciós mutánsának viszont nincs nyilvánvaló fenotípusa (lásd még 4. 2 fejezet). Érdekes módon a *Drosophila* fajok megtartották az ősi intront tartalmazó *CanA1* gént, valószínűleg azért, mert a gén terméke új funkciót szerzett a vele született immunválaszban (Dijkers és mtsai, 2007). Ezzel ellentétben a domináns *Pp2B-14D* retrogén átvette a fontos kalcineurin funkciókat, és helyettesítette a szülői *CanA1* gént a *Diptera* rend más tagjaiban.

A második retrotranszpozíció alapú duplikációs esemény a *Drosophila* fajok őseiben játszódott le, amelyben a *Pp1-96A* génből keletkezett a *Pp1-87B* (Bai és mtsai, 2007). A nagyfokú szekvencia hasonlóság miatt nehéz eldönteni, hogy *Pp1-13C* közvetlenül a *Pp1-96A*, génből vagy közvetve a *Pp1-87B*-ből származott (16B. ábra).

8.2.2 A retrotranszpozíciók és a tandem duplikációk második hulláma új *Drosophila*-specifikus PPP retrogéneket hozott létre

Elméletünk szerint a *Pp1-96A* az új 1-es típusú foszfatáz retrogénnek nagy családjának az őse (9. táblázat, 14., 28. ábra). Amint azt már korábban említettem, a *Pp1-96A* duplikációja hozta létre a *Pp1-87B* gént, amely az első tökéletesen funkcionáló retrogén az alcsaládban. Tehát mind a *Pp1-96A* mind a *Pp1-87B* lehetséges kiindulópontja volt a további retrotranszpozícióknak, amelyek olyan foszfatázokat eredményeztek, mint a klasszikus *Pp1-13C* vagy az új típusú *Pp1-Y2* és *PpD5* gének (16A., 16B. ábra, 28. ábra).



28. ábra. Az 1-es típusú PPP gének evolúciója rovarokban

Az ábrán a PPP1 gének leszármazási viszonyai láthatók. Az introntartalmú géneket körrel, az intronmenteseket téglalappal vettük körbe. Az egyenes vonalak rekombinációt, a szaggatottak pedig retrotranszpozíciót jelölnek.

A multidimenziális ábrázolásmód alapján a *PpD5+* a *PpD5* génből keletkezett, míg a *Pp1-Y2* duplikációja a *PpD6* és *PpN58A* géneket hozta létre. A *PpD6* duplikációja pedig a *Pp1-Y1* és *PpD6+* géneket eredményezte (16A., 28. ábra). Két kivételtől eltekintve (9. táblázat) a *PpD5* és *PpD6* retrogének jelen vannak az összes vizsgált *Drosophila* fajban, így valószínűleg a jobban ismert PPP retrogénekkal együtt jelentek meg több mint 63 millió évvel ezelőtt, amikor a *Drosophilidae* család tagjai elváltak más rovarfajoktól (27. ábra). Az új *PpD5+* és *PpD6+* gén pedig csak az ősi *Drosophila* alfajokban vannak jelen, így a megjelenésük 44-63 millió évvel ezelőtre tehető (27. ábra).

A *Pp1-Y2*, *PpD6*, *Pp1-Y1* és *PpD6+* gének közötti közeli kapcsolatot az egymás melletti kromoszómális elhelyezkedésük is megerősíti (24. ábra). A *Pp1-96A* gén a szerkezete alapján annak a részlegesen retrotranszpozicionált *PpY-55A* ősének is tekinthető, ami megtartotta a szülői gén egyik intronját (lásd még 8.2.5 fejezet). A 11 duplikációs esemény pontos ideje nem ismert, de valószínűleg a *Drosophilidae* család közös ősében történt több mint 63 millió évvel ezelőtt (27. ábra).

További retrotranszpozíciós események még jobban kibővítették a PPP család tagjainak számát a *Drosophilidae* tanulmányozott alfajaiban vagy csoportjaiban. 44-63 millió

évvel ezelőtt az új *Pp6+* változat az ősi ortológ *PpV/Pp6* génből keletkezett a *Drosophila* alfajokban. Ez az új retrogén sikertelennek bizonyult, mivel eltűnt a *Sophophora* tagjaiból (27. ábra). A sokkal specifikusabb PPP duplikációk az *obscura* csoportra jellemzőek. Körülbelül 62 millió évvel ezelőtt a *Pp4* retrotranszpozíciója létrehozta a *Pp4+* gént az *obscura* csoportban. Ugyanebben az időben a *PpY-55A* gén duplikációjából létrejött a *PpY+*. Ez idő alatt *PpY-55A* intront tartalmazó génje eltűnt és lecserélődött az intronmentes változattal. Végezetül 44-55 millió évvel ezelőtt történt az utolsó retrotranszpozíció a *melanogaster* csoportban, amely a *Pp4* génből létrehozta a szerkezete alapján 2-es típusúnak tekinthető (Morrison és mtsai, 2000) *CG11597*-et. Mivel csak a *melanogaster* csoport tagjaiban található meg (9. táblázat), így keletkezése körülbelül 56 millió évre tehető, amikor *melanogaster* és az *obscura* csoport elvált egymástól (27. ábra). A *Pp4+* különbözik a *CG11597*-től, így nem lehet a szülői génje. Így az ősi *Pp4-19C* gén ment keresztül két elkülönült retrotranszpozíción a *melanogaster* és *obscura* csoportokban, amely a *CG11597* és *Pp4+* géneket hozta létre (27. ábra). Eredményeink alapján (27. ábra) az ismétlődő retrotranszpozícióknak nagy jelentősége van a génkészlet kibővítésében a *Drosophilidae* családban (Bai és mtsai, 2007).

8.2.3 A működőképes PPP retrogének második generációja hím-specifikusan expresszálódik

A gének expresszióját a *Drosophila* fajok evolúciója során is megvizsgáltuk, amihez 4 egymástól távoli rokon fajt (*D. ananassae*, *D. pseudoobscura*, *D. willistoni*, *D. virilis*) választottunk ki. Megállapítottuk, hogy mind a *D. melanogaster*-ben is tanulmányozott *PpY-1*, *PpY-2*, *PpD5*, *PpD6*, *PpN58A*, *PpY-55A* mind az 5 új (*PpD5+*, *PpD6+*, *PpY+*, *Pp4+*, *Pp6+*) foszfatáz hím-specifikus transzkripciója konzerválódott a *Drosophilidae* család evolúciója során (10. táblázat; Függelék F4. ábra).

A *Pp1-Y1* és *Pp1-Y2* gén esete különösen érdekes, mivel az Y kromoszóma heterokromatikus régiójában található (Carvalho és mtsai, 2001). Az általános vélekedés az, hogy a konstitutív heterokromatin „genetikai temetőnek” tekinthető, habár már sok bizonyíték van arra, hogy meglepően nagyszámú gén fejeződik ki erről az erősen kondenzálódott területről (Dimitri és mtsai, 2009). Az eredményeink megerősítik a *Pp1-Y1* és *Pp1-Y2* gének szerkezetére, transzkripciójára és transzlokációjára vonatkozó irodalmi adatokat (Carvalho és mtsai, 2001; Koerich és mtsai, 2008). A két gén az autoszómális C Müller elemről az Y kromoszómára vándorolt (Koerich és mtsai, 2008), miközben transzkripció szabályozásuk

megmaradt még az új heterokromatikus környezetben is. Fontos kiemelni, hogy a *D. ananassae* Y kromoszómáján elhelyezkedő *PpD6* egy újabb funkcionáló, Y-hoz kapcsolt gén.

Az eredményeink összhangban vannak azzal a megfigyeléssel, hogy a *Drosophila* retrogénnek többsége előnyben részesíti a hímekben történő expressziót (Bai és mtsai, 2007), illetve, hogy az új hím-specifikus gének gyorsabban fejlődnek, mint a nőstény-specifikusak vagy a nem specializáltak (Zhang és mtsai, 2004; Parsch és mtsai, 2001; Musters és mtsai, 2006). Az 5 új hím-specifikus PPP gén közül 4 autoszómális lokalizációjú, csak a *PpY+* található az A Müller elemen, ami az X kromoszóma bal karjának felel meg *D. pseudobscura*-ban (9. táblázat). A szülői *Pp4-19C* és *PpV*, *Pp6* gének szintén az A elemen található az összes 12 *Drosophila* fajban. Tehát a retrogén másolatuk kilépett az X kromoszómáról, ami megerősítette azt az elméletet, miszerint a hím-specifikus retrogénnek hajlamosak elkerülni az X kromoszómát, de nemcsak *D. melanogaster*-ben (Betrán és mtsai, 2002), hanem az egész *Drosophila* nemzetségben is (Vibranovszki és mtsai, 2009).

Eredményeink megerősítik, hogy a legújabb PPP funkcionáló retrogénnek követik Vinckenbosch és munkatársai (2006) „out of testis” elméletét. Míg az idősebb (klasszikus vagy első generációs) PPP retrogénnek különböző expressziós mintázattal és specializált funkciókkal rendelkeznek, addig a 11 fiatalabb (új típusú vagy második generációs) PPP retrogén hím-specifikus maradt. Egyedüli kivételt képez az egyik legfiatalabb PPP gén, a *CG11597*, ami nem specializált és különböző fejlődési stádiumokban, valamint mindkét nemből is átíródik.

Hím-specifikus expressziójuktól eltekintve nem rendelkezünk információval a *D. melanogaster*-ben tanulmányozott gének és az öt új PPP tag funkcióját illetően. Hasonló szerkezetük és expressziójuk megnehezíti a tanulmányozásukat klasszikus vagy molekuláris genetikai módszerekkel. Előbbi felvetésünket igazolja az a tény, hogy a *D. melanogaster* *PpY-55A* és *PpN58A* génjeinek csendesítése nem okozott fenotípusbeli változást (8.1 fejezet). Tehát a foszfatázok ezen csoportja átfedő funkciókkal rendelkezhet, ami lehetővé teszi a kieső gének hiányának ellensúlyozását. Az is lehetséges, hogy a redundáns foszfatázok nagy feleslege biztosítékként szolgál egy fontos hím-specifikus funkció elvesztése ellen. Mivel a katalitikus zsebük konzervált, így több esélyük van új funkciók elnyerésére a kölcsönható fehérjék és szabályozásuk megváltoztatása révén. Azonban amíg új kölcsönható partner után kutatnak, könnyen a természetes szelekció áldozatává válhatnak, ami már néhány új PPP génnel meg is történt a *Drosophilidae* család egyes csoportjaiban (9. táblázat; 27. ábra). A rovar PPP konzervált enzimek (8 db) és a klasszikus foszfatáz izoenzimek (4 db) biztosítják az alapvető kontroll folyamatok egyenletes működését, míg az aktívan változó új PPP

retrogének készlete (6-10 gén) jelentős evolúciós tartalékot képez az új szabályozó mechanizmusokhoz. Az utóbbiak többsége a hímek heréjében fejeződik ki, ami menedéket és tesztelési lehetőséget teremt a gyorsan fejlődő új géneknek (Vinckenbosch és mtsai, 2006). Az elmélet szerint az előnyös gén változatok a hímek „feljavított” szaporodóképességén keresztül szelektálódhatnak ki.

8.2.4 Az új PPP retrogének átrendeződnek és dinamikusan mozognak a *Drosophila* genomokban

A duplikációk mellett a retrotranszpozícióknak van a legnagyobb szerepe az új gének képződésében (Zhou és mtsai, 2008). A PPP gének átrendeződésének tanulmányozása közben példákat találtunk olyan hagyományosnak nem mondható retrotranszpozíciós eseményekre (Bai és mtsai, 2007), mint a részleges retrotranszpozíció (Pp1-96A, 8.2.2 fejezet), kimérés retrogénképződés (PpD5+, 8.2.4. fejezet), retrotranszpozíciót követő áthelyeződés (PpY-55A, 7.2.6 fejezet) vagy a retrotranszpozíciót követő tandem duplikáció (Pp1-Y2, 8.2.5 fejezet).

A *Pp1-96A* szülői génből a *PpY-55A* ősi formájában, jól konzervált pozícióban egy kisméretű intron maradt fenn a részlegesen processzált mRNS reverz transzkripciójának következményeként. Hasonló részleges retrotranszpozíciót írtak le 6 másik gén esetében Bai és munkatársai (2007) is. Az intron elvesztése körülbelül 62 millió éve történt, amikor az *obscura* és a *melanogaster* csoportok elváltak a *willistoni* csoporttól (27. ábra). Az intron két különböző mechanizmus által veszett el *obscura* és *melanogaster* csoportokból. *D. pseudoobscura* és *D. persimilis* fajokban a retrotranszpozíció az A Müller elemre helyezte át az intronmentes *PpY-55A* gént, ami ezután duplikálódott és létrehozta az intronmentes *PpY+* gént. Ezalatt az intront tartalmazó változat degradálódott. Nyilvánvalóan az A elemén lévő intronmentes gének átvették a régebbi gének funkcióit. A *melanogaster* csoportban az intron a teljesen processzált cDNS és a rövid intront tartalmazó szülő gén rekombinációjával veszett el (Roy és Irimia, 2009).

A *PpD5+* gén evolúciójának története még bonyolultabb. A gén egy egyedi rövid intront tartalmaz az *obscura* csoport tagjaiban. Lehetséges, hogy az új intron a beépülési hely határoló régiójából származik, így Bai és munkatársai (2007) meghatározása szerint a *PpD5+* a kevés kimérés retrogének egyike lehet. Később az összes ősi *Drosophila* alfajban az intronmentes retrogén ugyanabban a pozícióban helyettesítette az intront tartalmazó változatot. A másik lehetőség, hogy *PpD5+* intronmentes másolata képződött először és egy

kisméretű intront szerzett az obscura csoportban (Roy és Irimia, 2009). A *PpD5+* gén eltűnt a melanogaster és willistoni csoportok tagjaiból (9. táblázat).

8.2.5 A *Pp1-Y1*, *PpD6+*, *PpD6*, *Pp1-Y2* géncsoport átrendeződése

A *PpD5* mozgásai, valamint az ősi *Pp1-Y1*, *PpD6+*, *PpD6*, *Pp1-Y2* géncsoport átrendeződései és végleges szétesése jó példa a PPP gének szerkezetét nem érintő áthelyeződésekre. A géncsoport tandem duplikációval keletkezett *D. virilis* fajban. Feltehetőleg a *Pp1-Y2* gén lehet a kiindulási alak, mivel ez áll a legközelebbi kapcsolatban a szülői *Pp1-96A* génnel (16B. ábra). A géncsoport evolúciója során a redundáns alakok egyes fajokban eltűntek, a willistoni és obscura csoportokban pedig egy inverzió következtében a *PpD6+*, *Pp1-Y1*, *PpD6*, *Pp1-Y2* új génsorrend alakult ki. A géncsoport a melanogaster csoportban felbomlott. Az ennek következtében fellépő génmozgások egyik fontos része a PPP gének transzlokációja a heterokromatikus Y kromoszómára (Koerich és mtsai, 2008). Érdekes megfigyelni, hogy a négytagú csoport 3 PPP génje átmeneti vagy állandó lokalizációt szerzett az Y kromoszómán. Megfigyeltük, hogy ezen retrogénnek heterokromatikus környezetbe való ugrása a G-C tartalmuk csökkenésével jár az ORF-ükben. A *PpD6* bázisösszetételének változása különösen érdekes, mivel a *D. pseudoobscura*, *D. willistoni* és *D. virilis* fajok C elemén tartózkodó gén az Y kromoszómára vándorolt *D. ananassae*-ban, majd pedig a B elemre a melanogaster csoportban. Diaz-Castillo és Golic (2007) megfigyelésével egyetértésben a mi eredményeink is azt mutatják, hogy a PPP gének G-C tartalma alkalmazkodott a változó genomi környezethez. A kodon használat módosítása (főként a harmadik kodon pozícióban) csökkenti a kódoló régiók G-C tartalmát, és lehetővé teszi a foszfatáz gének expresszióját még a heterokromatikus Y kromoszómán is.

Következtetések

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

9. ÖSSZEFOGLALÁS

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

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

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

10. SUMMARY

Protein phosphorylation and dephosphorylation are common gears of regulation in all eukaryotic organisms. The group of the so-called phosphoprotein phosphatases (PPP) removes the phosphate from the Ser and Thr residues of proteins. The PPP family comprises classical members that were identified by biochemical assays and novel enzymes that were discovered by molecular biology or genetic approaches.

In the genome of *Drosophila melanogaster* I have identified 19 phosphoprotein phosphatase (PPP) catalytic subunit coding genes. Seven of the novel members of the gene family turned out to be *Drosophila*-specific. *CG11597* is a recently evolved gene that is expressed during all stages of morphogenesis in *D. melanogaster*. In contrast, the transcription of *PpD5*, *PpD6*, *Pp1-Y1*, and *Pp1-Y2* genes is restricted to the pupa and imago developmental stages and to the testis of the males, just as that of the previously characterized *PpY-55A* and *PpN58A*. The mRNA of *PpD5*, *Pp1-Y1*, and *PpY-55A* were detected in the developing cysts by in situ hybridization, in contrast with the *PpD6* transcript that was found in the distal ends of elongating spermatids. The latter localization suggests that *PpD6* is one of the few post-meiotically transcribed genes in *D. melanogaster*.

Based on the genome sequences of 12 *Drosophila* species we traced the evolution of the PPP catalytic subunits. We noted a substantial expansion of the gene family. We concluded that the 18-22 PPP genes of *Drosophilidae* were generated from a core set of 8 indispensable phosphatases that are present in most of the insects. Retropositions followed by local gene duplications extended this phosphatase repertoire, and sporadic gene losses contributed to the species specific variations in the PPP complement. During the course of these studies we identified 5 up till now uncharacterized phosphatase retrogenes: *PpY+*, *PpD5+*, *PpD6+*, *Pp4+*, and *Pp6+* which are found only in some ancient *Drosophila*. We demonstrated that all of these new PPP genes exhibit a distinct male specific expression. Our data support the “out of testis” hypothesis suggesting that new functional retrogenes are preferentially transcribed in the male gonads. We have also proved that the sequence of novel, male-specific phosphatase changed more rapidly than that of the classical phosphatases. Our results support the “faster male” hypothesis. In addition to the changes in gene numbers, the intron-exon structure and the chromosomal localization of several PPP retrogenes was also altered during evolution. The G-C content of the coding regions decreased when a gene moved into the heterochromatic region of chromosome Y. In conclusion, the PPP enzyme family exemplifies the various types of dynamic genome rearrangements that accompany the molecular evolution of the novel retrogenes in *Drosophilidae*.

11. HIVATKOZÁSOK

Almo SC, Bonanno JB, Sauder JM, Emtage S, Dilorenzo TP, Malashkevich V, Wasserman SR, Swaminathan S, Eswaramoorthy S, Agarwal R, Kumaran D, Madegowda M, Ragumani S, Patskovsky Y, Alvarado J, Ramagopal UA, Faber-Barata J, Chance MR, Sali A, Fiser A, Zhang ZY, Lawrence DS, Burley SK (2007) Structural genomics of protein phosphatases. *J Struct Funct Genomics*. 8: 121-140.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 215: 403-10.

Andrews J, Bouffard GG, Cheadle C, Lü J, Becker KG, Oliver B. (2000) Gene discovery using computational and microarray analysis of transcription in the *Drosophila melanogaster* testis. *Genome Res*. 12: 2030-43.

Arbeitman MN, Furlong EM, Imam F, Johnson E, Null BH, Baker BS, Krasnow MA, Scott MP, Davis RW, White KP (2002) Gene expression during the life cycle of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 297: 2270-2275.

Armstrong CG, Mann DJ, Berndt N, Cohen PTW (1995) *Drosophila* PPY, a novel male specific protein serine/threonine phosphatase localized in somatic cells of the testis. *J Cell Sci*. 108: 3367-3375.

Armstrong CG, Dombradi V, Mann DJ, Cohen PTW (1998) Cloning of a novel testis specific protein serine/threonine phosphatase, PPN58A, from *Drosophila melanogaster*. *Biochim Biophys Acta*. 1399: 234-238.

Arndt KT, Styles CA, Fink GR(1989) A suppressor of a HIS4 transcriptional defect encodes a protein with homology to the catalytic subunit of protein phosphatases. *Cell* 56: 527-537.

Asztalos Z, von Wegerer J, Wustmann G, Dombrádi V, Gausz J et al. (1993) Protein phosphatase 1-deficient mutant *Drosophila* is affected in habituation and associative learning. *J Neurosci*. 13: 924-930.

Axton JM, Dombrádi V, Cohen PT, Glover DM (1990) One of the protein phosphatase 1 isoenzymes in *Drosophila* is essential for mitosis. *Cell*. 63: 33-46.

Bai Y, Casola C, Feschotte C, Betrán E (2007) Comparative genomics reveals a constant rate of origination and convergent acquisition of functional retrogenes in *Drosophila*. *Genome Biol*. 8: R11.

Baksa K, Morawietz H, Dombradi V, Axton M, Taubert H et al. (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.

Balcells L, Calero F, Gomez N, Ramos J, Arino J (1999) The *Schizosaccharomyces pombe* Pzh1 protein phosphatase regulates Na⁺ ion influx in a Trk1-independent fashion. *Eur J Biochem*. 260: 31-37.

- Barford D, Hu SH, Johnson LN (1991) Structural mechanism for glycogen phosphorylase control by phosphorylation and AMP. *J Mol Biol.* **218**: 233-260.
- Barford D, Jia Z, Tonks NK (1995) Protein tyrosine phosphatases take off. *Nature Struct Biol.* **2**: 1043-1053.
- Barford D, Das AK, Egloff MP (1998) The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* **27**: 133-164.
- Barton GJ, Cohen PT, Barford D (1994) Conservation analysis and structure prediction of the protein serine/threonine phosphatases. Sequence similarity with diadenosine tetraphosphatase from *Escherichia coli* suggests homology to the protein phosphatases. *Eur J Biochem.* **220**: 225-237.
- Bastians H, Ponstingl H (1996) The novel human protein serine/threonine phosphatase 6 is a functional homologue of budding yeast Sit4p and fission yeast ppe1, which are involved in cell cycle regulation. *J. Cell Sci.* **109**: 2865-2874.
- Beckstead RB, Lam G, Thummel CS (2005) The genomic response to 20-hydroxyecdysone at the onset of *Drosophila* metamorphosis. *Genome Biol.* **6**: R99.
- Berreau C, Benson E, Gudmannsdottir E, Newton F, White-Cooper H (2008) Post-meiotic transcription in *Drosophila* testis. *Development.* **135**: 1897-1902.
- Betrán E, Thornton K, Long M (2002) Retroposed new genes out of the X in *Drosophila*. *Genome Res.* **12**, 1854-1859.
- Brewis ND, Street AJ, Prescott AR, Cohen PT (1993) PPX, a novel protein serine/threonine phosphatase localized to centrosomes. *EMBO J.* **12** (3): 987-996.
- Bronstein AM, Bronstein MM, Kimmel R (2006) Generalized multidimensional scaling: a framework for isometry-invariant partial surface matching, *Proc Nat Acad Sci. USA* **103**: 1168-1172.
- Brown L, Chen MX, Cohen PT (1994) Identification of a cDNA encoding a *Drosophila* calcium/calmodulin regulated protein phosphatase, which has its most abundant expression in the early embryo. *FEBS Lett.* **339**: 124-128.
- Brown L, Borthwick EB, Cohen PT (2000) *Drosophila* protein phosphatase 5 is encoded by a single gene that is most highly expressed during embryonic development. *Biochim Biophys Acta.* **1492**(2-3): 470-476.
- Camp LA, Verkruyse LA, Afendis SK, Slaughter CA, Hofmann SL (1994) Molecular cloning and expression of palmitoyl-protein thioesterase. *J. Biol. Chem.* **269**: 23212-23219.
- Casamayor A, Perez-Callejon E, Pujol G, Arino J, Ferrer A (1994) Molecular characterization of a fourth isoform of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **26**:523-528.

- Casso DJ, Liu S, Iwaki DD, Ogden SK, Kornberg TB (2008) A screen for modifiers of hedgehog signaling in *Drosophila melanogaster* identifies *swm* and *mts*. *Genetics*. 178: 1399-1413.
- Carvalho AB, Dobo BA, Vibranovski MD, Clark AG (2001) Identification of five new genes on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13225-13230.
- Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ et al. (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* 3: 3497-500.
- Chen MX, Chen, YH, Cohen PT (1992) Polymerase chain reactions using *Saccharomyces*, *Drosophila* and human DNA predict a large family of protein serine/threonine phosphatases. *FEBS Lett.* 306: 54-58.
- Chen MX, Chen YH, Cohen PT (1993) PPQ, a novel protein phosphatase containing a Ser + Asn-rich amino-terminal domain, is involved in the regulation of protein synthesis. *Eur J Biochem.* 218: 689-699.
- Chen MX, McPartlin AE, Brown L, Chen YH, Barker HM, Cohen, PTW (1994) A novel human protein serine/threonine phosphatase, which possesses four tetratricopeptide repeat motifs and localizes to the nucleus. *EMBO J.* 13: 4278-4290.
- Chen F, Archambault V, Kar A, Lio P, D'Avino PP et al. (2007) Multiple protein phosphatases are required for mitosis in *Drosophila*. *Curr Biol.* 17: 293-303.
- Chintapalli VR, Wang J, Dow JA (2007) Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. *Nat Genet.* 39: 715-720.
- Clark AG, Eisen MB, Smith DR, Bergman CM, Oliver B, et al. (2007) Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature* 450: 203-218.
- Cohen PT, Brewis ND, Hughes V, Mann DJ (1990) Protein serine/threonine phosphatases; an expanding family. *FEBS Lett.* 268: 355-359.
- Cohen PT (1997) Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life *Trends Biochem Sci.* 22: 245-51.
- Cohen PT (2004) Overview of protein serine/threonine phosphatases. In: Arino J, Alexander DR, editors. *Topics in Current Genetics*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. pp.1-20.
- Cyert MS, Kunisawa R, Kaim D, Thorner J (1991) Yeast has homologs (CNA1 and CNA2 gene products) of mammalian calcineurin, a calmodulin-regulated phosphoprotein phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:7376-7380.
- da Cruz e Silva OB, da Cruz e Silva EF, Cohen PT (1988) Identification of a novel protein phosphatase catalytic subunit by cDNA cloning. *FEBS Lett.* 242: 106-110.
- Davidson FF, Steller H (1998) Blocking apoptosis prevents blindness in *Drosophila* retinal degeneration mutants. *Nature.* 391(6667): 587-591.

- Dean AM, Koshland DE Jr (1990) Electrostatic and steric contribution to regulation at the active site of isocitrate dehydrogenase. *Science*. 249: 1044-1046.
- Dimitri P, Caizzi R, Giordano E, Accardo MC, Lattanzi G (2009) Constitutive heterochromatin: a surprising variety of expressed sequences. *Chromosoma*. 118: 419-435.
- Dombrádi V, Axton JM, Glover DM, Cohen PT (1989) Cloning and chromosomal localization of *Drosophila* cDNA encoding the catalytic subunit of protein phosphatase 1 alpha. High conservation between mammalian and insect sequences. *Eur J Biochem*. 183(3): 603-610.
- Dombradi V, Axton JM, Brewis ND, E.F, da Cruz e Silva EF, Alphey L, Cohen PT (1990) *Drosophila* contains three genes that encode distinct isoforms of protein phosphatase 1. *Europ. J. Biochem*. 194: 739-745.
- Dombradi V, Cohen PT (1992) Protein phosphorylation is involved in the regulation of chromatin condensation during interphase. *FEBS Lett*. 312: 21-26.
- Dombrádi V, Mann DJ, Saunders RD, Cohen PT (1993) Cloning of the fourth functional gene for protein phosphatase 1 in *Drosophila melanogaster* from its chromosomal location. *Eur J Biochem*. 212: 177-183.
- Diaz-Castillo C, Golic KG (2007) Evolution of Gene Sequence in Response to Chromosomal Location. *Genetics*. 177: 359-374.
- Dijkers PF, O'Farrell PH (2007) *Drosophila* calcineurin promotes induction of innate immune responses. *Curr Biol*. 17: 2087-2093.
- Farnum MA, Xu H, Agrafiotis DK (2003) Exploring the nonlinear geometry of protein homology. *Protein Sci*. 8: 1604-12.
- Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol*. 17: 368-76.
- Gloor GB, Engels WR (1992) Single-fly DNA preps for PCR. *Drosophila Inform Serv*. 71:148-149.
- Guerini D, Montell C, Klee CB (1992) Molecular cloning and characterization of the genes encoding the two subunits of *Drosophila melanogaster* calcineurin. *J Biol Chem*. 267: 22542-22549.
- Hahn MW, Han MV, Han S-G (2007) Gene family evolution across 12 *Drosophila* genomes. *PLoS Genet* 3: e197.
- Hall, TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*. 41: 95-98.
- Helps NR, Brewis ND, Lineruth K, Davis T, Kaiser K et al. (1998) Protein phosphatase 4 is an essential enzyme required for organization of microtubules at centrosomes in *Drosophila* embryos. *J Cell Sci*. 111: 1331-1340.

- Hinds TD, Jr. Sánchez ER (2008) Protein Phosphatase 5. *Int J Biochem Cell Biol.* 40: 2358-2362.
- Hoffmann R, Jung S, Ehrmann M, Hofer HW (1994) The *Saccharomyces cerevisiae* gene PPH3 encodes a protein phosphatase with properties different from PPX, PP1 and PP2A. *Yeast.* 10: 567-578
- Hong CS, Ganetzky B (1996) Molecular characterization of neurally expressing genes in the para sodium channel gene cluster of *Drosophila*. *Genetics.* 142: 879-892.
- Hunter T (1995) Protein kinases and phosphatases: The Yin and Yang of protein phosphorylation and signalling. *Cell.* 80: 225-236.
- Ingebritsen TS, Cohen PTW (1983) Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science.* 221: 331-338.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- Jeong JY, Johns J, Sinclair C, Park JM, Rossie S (2003) Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* protein Ser/Thr phosphatase T1 and comparison to its mammalian homolog PP5. *BMC Cell Biology* 4: 1-13.
- Jia H, Liu Y, Yan W, Jia J (2009) PP4 and PP2A regulate Hedgehog signaling by controlling Smo and Ci phosphorylation. *Development.* 136: 307-316.
- Johnson DA, Lewis RJ (2001) Structural basis for control by phosphorylation. *Chem Rev.* 101: 2209-2242.
- Kennelly PJ (2001) Protein kinases and protein phosphatases in prokaryotes: a genomic perspective. *FEMS Microbiol Lett.* 206: 1-8.
- Kiger A, Baum B, Jones S, Jones M, Coulson A et al. (2003) A functional genomic analysis of cell morphology using RNA interference. *J Biol.* 2: 27.
- Kirchner J, Gross S, Bennett D, Alpey L (2007) Essential, overlapping and redundant roles of the *Drosophila* protein phosphatase 1 alpha and 1 beta genes. *Genetics.* 176: 273-281.
- Koerich LB, Wang X, Clark AG, Carvalho AB (2008) Low conservation of gene content in the *Drosophila* Y chromosome. *Nature.* 456: 949-951.
- Kókai E, Szuperák M, Alpey L, Gausz J, Ádám G, Dombrádi V (2006) Germ line specific expression of a protein phosphatase Y interacting protein (PPYR1) in *Drosophila*. *Gene Expr. Patterns.* 6: 724-729.
- Kumar S, Dudley J, Nei M, Tamura K (2008) MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform.* 9: 299-306.
- Lee YS, Carthew RW (2003) Making a better RNAi vector for *Drosophila*: use of intron spacers. *Methods.* 30: 322-329.

- Mann DJ, Dombrádi V, Cohen PT (1993) *Drosophila* protein phosphatase V functionally complements a SIT4 mutant in *Saccharomyces cerevisiae* and its amino-terminal region can confer this complementation to a heterologous phosphatase catalytic domain. *EMBO J.* 12: 4833-4842.
- Mayer-Jaekel RE, Baumgartner S, Bilbe G, Ohkura H, Glover DM, Hemmings BA (1992) Molecular cloning and developmental expression of the catalytic and 65-kDa regulatory subunits of protein phosphatase 2A in *Drosophila*. *Molec Biol Cell.* 3: 287-298.
- Miskei M, Karányi Z, Pócsi I. (2009) Annotation of stress-response proteins in the aspergilli. *Fungal Genet Biol.* 46 Suppl 1: S105-20.
- Lee SJ, Montell C (2001) Regulation of the Rhodopsin Protein Phosphatase, RDGC, through Interaction with Calmodulin. *Neuron.* 32(6): 1097-1106.
- Moorhead GB, De Wever V, Templeton G, Kerk D (2009) Evolution of protein phosphatases in plants and animals. *Biochem J.* 417: 401-409.
- Morrison DK, Murakami MS, Cleghon V (2000) Protein kinases and phosphatases in the *Drosophila* genome. *J Cell Biol.* 150: 15057-15062.
- Musters H, Huntly MA, Singh RS (2006) A genomic comparison of faster-sex, faster-X, and faster-male evolution between *Drosophila melanogaster* and *Drosophila pseudoobscura*. *Mol Biol Evol.* 62: 693-700.
- Nei M, Kumar S (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, 660 New York. pp. 333.
- Orgad S, Brewis ND, Alphey L, Axton JM, Dudai Y, Cohen PT (1990) The structure of protein phosphatase 2A is as highly conserved as that of protein phosphatase 1. *FEBS Lett.* 275: 44-48.
- Parsch J, Meiklejohn CM, Hauschteck-Jungen E, Hunziker P, Hartl DL (2001) Molecular evolution of the ocnus and janus genes in the *Drosophila melanogaster* species subgroup. *Mol Biol Evol.* 18: 801-811.
- Pilot F, Philippe JM, Lemmers C, Chauvin JP, Lecuit T (2006) Developmental control of nuclear morphogenesis and anchoring by charleston, identified in a functional genomic screen of *Drosophila* cellularisation. *Development.* 133: 711-23.
- Posas F, Casamayor A, Ariño J (1993) The PPZ protein phosphatases are involved in the maintenance of osmotic stability of yeast cells. *FEBS Lett* 318: 282-286.
- Pujol G, Baskin TI, Casamayor A, Cortadellas N, Ferrer A, Ariño J (2000) The *Arabidopsis thaliana* PPX/PP4 phosphatases: molecular cloning and structural organization of the genes and immunolocalization of the proteins to plastids. *Plant Mol Biol.* 44: 499-511.
- Raghavan S, Williams I, Aslam H, Thomas D, Szoor B et al. (2000) Protein phosphatase 1 is required for the maintenance of muscle attachments. *Curr Biol.* 10: 269-272.

- Ranz JM, Castillo-Davis CI, Meiklejohn CD, Hartl DL (2003) Sex dependent gene expression and evolution of the *Drosophila* transcriptome. *Science*. 300: 1742-1745.
- Rørth P (1998) Gal4 in the *Drosophila* female germline. *Mechanisms of Development* 78: 113-118.
- Roy SW, Irimia M (2009) Mystery of intron gain: new data and new models. *Trends Genet.* 25: 67-73.
- Salamov AA, Solovyev VV (2000) *Ab initio* gene finding in *Drosophila* genomic DNA. *Genome Res.* 10: 516-22.
- Schwarz R, Dayhoff M (1979) Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff M, editor, *Atlas of protein sequences*, National Biomedical Research Foundation. pp. 353-58.
- Sherman PM, Sun H, Macke JP, Williams J, Smallwood PM, Nathans J (1997) Identification and characterization of a conserved family of protein serine/threonine phosphatases homologous to *Drosophila* retinal degeneration C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 11639-44.
- Shimanuki M, Kinoshita N, Ohkura H, Yoshida T, Toda T, Yanagida M (1993) Isolation and characterization of the fission yeast protein phosphatase gene *ppel* involved in cell shape control and mitosis. *Mol Biol Cell.* 4: 303-313.
- Snaith HA, Armstrong CG, Guo Y, Kaiser K, Cohen PTW (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: 3001-3012.
- Sousa-Nunes R, Chia W, Somers WG (2009) Protein phosphatase 4 mediates localization of the Miranda complex during *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions. *Genes Dev.* 23: 359-372.
- Spradling A.C, Rubin G.M. (1982) *Science.* 218: 341-347.
- Steele FR, Washburn T, Rieger R, O'Tousa JE (1992) *Drosophila retinal degeneration C (rdgC)* encodes a novel serine/threonine protein phosphatase. *Cell.* 69: 669-676.
- Stroschein-Stevenson SL, Foley E, O'Farrell PH, Johnson AD (2006) Identification of *Drosophila* gene products required for phagocytosis of *Candida albicans*. *PLoS Biol.* 4: e4.
- Sullivan KMC, Rubin GM (2002) The Ca²⁺-calmodulin-activated protein phosphatase calcineurin negatively regulates EGF receptor signaling in *Drosophila* development. *Genetics* 161: 183-193.
- Takeo S, Tsuda M, Akahori S, Matsuo T, Aigaki T (2006) The calcineurin regulator *Sra* plays an essential role in female meiosis in *Drosophila*. *Curr Biol.* 16: 1435-1440.
- Tamura K, Subramainain S, Kumar S (2004) Temporal patterns of fruit fly (*Drosophila*) evolution revealed by mutation clocks. *Mol Biol Evol.* 21: 36-44.

- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 24: 1596-1599.
- Terry NA, Tulina N, Matunis E, DiNardo S (2006) Novel regulators revealed by profiling *Drosophila* testis stem cells within their niche. *Dev Biol.* 294: 246-57.
- Tweedie S, Ashburner M, Falls K, Leyland P, Maygold S et al. (2009) FlyBase: enhancing *Drosophila* Gene Ontology annotations. *Nucleic Acids Res.* 37: D555-D559.
- Vibrantovszki MD, Lopes HF, Karr TL, Long M (2009) Stagespecific expression profiling of *Drosophila* spermatogenesis suggests that meiotic sex chromosome inactivation drives genomic relocation of testis-expressed genes. *PLoS Genet.* 5: e1000731.
- Vicario S, Moriyama EN, Powell JR (2007) Codon usage in twelve species of *Drosophila*. *BMC Evol Biol.* 7: 226.
- Vinckenbosch N, Dupanloup I, Kaessmann H (2006) Evolutionary fate of retroposed gene copies in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103: 3220-5.
- Vinos J, Jalink K, Hardy RW, Britt SG, Zuker CS (1997) A G protein-coupled receptor phosphatase required for rhodopsin function. *Science.* 277(5326): 687-690.
- Vissi E, Clotet J, de Nadal E, Barcelo A, Bako E, Gergely P, Dombradi V, Arino J (2001) Functional analysis of the *Neurospora crassa* PZL-1 protein phosphatase by expression in budding and fission yeast. *Yeast* 18: 115-124.
- Wang N, Leung HT, Pak WL, Carl YT, Wadzinski BE et al. (2008) Role of protein phosphatase 2A in regulating the visual signaling in *Drosophila*. *J Neurosci.* 28: 1444-1451.
- Wassarman DA, Solomon NM, Chang HC, Karim FD, Therrien M et al. (1996) Protein phosphatase 2A positively and negatively regulates Ras1-mediated photoreceptor development in *Drosophila*. *Genes Dev.* 10: 272-278.
- Watillon B, Piihringer H, Kettmanna R, BOXUS Ph, Burny A (1995) Cloning and characterization of Ser/Thr protein phosphatase transcripts in apple. *Plant Science* 108: 155-164.
- White-Cooper H (2010) Molecular mechanisms of gene regulation during *Drosophila* spermatogenesis. *Reproduction.* 139 (1):11-21.
- Yatzkan E, Yarden O (1997) ppt-1, a *Neurospora crassa* PPT/PP5 subfamily serine/threonine protein phosphatase. *Biochim Biophys Acta* 1353:18-22.
- Zeke T, Kókai E, Szóör B, Yatzkan E, Yarden O, SziráK K, Fehér Zs, Bagossi P, Gergely P, Dombrádi V (2003) Expression of protein phosphatase 1 during the asexual development of *Neurospora crassa*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 134:161-170.
- Zhang J, Rosenberg HF, Nei M (1998) Positive Darwinian selection after gene duplication in primate ribonuclease genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:3708-3713.

Zhang Z, Hambuch TM, Parsch J (2004) Molecular evolution of sexbiased genes in *Drosophila*. *Mol Biol Evol.* 21: 2130-2139.

Zhang Y, Sturgill D, Parisi M, Oliver B (2007) Constraint and turnover in sex-biased gene expression in the genus *Drosophila*. *Nature.* 450: 233-237.

Zhao J, Klyne G, Benson E, Gudmannsdottir E, White-Cooper H, Shotton D (2009) Flyted: the *Drosophila* testis gene expression database. *Nucleic Acids Res.* 38: D710-D715.

Zhou Q, Zhang G, Zhang Y, Xu S, Zhao R, et al. (2008) On the origin 627 of new genes in *Drosophila*. *Genome Res* 18: 1446-1455.

Zhu X, Stein D (2004) RNAi-mediated inhibition of gene function in the follicle cell layer of the *Drosophila* ovary. *Genesis* 40:101-108.

12. TÁRGYSZAVAK

Drosophila

Ser/Thr protein foszfatáz

Génexpresszió

Evolúció

Gén duplikáció

Retrogének

13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani Dr. Dombrádi Viktor egyetemi tanárnak, témavezetőmnek, hogy számos elméleti és gyakorlati tanáccsal segítette és irányította munkámat.

Köszönöm Dr. Gergely Pál egyetemi tanárnak, hogy munkámat támogatta és lehetővé tette számomra, hogy a DEOEC Orvosi Vegytani Intézetében dolgozzak.

Szeretném megköszönni az Orvosi Vegytani Intézet minden dolgozójának a munkámhoz nyújtott segítséget. Külön köszönet Dr. Farkas Ilonának, Dr. Kókai Endrének, Dr. Brunyánszki Attilának a kísérletes munka során nyújtott segítségükért. Hálás köszönettel tartozom Bíró Istvánné, Kelemenné Szántó Ágota és Tankáné Farkas Andrea asszisztenseknek a laboratóriumi munkában nyújtott segítségükért.

Köszönet szeretnék mondani Dr. Miskei Mártonnak és Dr. Karányi Zsoltnak a bioinformatikai munkákban nyújtott segítségükért.

Köszönet Dr. Henn Lászlónak, hogy elvégezte az RNS *in situ* hibridizációs kísérleteket.

Köszönet Dr. Kovács Lászlónak az egyes PPP gének expressziójának vizsgálatánál nyújtott segítségéért.

Köszönet Sinka Rozáliának az RNS interferenciához szükséges vektorkonstruktok előállításáért.

Köszönet Dr. Deák Péternek az RNS interferenciához szükséges PpY-55A és PpN58A integráns *D. melanogaster* törzsek előállításában nyújtott segítségéért.

Köszönet Dr. Szabad Jánosnak a *D. melanogaster* X/O és XX/Y egyedek előállításához szükséges törzsekért.

Köszönet Dr. Nagy Olgának az egyes genomi DNS-ek izolálásában nyújtott segítségéért.

Köszönet a Dr. Gausz Jánosnak az RNS interferenciával csendesített törzsek vizsgálatában nyújtott segítségéért.

Köszönet Dr. Helen White-Cooper-nek, hogy biztosította számunkra a spermatocita-specifikus meghajtó törzset.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak és menyasszonyomnak, hogy nyugodt és stabil háttérrel biztosítottak számomra.

Munkánkat az OTKA 060723 és a TÁMOP 4,21./B-09/1/KONV-2010-0007 pályázat támogatta.

14. FÜGGELÉK

14.1 Az értekezés alapjául szolgáló közlemények



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK /171/2011.

Tételszám:

Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Ádám Csaba

Neptun kód: SKORMA

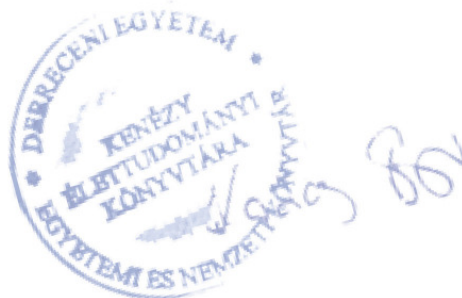
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

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

Debrecen, 2011.07.26



14.2 Az értekezéshez kapcsolódó poszterek

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

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

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

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

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

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

14.3 Az elektronikus függelék (CD melléklet) tartalma

F1. ábra. A PPP katalitikus alegységek családfája rovarokban

F2. ábra. A PPP katalitikus alegységek családfája 12 *Drosophila* fajban

F3. ábra. A PPP gének kromoszómális lokalizációja 12 *Drosophila* fajban

F4. ábra. A PPP gének expressziója *Drosophila* fajokban

F1. táblázat. A *Drosophila* PPP gének vizsgálatához használt oligonukleotid primerek

F2. táblázat. A *Drosophila* PPP katalitikus alegységek fehérjeszekvenciái